

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM MEDICINA – CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Armando Morales Júnior

**EFEITO DA HEMODIAFILTRAÇÃO (HDF) SOBRE INFLAMAÇÃO,
LESÃO ENDOTELIAL E DISTÚRPIO MINERAL ÓSSEO EM
PACIENTES IDOSOS COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

São Paulo, SP

2021

Armando Morales Júnior

**EFEITO DA HEMODIAFILTRAÇÃO (HDF) SOBRE INFLAMAÇÃO,
LESÃO ENDOTELIAL E DISTÚRPIO MINERAL ÓSSEO EM
PACIENTES IDOSOS COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Medicina – Ciências da Saúde da Universidade
Nove de Julho, como requisito parcial para obtenção
do grau de doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni

**São Paulo, SP
2021**

Morales Júnior, Armando.

Efeito da hemodiafiltração (HDF) sobre inflamação, lesão endotelial e distúrbio mineral ósseo em pacientes idosos com doença renal crônica / Armando Morales Júnior. 2021.

74 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Dalboni.

1. Doença renal crônica. 2. Hemodiafiltração. 3. Toxinas urêmicas. 4. Inflamação. 5. Distúrbio mineral e ósseo.

I. Dalboni, Maria Aparecida II. Título

CDU 616

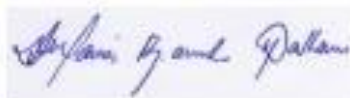
São Paulo 15 de dezembro de 2021

TERMO DE APROVAÇÃO

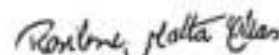
Aluna: **ARMANDO MORALES JÚNIOR**

Título da tese: **EFEITO DA HEMODIAFILTRAÇÃO (HDF) SOBRE INFLAMAÇÃO, LESÃO ENDOTELIAL E DISTÚRPIO MINERAL ÓSSEO EM PACIENTES IDOSOS COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Presidente: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI _____



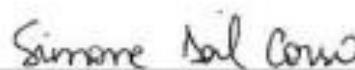
Membro: PROFA. DRA. ROSILENE MOTTA ELIAS _____



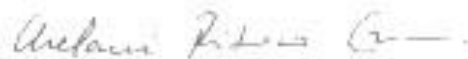
Membro: PROFA. DRA. MARISA PASSARELLI _____



Membro: PROFA. DRA. SIMONE DAL CORSO _____



Membro: PROFA. DRA. MELANI RIBEIRO CUSTÓDIO _____



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo amor e carinho, e por muitas vezes mesmo sem compreender os meus objetivos, sempre me apoiaram. Dedico em especial ao meu pai, que nos deixou recentemente, mas tenho certeza que onde ele estiver, está feliz por mim.

“A saudade é grande e o amor é para sempre....”

AGRADECIMENTOS

*“ O que a gentileza livremente oferece, agradecimentos não podem pagar. ”
(thanks cannot pay, what kindness freely gives).*

John Masefiel (1878 – 1967).

Agradeço acima de tudo, a Deus, por me conceder a vida, a fé nos momentos difíceis e por ser o responsável pelos acasos e coincidências em minha vida.

Aos meus amados pais Mércia e Armando (in memoriam) por todo apoio, incentivo, amor e carinho que me proporcionaram fazendo de mim a pessoa que sou hoje, ou seja, o meu espelho, e a dor misturada com a saudade me fez forte durante os últimos meses nessa minha caminhada.

Ao Mário Marcos Sallai, por ser meu melhor amigo, pelo companheirismo, paciência nos momentos difíceis, entender a minha ausência e não me deixar desistir diante das dificuldades e pelo constante estímulo para o meu doutorado. Agradeço também à minha família que foi sempre o meu maior incentivo. A Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni, minha orientadora, por ter me dado a oportunidade de chegar até aqui, pela amizade, apoio, paciência, generosidade, compreensão, simplicidade e principalmente pela confiança em mim depositada. Obrigado por compartilhar comigo seu imenso conhecimento e ser peça fundamental na realização desta etapa de minha vida.

A Profa. Dra. Antonia Maria Oliveira Machado, diretora do Laboratório Central do Hospital São Paulo – UNIFESP, pelo apoio e constante estímulo. A Shélica Colonnezi Castro, minha fiel parceira no trabalho, pela paciência, incentivo e por brilhantemente dar continuidade em nosso trabalho nos momentos que precisei estar ausente.

À CAPES e a Universidade Nove de Julho – UNINOVE pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colaboradores do Hospital Sancta Maggiore/ Prevent Senior pelo auxílio com a seleção dos pacientes, informações clínicas e laboratoriais fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço também a tantos outros, professores e amigos, que dividiram comigo esses momentos e contribuíram para o meu crescimento.

Agradeço também aos que sem perceberem ou aos que sem minha percepção, contribuíram para execução e finalização deste trabalho. Agradeço em especial a todos os pacientes que aceitaram a participação neste estudo, sem os quais não seria possível a realização da nossa pesquisa.

A todos o meu mais sincero: MUITO OBRIGADO!!!

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... E a vida é muito para ser insignificante." (Charles Chaplin)

RESUMO

Introdução: A doença renal crônica (DRC) é um problema de saúde pública, com prevalência mundial de 9,1%. No Brasil a hemodiálise (HD) em geral é realizada por cerca de 90% dos doentes renais crônicos. Entretanto, esta modalidade dialítica não remove substâncias tóxicas (toxinas urêmicas) com peso molecular médio ou ligadas a proteínas. O acúmulo de toxinas urêmicas nos pacientes em HD tem sido associado a maior inflamação, pior qualidade de vida, doença mineral óssea (DMO) e doença cardiovascular (DCV). A inflamação é um dos principais mecanismos fisiopatológicos da DCV e DMO na população com DRC em tratamento dialítico, principalmente em HD. Recentemente, a hemodiafiltração (HDF) tem sido descrita como modalidade dialítica que pode promover maior depuração de toxinas urêmicas com peso molecular médio ou ligadas a proteínas, sugerindo-se que a HDF poderia reduzir os efeitos adversos da inflamação, DMO e DCV. Entretanto, embora tenha sido relatado que a HDF é uma modalidade que melhora a remoção de toxinas urêmicas, existem poucos estudos avaliando o efeito da HDF na remoção de toxinas urêmicas ligadas a proteínas (indoxil sulfato (IS), p-Cresil sulfato (PCS) e ácido indol acético (IAA)) e sobre seu impacto nos mecanismos inflamatórios, endoteliais e do metabolismo mineral ósseo na população idosa. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da HDF sobre a concentração sérica de toxinas urêmicas, biomarcadores de inflamação, endoteliais e do distúrbio mineral ósseo, em pacientes idosos com DRC. **Métodos:** Foram selecionados por conveniência 31 pacientes idosos ≥ 65 anos que iniciaram tratamento dialítico por HDF. Foram avaliados no momento basal e após 6 meses: uréia, creatinina, sódio, potássio, glicose, albumina, proteína C reativa (PCR), cálcio, fósforo, paratormônio (PTH), 25 hidroxí vitamina D (25(OH)D e beta-2 microglobulina (B2M), por métodos automatizados através de kits comerciais. interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-10 (IL-10), fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), esclerostina (SOST) e osteopontina (OPN), por ensaio imunoenzimático (ELISA) através de kits comerciais. IS, PCS e IAA por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). **Resultados:** Após 6 meses de tratamento por HDF, observamos que os pacientes apresentaram redução significativa da concentração sérica dos níveis de IS ($p < 0,01$) e aumento significativo nas

concentrações séricas de B2M, ureia, creatinina e cálcio. Não observamos diferenças significantes entre as demais variáveis. **Conclusão:** Este estudo mostrou que a HDF reduziu os níveis séricos da toxina urêmica indoxil sulfato na população idosa. O impacto desta redução em população idosa sobre desfechos clínicos deve ser avaliado em estudos futuros.

Palavras-chave: Doença renal crônica; hemodiafiltração, toxinas urêmicas; inflamação; distúrbio mineral ósseo.

ABSTRACT

Introduction: Chronic kidney disease (CKD) is a public health problem, with a worldwide prevalence of 9.1%. In Brazil, hemodialysis (HD) is generally performed by about 90% of patients with CKD. However, this dialysis modality does not remove toxic substances (uremic toxins) with medium molecular weight or linked to proteins. The accumulation of uremic toxins in HD patients has been associated with increased inflammation, poor quality of life, bone mineral disease (BMD) and cardiovascular disease (CVD). Inflammation is one of the main pathophysiological mechanisms of CVD and BMD in the population with CKD undergoing dialysis, especially on HD. Recently, hemodiafiltration (HDF) has been described as a dialysis modality that can promote greater clearance of medium molecular weight or protein-bound uremic toxins; suggesting that HDF could reduce the adverse effects of inflammation, BMD, and CVD. However, although HDF has been reported to be a modality that improves the removal of uremic toxins, there are few studies evaluating the effect of HDF in the removal of protein-bound uremic toxins (indoxyl sulfate (IS), p-Cresylsulfate (PCS) and indole acetic acid (IAA) and its impact on inflammatory, endothelial and bone mineral metabolism mechanisms in the elderly population. **Objective:** to evaluate the effects of HDF on the serum concentration of uremic toxins, biomarkers of inflammation, endothelial and bone mineral disorder, in elderly patients with CKD.

Methods: Thirty-one elderly patients ≥ 65 years old who started dialysis for HDF were selected for convenience. We evaluated at baseline and after 6 months: urea, creatinine, sodium, potassium, glucose, albumin, C-reactive protein (CRP), calcium, phosphorus, parathormone (PTH), 25 hydroxy vitamin D (25(OH)D and beta-2 microglobulin (B2M), by automated methods using commercial kits. interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), fibroblast growth factor 23 (FGF-23), sclerostin (SOST) and osteopontin (OPN) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits. IS, PCS and IAA by high-performance liquid chromatography (HPLC) **Results:** After 6 months of treatment with HDF, we observed that the patients showed significant reduction in serum concentration of IS levels ($p < 0.01$) and significant increase in serum concentrations of B2M, urea, creatinine, and calcium. We did not observe

significant differences between the other variables. **Conclusion:** this study showed that HDF reduced serum levels of the uremic toxin indoxyl sulfate in the elderly population. The impact of this reduction in the elderly population on clinical outcomes must be evaluated in future studies.

Keywords: Chronic kidney disease; hemodiafiltration; uremic toxins; inflammation; bone mineral disorder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da Classificação da Doença Renal Crônica de acordo com o KDIGO (adaptado).

Figura 2 – Pirâmide etária da população brasileira, projeção da população.

Figura 3 – Figura exemplificando alterações vasculares com participação das células da imunidade, células endoteliais e formação de micropartículas. **Figura**

4 – Modelo esquemático para a regulação do controle da formação óssea pela esclerostina.

Figura 5 – Esquema ilustrado do desenho do estudo.

Figura 6 – Fluxograma de inclusão de pacientes no estudo.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação do IS nos tempos Pré-HDF (T0) e Pós-HDF (T6) nos pacientes diabéticos.

Gráfico 2 – Demonstrativo da redução da concentração sérica das toxinas urêmicas através do delta (%) de uma subpopulação do estudo.

Gráfico 3 – Comportamento da fosfatase alcalina nos pacientes que apresentaram redução da concentração sérica de IS ao longo de 6 meses.

Gráfico 4 – Comportamento da PCR nos pacientes que apresentaram redução da concentração sérica de IAA ao longo de 6 meses.

Gráfico 5 – Correlação entre FGF-23 e Osteopontina.

Gráfico 6 – Correlação entre Fosfatase Alcalina e Esclerostina.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição das células que sintetizam biomarcadores inflamatórios, endoteliais e de DMO na DRC e seu efeito sobre o osso.

Tabela 2 – Dados demográficos e epidemiológicos dos pacientes (n=31).

Tabela 3 – Comparação das toxinas urêmicas, dados bioquímicos, biomarcadores do distúrbio mineral ósseo, do endotélio e inflamatório dos pacientes nos tempos pré-HDF (T0) e pós-HDF (T6).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HDF – Hemodiafiltração
DRC – Doença Renal Crônica
HD – Hemodiálise
DMO – Doença Mineral Óssea
DCV – Doença Cardio Vascular
IS – Indoxil Sulfato
PCS – p-Cresilsulfato
IAA – Ácido Indol-3 Acético
PCR – Proteína C Reativa
PTH – Paratôrmônio
25(OH)D – Vitamina D
B2M – Beta-2 microglobulina
IL-6 – Interleucina 6
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
IL-10 – Interleucina 10
FGF-23 – Fator de Cescimento de Fibroblastos 23
SOST – Esclerostina
OPN – Osteopontina
ELISA – Ensaio Imunoenzimático
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance
RFG – Ritmo de Filtração Glomerular
KDIGO – Kidney Disease Improving Global Outcomes
OMS – Organização Mundial de Saúde
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
TFGe – Taxa de Filtração Glomerular Estimada
MDRD – Modification of Diet in Renal Disease
CKD-EPI – Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
TGF – Taxa de Filtração Glomerular
DP – Diálise Peritoneal
SBN – Sociedade Brasileira de Nefrologia
IL-8 – Interleucina 8

MCP-1 – Proteína Quimioatraente de Monócitos 1
ICAM-1 – Molécula de Adesão Intracelular 1
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
AGEs – Produtos de Glicação Avançada
RISCAVID - RISchio CARDiovascolare nei pazienti afferenti all' Area Vasta In
Dialisi
IL-18 – Interleucina 18
ET – Endotelina
ET1 – Endotelina 1
ET2 – Endotelina 2 ET3 – Endotelina 3
iNOS – Óxido Nítrico Sintase LDL –
Lipoproteína de Baixa Densidade
IL-1 β – Interleucina 1 β
Ca – Cálcio
P – Fósforo
HPTS – Hiperparatireoidismo Secundário
1,25 (OH) $_2$ D – 1,25 Dihidroxi Vitamina D – Calcitriol
FA – Fosfatase Alcalina
P1NP – Propeptídeo N-terminal
TRAP5b – Fosfatase ácida Tartarato-resistente
CTX – Telopectídeo C-terminal do colágeno tipo 1
OPG – Osteoprotegerina
OPN – Osteopontina
SSP1 – Secreted Phosphoprotein 1
LPR5 – Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 5
LPR6 – Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 6
NK – Natural Killer

SUMÁRIO

1. Contextualização	18
1.1. Doença Renal Crônica (DRC)	18
1.2. Hemodiafiltração (HDF)	20
1.3. HDF, Uremia e Inflamação	21
1.4. Inflamação e Lesão Endotelial na DRC	23
1.5. Inflamação e Mediadores do Distúrbio Mineral Ósseo (DMO) na DRC	25
1.6. Justificativa	30
1.7. Hipótese	31
2. Objetivos	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. Métodos	35
3.1. População do Estudo	35
3.2. Critérios de Inclusão	36
3.3. Critérios de Exclusão	36
3.4. Características do Tratamento Dialítico	37
3.5. Avaliação das Toxinas Urêmicas, Marcadores Inflamatórios, Endoteliais e do Distúrbio Mineral Ósseo	38
3.6. Análise Estatística	39

4. Resultados	41
5. Discussão	
48 6. Conclusão	
..... 55 7.	
Referências Bibliográficas	57
8. Anexos	
68	

Contextualização

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Doença Renal Crônica (DRC)

Segundo o estudo de Bikbov B. et al.¹, que utilizou as principais fontes de dados publicados na literatura no período entre 1990 e 2017, a DRC apresentou 697.5 milhões de casos registrados em todos os estádios com uma prevalência mundial em 2017 de 9,1%, sendo considerada um problema global de saúde pública emergente.

O diagnóstico de DRC crônica é feito mediante um ritmo de filtração glomerular (RFG) diminuído por pelo menos 3 meses e segue a classificação do *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO)², conforme a ilustração a seguir.

Figura 1 – Representação esquemática da Classificação da Doença Renal Crônica de acordo com o KDIGO (adaptado).

DRC Classificação e Estadiamento				Estágio de dano do rim		
<div> <div>Verde: Risco baixo (RB)</div> <div>Amarelo: Risco moderado (RM)</div> <div>Laranja: Risco alto (RA)</div> <div>Vermelho: Risco muito alto (RMA)</div> </div>				Razão albumina/creatinina urinária Descrição e variação		
				A1	A2	A3
				Aumento normal a leve < 30 mg/g	Aumento moderado 30-300 mg/g	Aumento grave > 300 mg/g
Estadiamento da função renal TFG (mL/min/1,73m ²) Descrição e variação	G1	Normal ou alto	≥ 90	RB	RM	RA
	G2	Diminuição leve	60-89	RB	RM	RA
	G3a	Diminuição leve a moderada	45-59	RM	RA	RMA
	G3b	Diminuição moderada a grave	30-44	RA	RMA	RMA
	G4	Diminuição grave	15-29	RMA	RMA	RMA
	G5	Insuficiência renal	< 15	RMA	RMA	RMA

*G- estadios da DRC com suas respectivas alterações renais e taxas de filtração glomerular inerentes a cada um

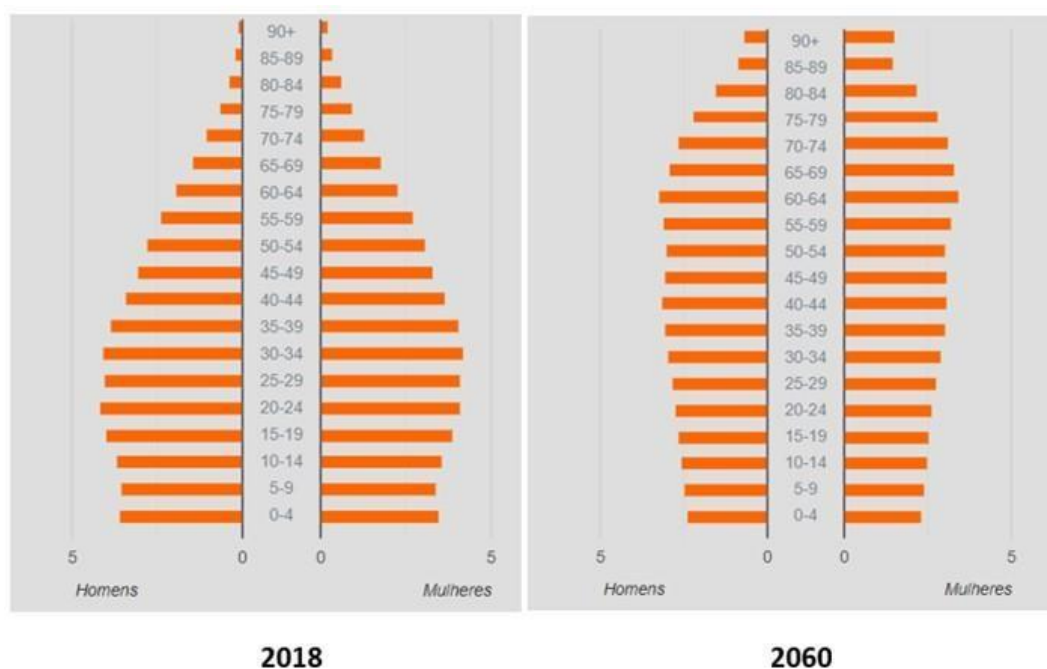
De acordo com o Censo Brasileiro de Diálise Crônica da Sociedade Brasileira de Nefrologia de 2020, houve um aumento de 3,1% no percentual de

pacientes que fazem diálise na faixa etária de 64 anos ou mais, em comparação ao censo de 2012 onde o percentual foi de 31,9%.

No Brasil 13% da população do país, que corresponde a mais de 28 milhões de pessoas, são maiores de 60 anos de idade e conforme a Organização

Mundial de Saúde (OMS) são considerados idosos. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), conforme a projeção da população que foi divulgada em 2018, este percentual de 13% de idosos pode dobrar nas décadas futuras. Conforme a pesquisa, 25% da população em 2043 será composta por indivíduos maiores de 60 anos, enquanto 16,3% da população será composta por jovens com até 14 anos. O índice de envelhecimento que reflete a relação entre a porcentagem de idosos e jovens aumentará de 43,2% (2018) para 173,5% (2060), observado graficamente pela mudança no formato da pirâmide etária (figura 2).

Figura 2 – Pirâmide etária da população brasileira, projeção da população.



Fonte: Site do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Projeções e estimativas da população do Brasil e das Unidades da Federação, acessado em 09/10/2021, disponível em: www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html?utm_source=portal&utm_medium=popclock

Após os 40 anos de idade o RFG diminui em média 1 mL/min/1,73 m² por ano, desta forma, espera-se que um indivíduo acima dos 80 anos apresente uma depuração de 80 mL/min/1,73 m², conforme demonstram estudos longitudinais e retrospectivos. Consequentemente, o avanço da idade torna-se um fator de risco para doença renal³. Embora a DRC possa ocorrer em qualquer faixa etária, com o envelhecimento ela torna-se mais comum⁴.

No caso de um paciente com sintomas clássicos de uremia, como náuseas, vômitos, inapetência, perda de peso, desnutrição, além da dificuldade

de controle volêmico mesmo após ajuste de doses de diuréticos, não há dúvidas sobre a indicação de terapia renal substitutiva. Da mesma forma, na presença de anormalidades eletrolíticas como hiperpotassemia refratária e acidose em pacientes com função renal comprometida, a terapia renal substitutiva está indicada.

Várias equações estão disponíveis para o cálculo da TFG_e (Taxa de Filtração Glomerular estimada - TFG_e), sendo as mais utilizadas a MDRD e a CKD-EPI. No caso de pacientes com TFG < 60 mL/min/1,73m² estas duas equações foram comparáveis em termos de acurácia. Em se tratando de pacientes com TFG_e > 60 mL/min/1,73m² a CKD-EPI foi substancialmente mais acurada(2).

Os métodos de diálise que podem ser comumente oferecidos ao pacientes com DRC são a hemodiálise (HD) e a diálise peritoneal (DP). A HD é realizada no Brasil por mais de 90% dos pacientes (Censo da SBN). A maior parte dos pacientes realiza a HD, onde são realizadas 3 sessões semanais com duração média de 4h. Este tipo de diálise porém leva a grandes flutuações de peso, osmolalidade, concentração de ureia, eletrólitos, e portanto, efeitos adversos.

1.2. Hemodiafiltração (HDF)

A HDF tem sido considerada a técnica de diálise mais eficiente comparada à HD, já que a depuração de pequenos solutos, como a ureia, pode ser ainda maior do que em HD e as depurações de solutos médios, como B₂M, são muito maiores. Sugeriu-se que a HDF reduz a mortalidade possivelmente devido à remoção mais eficaz de maiores solutos e de fluidos. Apenas 1 dos 3 maiores estudos randomizados foi capaz de demonstrar um efeito positivo da HDF na sobrevida do paciente, em comparação com aqueles randomizados para HD. Análises post hoc desses estudos mostraram consistentemente que os pacientes randomizados para HDF que receberam os maiores volumes de convecção apresentaram menor risco de mortalidade e eventos cardiovasculares do que aqueles randomizados para HD.

1.3. HDF, Uremia e Inflamação

Os metabólitos que o organismo retém quando ocorre lesão renal são definidos como toxinas urêmicas⁵. Em condições normais estas toxinas são eliminadas pelos rins^{6,7}, mas com o avanço da DRC podem interagir com outras funções biológicas de maneira negativa⁸, ocasionando impacto sobre a sinalização de mecanismos inflamatórios e geração de estresse oxidativo, que corroboram para a fisiopatologia de várias comorbidades observadas no paciente com DRC.

O indoxil sulfato (IS) é uma toxina urêmica de baixo peso molecular (212,21 Da) que pertence ao grupo indol, derivada do metabolismo bacteriano do aminoácido triptofano, proveniente da dieta proteica^{9,10}. Sua toxicidade é mediada por processos inflamatórios, pró-fibróticos e oxidativos, além disso desempenha papel importante na lesão endotelial desencadeando produção de radicais livres, inibição do reparo e regeneração endotelial, e produção de moléculas pró-inflamatórias^{8, 10, 11}.

O p-cresilsulfato (PCS) é uma toxina urêmica do grupo fenol, de baixa massa molecular que se origina do metabolismo da tirosina e fenilalanina por fermentação da microbiota no intestino grosso^{5, 8}. Sua elevada concentração sérica pode ser associada à mortalidade e presença de doenças cardiovasculares em pacientes DRC^{8, 12}. O PCS induz a liberação de micropartículas endoteliais, mesmo na ausência da lesão, sugerindo o seu envolvimento na disfunção endotelial⁸, seu efeito pró-inflamatório aumenta a formação de radicais livres produzidos por leucócitos e contribui para lesão vascular em pacientes com DRC^{5, 8, 13, 14}.

O ácido indol-3 acético (IAA) é um soluto urêmico que também pertence ao grupo indol, derivado do metabolismo do aminoácido triptofano a partir de sua fermentação pela microbiota intestinal^{15, 16}. Nos pacientes renais crônicos o IAA promove inflamação vascular, estresse oxidativo, efeitos pró-inflamatórios e pró-oxidantes e aterosclerose, sendo um marcador significativo para doenças cardiovasculares nesses pacientes, podendo estar associado a mortalidade¹⁷, e juntamente com o IS, o IAA induz estresse oxidativo em células tubulares e endoteliais. Pelo fato do IAA elevar a concentração de citocinas inflamatórias como interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), proteína quimioatraente de

monócitos-1 (MCP-1), molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células endoteliais, é conhecido como mediador de estresse oxidativo¹⁷.

Desta forma, concentrações elevadas de IAA, IS e PCS em pacientes com DRC com ou sem tratamento dialítico estão associados a maior estado de inflamação, risco e mortalidade cardiovascular (DCV) e aterosclerose¹⁸⁻²⁰.

A inflamação crônica e o estresse oxidativo são altamente prevalentes em portadores de DRC e parecem contribuir de modo importante para a morbimortalidade nesses pacientes. Adicionalmente, as toxinas urêmicas de peso molecular médio tem envolvimento significativo com as doenças relacionadas à diálise²¹⁻²³.

Estudos recentes sugerem que a HDF seja o método dialítico, atualmente disponível, mais eficiente para a remoção de toxinas urêmicas de peso molecular médio, quando comparada à HD. A taxa de redução dos AGEs (Produtos de Glicação Avançada), toxina de peso molecular médio, durante a terapia dialítica foi maior na HDF ($61,5 \pm 4,2\%$) do que na HD ($20,5 \pm 2,4\%$; $p < 0,001$)²⁴. Adicionalmente, após 6 meses, os níveis pré-dialíticos de AGEs eram mais baixos no grupo tratado com HDF, do que no grupo tratado com os outros métodos^{21, 24}.

A Proteína C Reativa (PCR) (± 107.000 D) é um marcador reconhecido de inflamação sistêmica e pode prever risco cardiovascular e mortalidade em portadores de DRC em diálise²⁵. A Interleucina 6 (IL-6) é uma citocina que tem papel importante no estímulo à resposta inflamatória, regulando a síntese hepática de proteínas de fase aguda. Adicionalmente, ela pode contribuir para a aterosclerose. Em pacientes em diálise a IL-6 tem se mostrado um dos preditores mais potentes de inflamação, doença cardiovascular e mortalidade^{23, 25-31}.

No estudo “*RISchio Cardiovascolare nei pazienti afferenti all’ Area Vasta In Dialisi*” (RISCAVID)²⁸, níveis de PCR maiores que 5 mg/L e de IL-6 maiores que 3,2 pg/mL estiveram associados com aumento da mortalidade cardiovascular e por todas as causas em pacientes em HD.

Com objetivo de diminuir os efeitos da inflamação em pacientes com DRC, alguns estudos têm investigado o efeito da HDF na remoção ou diminuição de

fatores inflamatórios. Kuo et al.³² relataram que a HDF foi capaz de diminuir TNF α e IL-18 sugerindo que a redução destas citocinas pode contribuir para menor incidência de placas ateroscleróticas. Den Hoedt et al.³³ também observaram menores níveis de PCR e albumina em pacientes que fizeram HDF. Den Hoedt et al.²³, em outro estudo, relataram que os níveis de PCR e a taxa de mortalidade mostraram-se menores no grupo em HDF, quando comparada à HD de alto fluxo^{23, 28}. De forma semelhante, em outro estudo, foi demonstrado que a HDF diminuiu os níveis séricos de PCR e IL-6, 4 meses após conversão de HD de baixo fluxo para HDF²⁵. Desta forma, sugere-se que o tratamento por HDF pode contribuir na remoção ou diminuição de fatores inflamatórios.

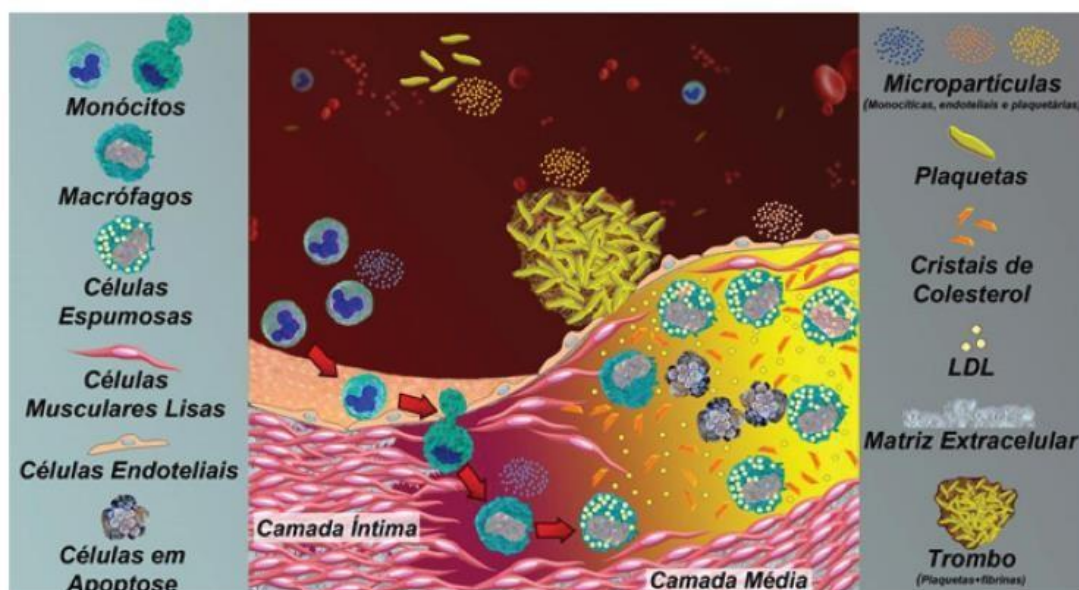
1.4. Inflamação e Lesão Endotelial na DRC

Como mencionado anteriormente, a inflamação é o principal mecanismo fisiopatológico da doença cardiovascular (DCV) na população com DRC⁽³¹⁾. Vários relatos suportam que a aterosclerose resulta de inflamação crônica das artérias, a qual é causada por uma reação imune, resultando na destruição da camada endotelial³⁴. Desta forma, as toxinas urêmicas poderiam ser um dos fatores que contribuem para a lesão do endotélio.

O endotélio, sob condições fisiológicas possui função de manter o tônus vascular, a fluidez do sangue e limitar a inflamação e proliferação de células do músculo liso. Porém, quando fatores de risco cardiovasculares estão presentes, como são os efeitos das toxinas urêmicas, o endotélio pode adotar um fenótipo que pode favorecer a inflamação, trombose, vasoconstrição e formação aterosclerótica³⁴.

Além das células endoteliais, neutrófilos, monócitos e linfócitos também participam da resposta inflamatória e podem sofrer alterações celulares e apresentar micropartículas respectivas a cada célula (Figura 3). Nos últimos anos, alguns estudos têm investigado estas células e suas respectivas micropartículas como marcadores de inflamação, lesão e eventos vasculares e também associados a maior DCV^{35, 36}.

Figura 3 – Figura exemplificando alterações vasculares com participação das células da imunidade, células endoteliais e formação de micropartículas³⁷.



Pacientes com DRC comumente apresentam aterosclerose acelerada e disfunção celular imune, que está atribuída a constante renovação e ativação de monócitos e células T circulantes, sendo assim uma das principais causas de DCV nesta população comparado à população geral³⁵. Por sua vez, tem sido descrito que esta desregulação imune é induzida pela perda da função renal, com consequente diminuição da filtração e acúmulo de substâncias tóxicas que circulam pelos vasos³⁸ e ativam e desregulam neutrófilos, monócitos e linfócitos de pacientes com DRC, resultando em processo inflamatório vascular.

A endotelina (ET) é um peptídeo de 21 aminoácidos caracterizado nos humanos por 3 genes distintos com isoformas únicas ET-1, ET-2 e ET-3, todos os 3 são vasoconstritores potentes e fatores de crescimento pró-fibróticos³⁹, sendo o ET-1 a isoforma vascular predominante, parte integrante na regulação da fisiopatologia renal e cardiovascular e com maior efeito regulatório no tônus vascular. O ET-1 também pode ser induzido pelo estresse oxidativo no endotélio vascular renal, células mesangiais e epitélio tubular⁴⁰.

Diante do exposto acima, o comprometimento endotelial nos pacientes com DRC é resultado de um mecanismo complexo onde neutrófilos, monócitos, linfócitos e mediadores solúveis se associam as alterações de fluxo e dilatação de artérias e fatores de coagulação que culminam em injúria vascular. Razão pela qual estratégias de tratamento têm sido realizadas com o objetivo de minimizar estes efeitos, onde recentemente a HDF tem sido objeto de estudo neste sentido. De fato, Jia et al.⁴¹ observaram que pacientes tratados com HDF

melhoraram o fluxo e dilatação braquial após 2 semanas de tratamento comparado aos pacientes em HD. Caló LA et al.⁴² descreveram que pacientes que estavam em HD, após transferência para HDF apresentaram aumento da expressão da proteína iNOS (vasodilatador) e diminuição dos níveis séricos de LDL oxidado e IL-1 β , sugerindo que a modulação destes mecanismos pela HDF pode reduzir o risco de eventos cardiovasculares.

1.5. Inflamação e Mediadores do Distúrbio Mineral Ósseo (DMO) na DRC

O distúrbio mineral ósseo (DMO) é uma complicação que ocorre durante a evolução da DRC, onde cálcio (Ca), fósforo (P), 25(OH)D e o PTH apresentam alterações que progridem em paralelo com a diminuição da função renal⁴³. Inicialmente, com a queda da filtração glomerular, a regulação dos níveis séricos de P e Ca fica prejudicada, visto que a excreção renal de fósforo diminui levando a uma hiperfosfatemia e a menor produção renal de vitamina D ativa (calcitriol), que por sua vez, promoveria absorção intestinal de cálcio⁴⁴. A hiperfosfatemia e a hipocalcemia estimulam as glândulas paratireoides, que se hiperplasiam e aumentam a secreção do PTH, estabelecendo então o hiperparatireoidismo secundário (HPTS)⁴⁵. Atualmente, sabe-se que desde os primeiros estádios da DRC, a retenção de P estimula a secreção do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), um hormônio secretado pelos osteócitos, que além de ter uma ação fosfatúria, inibe a enzima 1- α hidroxilase causando uma menor secreção de calcitriol^{46, 47}.

A maioria dos pacientes com distúrbios minerais e ósseos da DRC (DMODRC) apresentam hipovitaminose D (insuficiência/deficiência da 25(OH)D)⁴⁸, causada por diversos fatores como dieta pobre em vitamina D, baixa exposição ao sol e perda de proteínas ligadas à vitamina D, na vigência de uma proteinúria significativa⁴⁹. Assim, a deficiência de calcitriol 1,25(OH)₂D está relacionada à menor produção da enzima 1 α -hidroxilase pelos rins e pela falta do seu precursor, a 25(OH)D^{48, 50}. A diminuição do calcitriol é mais um estímulo à secreção do PTH, que aumenta absorção intestinal de Ca e a reabsorção óssea de Ca. Dessa forma, se o HPTS não é controlado precocemente, evoluiu para uma forma grave apresentando, além da doença óssea, um elevado risco de calcificação vascular e mortalidade cardiovascular^{45, 51, 52}. Nesse contexto

clínico, também ocorre a elevação dos níveis séricos de FGF-23 que, de forma independente, aumenta o risco cardiovascular e a mortalidade entre esses pacientes^{46, 47}.

Na tentativa de se evitar a progressão do HPTS, o KDIGO recomenda que se monitore regularmente, conforme os estádios da DRC, os níveis séricos de Ca, P, Vitamina D, fosfatase alcalina (FA) e PTH⁵³. Os marcadores de doença óssea mais utilizados, que podem refletir a remodelação óssea, são o PTH e a FA (marcador de formação óssea) e que quando analisados conjuntamente, aumentam a sensibilidade do diagnóstico das doenças de alta ou baixa remodelação e permitem avaliar a evolução dessas patologias ao longo do tratamento instituído⁵⁴. Outros marcadores podem refletir alterações dinâmicas do osso, embora alguns não sejam usados nos estágios mais avançados da DRC ou apenas são usados em pesquisa clínica, sendo os mais comuns:

Marcadores de formação óssea⁵⁵:

- Fosfatase Alcalina – proteína secretada pelos osteoblastos.
- P1NP –propeptídeo N-terminal derivado da degradação do colágeno.
- Osteocalcina – proteína não colágena mais abundante do osso, liberada pelos osteoblastos e que está envolvida na mineralização óssea.

Marcadores de reabsorção óssea⁵⁵:

- Fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP5b) – enzima presente nos osteoclastos.
- CTX - Telopectídeo Carboxiterminal do Procolágeno tipo 1.

Reguladores da remodelação óssea⁵⁵⁻⁵⁷:

- FGF-23 – hormônio inversamente relacionado com a mineralização óssea.
- Esclerostina – glicoproteína secretada pelos osteócitos, inibe a via de sinalização Wnt ativando os osteoclastos e diminuindo a formação óssea.
- Osteoprotegerina (OPG) – citocina solúvel, membro da família dos receptores de TNF e que inibe a formação óssea⁵⁶.
- Osteopontina (OPN) – componente da matriz mineralizada do osso, sintetizada pelos osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. É um agente pro-inflamatório potente nos estados inflamatórios crônicos, especialmente arteriosclerose, recrutando monócitos/macrófagos e regulando as

secreções de citocinas. Entretanto, fisiologicamente, é um inibidor da calcificação, prevenindo calcificações ectópicas^{51, 58, 59}. Além do complexo mecanismo do eixo Ca, P, 25(OH)D, PTH e FGF-23, a relação entre inflamação e DMO-DRC já é bem estabelecida, se destacando as conexões entre tecido ósseo, inflamação e imunologia. O tecido ósseo é considerado uma glândula endócrina, onde osteoblastos e osteoclastos são células ativas responsáveis pelo processo de formação e reabsorção óssea, enquanto os osteócitos respondem por alguns efeitos hormonais. Recentemente, observou-se que a medula óssea abriga centros, chamados de nichos, constituídos de vários tipos de células, apresentando interações funcionais e estruturais, onde células imunes são capazes de modular as células ósseas e vice-versa⁶⁰. Portanto, as citocinas produzidas pelas células imunes interagem com os osteoblastos e osteoclastos, alterando a remodelação óssea. Outro dado interessante é que a ativação dos macrófagos e de outras citocinas, facilitaria a transformação fenotípica das células musculares lisas, aumentando a degradação da matriz, a formação do núcleo do cristal de hidroxiapatita, a absorção de Ca e o aumento da atividade da FA.

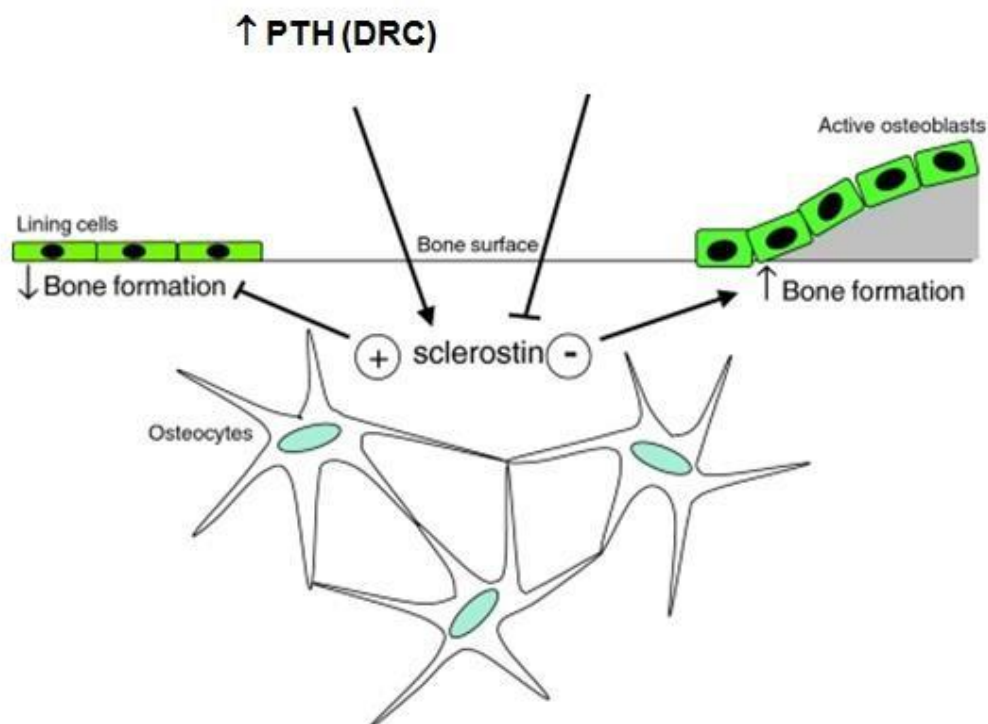
Recentemente, pesquisadores mostraram, em modelos experimentais, que a associação entre DRC e inflamação pode ser ainda mais estreita, onde o aumento dos níveis séricos de FGF-23 estimularia a síntese hepática de IL-6 e proteína C reativa, se estabelecendo um círculo vicioso entre inflamação e alterações do metabolismo mineral. Portanto, pacientes com DRC e níveis elevados de FGF-23 teriam um estado crônico de inflamação, resultando em agravamento das lesões vasculares, ósseas e aumento de mortalidade⁴⁷. Diante de todas essas alterações, além de estratégias medicamentosas para o tratamento dos pacientes com DMO-DRC, a escolha da modalidade dialítica HDF poderia ter a vantagem adicional de modular proteínas inflamatórias, como citado anteriormente. Entretanto, essa ação reguladora da HDF ainda não está bem definida e os resultados são contraditórios^{25, 57, 61}.

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína fosforilada secretada, também conhecida como fosfoproteína secretada 1 (Secreted Phosphoprotein 1, SPP1) expressa no ramo ascendente da alça de Henle e tecido renal fetal, encontrada

em neurônios, músculo liso, células epiteliais e endoteliais, células inflamatórias agudas e crônicas^{58, 59}. Desempenha um papel significativo na reabsorção e renovação óssea por sua capacidade de ancorar osteoclastos via integrina $\alpha_v\beta_3$ ⁶². Tem um papel importante na regulação da calcificação vascular e na mineralização óssea. Além disso, o aumento local de sua concentração nas paredes dos vasos está associado com inflamação dentro das artérias, mineralização do músculo liso e formação de placa aterosclerótica^{51, 58, 63}.

A esclerostina é uma proteína inibidora de formação óssea e sua síntese é restrita aos osteócitos, apesar de seu mRNA ser expresso no coração, aorta, fígado e rins, a proteína não foi detectada nesses órgãos⁶⁴. A esclerostina inibe a via de sinalização Wnt B-catenina através da ligação à LRP5 ou 6 e, desse modo, regula negativamente a formação óssea (figura 5). Níveis elevados de esclerostina resultam em aumento de reabsorção óssea e diminuição da formação óssea, conforme demonstrado por evidências genéticas, sugerindo que os fatores que regulam sua expressão (estímulos como, hormônios, fatores de crescimento e forças mecânicas) são provavelmente críticos para a homeostase óssea⁶⁵.

Figura 4 – Modelo esquemático para a regulação do controle da formação óssea pela esclerostina.



Fonte: Adaptado de Moester, M. J. et al. *Calcif Tissue Int*, v. 87, n. 2, p. 99-107, Aug 2010.

A esclerostina pode exercer o seu efeito inibitório na formação do osso, impedindo a ativação de células de revestimento, bem como a inativação de osteoblastos ativos. Os glicocorticóides estimulam a expressão da esclerostina e, desse modo, inibem a formação óssea, enquanto o PTH e a carga intermitente inibem a expressão da esclerostina nos osteócitos e, portanto, estimulam a formação óssea⁶⁴.

Nos últimos anos a via de sinalização Wnt emergiu como um componente regulador crítico do controle da formação e da reabsorção óssea, são várias as vias de sinalização onde as proteínas Wnt participam, embora a maioria dos efeitos da sinalização Wnt no esqueleto parecem melhor explicados pela via de sinalização canônica Wnt β -catenina⁶⁶, onde o TNF- α importante mediador inflamatório destaca-se entre os fatores que regulam esta via^{67, 68}.

Vários são os biomarcadores utilizados para avaliação óssea em pacientes com DRC. A glicoproteína esclerostina (SOST), também está aumentada nestes pacientes, promove reabsorção óssea e está associada à calcificação vascular⁶⁹.

Tabela 1 – Descrição das células que sintetizam biomarcadores inflamatórios, endoteliais e de DMO na DRC e seu efeito sobre o osso.

Biomarcador	Quem produz	Na DRC avançada	Papel na inflamação	Papel no osso
TNF-alfa	Macrófago Mastócito Células NK	↑	Próinflamatório ⁷⁰	Ativa osteoclastos
Interleucina-6	Linfócito B Linfócito T Macrófagos	↑	Próinflamatório ⁷¹	Ativa osteoclastos
Interleucina-10	Linfócito B Linfócito T Macrófagos Monócitos Mastócitos	↑	Antiinflamatório ⁷²	Inibe ativação osteoclastos
PCR	Fígado	↑	Participa da resposta sistêmica à inflamação ⁷³	-
FGF-23	Osteócito	↑	-	Estimula fostatúria e inibe alfa-1 hidroxilase ⁴⁴
Esclerostina	Osteócito	↑	-	Inibe formação ⁶⁴
Osteopontina	Expressa em tecidos mineralizados, rim e secreções corporais	↑	-	Reabsorção e formação ⁶²

Assim, além de estratégias medicamentosas para o tratamento de DMO nos pacientes com DRC, a HDF pode também ter efeito na modulação destas proteínas. Entretanto, a regulação destas proteínas pela HDF ainda não está bem definida.

1.6. Justificativa

A presença de toxinas urêmicas que não são totalmente dialisadas por HD e o procedimento dialítico “per se” induzem a maior síntese de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo, que contribuem para destruição da camada endotelial, lesão vascular e distúrbio mineral ósseo, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade.

A HDF tem sido descrita como modalidade dialítica que promove maior depuração de toxinas urêmicas quando comparada à HD e que poderia ter impacto na modulação da inflamação e consequente regulação de função endotelial e metabolismo ósseo. Entretanto, ainda são poucos os estudos sobre os efeitos da HDF nestes aspectos, principalmente na população idosa.

1.7. Hipótese

A HDF diminui a concentração sérica das toxinas urêmicas de peso molecular médio, biomarcadores de inflamação, endoteliais e do distúrbio mineral ósseo.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da HDF sobre a concentração sérica de toxinas urêmicas de peso molecular médio, biomarcadores de inflamação, endoteliais e do distúrbio mineral ósseo em pacientes idosos com DRC.

2.2. Objetivos Específicos:

Avaliar se a HDF reduz a concentração sérica de:

1. Toxinas urêmicas de peso molecular médio (IAA, PCS e IS).
2. Biomarcadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-10 e PCR).
3. Biomarcadores endoteliais (endotelina e osteopontina).
4. Biomarcadores do distúrbio mineral ósseo (Ca, P, PTH, vitamina D, esclerostina (SOST), osteopontina e FGF-23).

Métodos

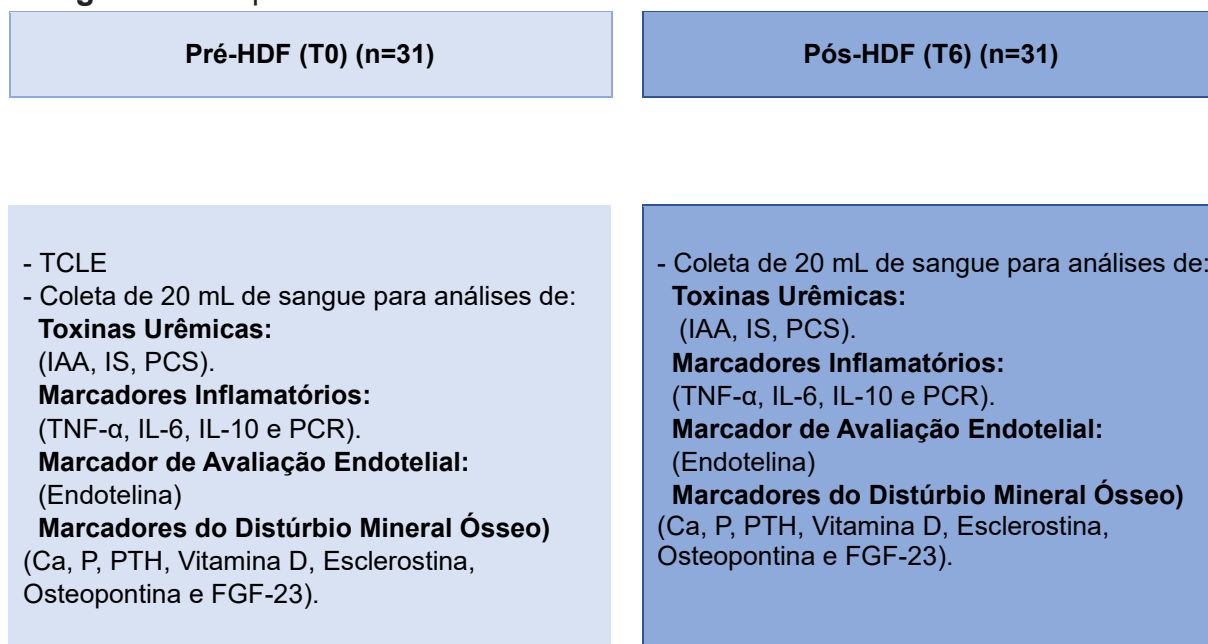
3. MÉTODOS

3.1. População do Estudo

Trata-se de um estudo prospectivo observacional com avaliação e seguimento de uma amostra por conveniência de pacientes idosos com DRC estágio 5, tratados em terapia renal substitutiva por HDF. Para o estudo 31 pacientes com idade entre 65 e 94 anos, que iniciaram HDF na Unidade de HDF do Hospital Sancta Maggiore/Prevent Senior, foram selecionados e incluídos após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Nove de Julho/UNINOVE: C.A.A.E - 97475918.5.0000.5511; Número do Parecer: 2.962.842. Utilizamos o check list de STROBE para este estudo prospectivo observacional com avaliação e seguimento de uma amostra por conveniência⁷⁴.

No início da primeira sessão de HDF, Pré-HDF (T0), foi realizada a coleta de 20 mL de sangue para avaliação das toxinas urêmicas, marcadores de inflamação, marcadores de lesão endotelial e marcadores do distúrbio mineral ósseo, procedimento repetido após 6 meses do início do tratamento com HDF, Pós-HDF (T6).

Figura 5 – Esquema ilustrado do desenho do estudo.



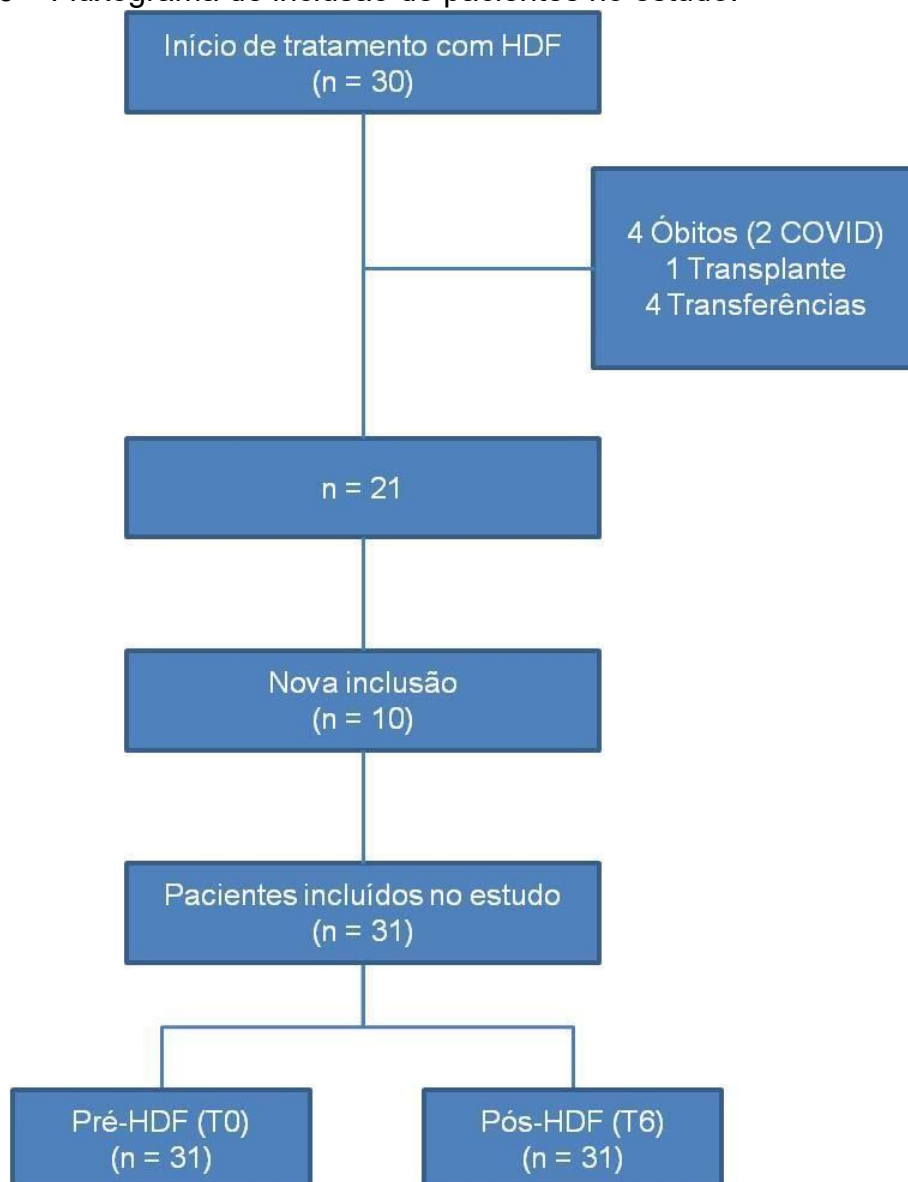
Fonte: Produção do próprio autor

3.2. Critérios de Inclusão

Pacientes com idade ≥ 65 anos, com doença renal crônica e que tenham iniciado a diálise pelo método de HDF online.

3.3. Critérios de Exclusão

Pacientes, acamados, com doenças neurológicas crônico degenerativas, em uso crônico de corticoides, em uso de terapia hormonal tópica ou sistêmica, com obesidade mórbida, portadores de neoplasias em tratamento radio e/ou quimioterápico, com diagnóstico de insuficiência vascular periférica grave, portadores de doenças auto imunes em atividade, em tratamento com imunossupressores, com história de infecção e/ou inflamação recente (<1mês) em uso de antibióticos ou anti-inflamatórios, com infecção pelo vírus da hepatite B e/ou C, HIV, COVID-19 e aqueles que tenham realizado transplante renal.

Figura 6 – Fluxograma de inclusão de pacientes no estudo.

3.4. Características do Tratamento Dialítico

Todas as sessões de HDF foram realizadas pelo método com reposição online pós dilucional, almejando sempre que possível a proporção de 30% do fluxo de sangue. O volume de banho no mínimo 500 mL/min, ajustado de acordo com o sensor adapt flow das máquinas de diálise (Modelo 5008 Fresenius Medical Care®), ajuste automático de acordo com o fluxo de sangue durante a sessão. A duração da diálise e a frequência semanal é ajustada conforme a presença de função renal residual. O capilar utilizado foi o modelo de polissulfona com

esterização à vapor (FX100, Fresenius Medical Care®). Todos os pacientes receberam heparina contínua como anticoagulante durante o procedimento.

A composição da solução de diálise utilizada foi a CPHD com Glicose 23G/44 - Fresenius Medical Care disponível em volumes de 5.000 ou 10.000 mL, com a seguinte composição: pH: 5,2; Glicose: 1,5%, 2,5% e 4,5%; Cálcio: 3,5 mEq/L ou 2,5 mEq/L; Potássio: ZERO mEq/L; Sódio: 132 mEq/L ou 134 mEq/L; Magnésio: 0,5 mEq/L; Cloreto: 96 mEq/L ou 101 mEq/L; Lactato: 40 mEq/L. Temperatura fixada em 36,5 °C podendo variar de acordo com a hemodinâmica do paciente. O acesso vascular utilizado foi fístula arteriovenosa ou cateter tunelizado.

3.5. Avaliação das Toxinas Urêmicas, Marcadores Inflamatórios, Endoteliais e do Distúrbio Mineral Ósseo

Após a coleta de 20 mL de sangue de acordo com o desenho do estudo, as amostras foram centrifugadas e o soro separado e armazenado em freezer 80°C para dosagem dos biomarcadores, conforme segue:

- Avaliação dos biomarcadores inflamatórios: TNF- α , IL-6 e IL-10, por ensaio imunoenzimático (ELISA) e PCR por método automatizado através de kits comerciais;
- Avaliação do biomarcador endotelial: endotelina por ensaio imunoenzimático (ELISA) através de kit comercial;
- Avaliação dos biomarcadores do distúrbio mineral ósseo: Ca, P, PTH, vitamina D por métodos automatizados, esclerostina (SOST), osteopontina (OPN) e FGF-23 por ensaio imunoenzimático (ELISA) através de kits comerciais.
- Indoxil Sulfato (IS), p-cresil Sulfato (PCS) e Ácido Indol Acético (IAA) por HPLC (High-performance liquid chromatography) – cromatografia líquida de alta eficiência.
- Ureia, creatinina, sódio, potássio, glicose, albumina e beta-2 microglobulina, por métodos automatizados através de kits comerciais.

Os dados bioquímicos foram coletados dos prontuários dos pacientes, de acordo com a rotina mensal de exames. Todos os dados foram digitados em planilha excel, com o cuidado de se manter o sigilo e anonimato dos pacientes.

3.6. Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. As variáveis numéricas contínuas foram expressas de acordo com sua distribuição paramétrica ou não paramétrica, em média e desvio padrão ou mediana e percentis (25-75%), respectivamente. Os dados categóricos descritos em valores absolutos e porcentagem da amostra total. A análise entre os tempos foi realizada pelo teste T pareado para as variáveis que apresentaram distribuição paramétrica e pelo teste Wilcoxon para as não paramétricas. A correlação entre as variáveis foi analisada pelo teste de Pearson ou Spearman, quando apropriados.

Um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi estabelecido para os testes estatísticos. As análises foram realizadas pelo software IBM SPSS STATISTICS para Windows (IBM Corp., Armonk, N. Y., U.S.A.) versão 25.

Resultados

4. RESULTADOS

Foram avaliados 31 pacientes em dois momentos, Pré-HDF tempo “0” (T0) no início do tratamento dialítico por HDF e Pós-HDF tempo “6” (T6) após 6 meses de tratamento dialítico por HDF.

Tabela 2 – Dados demográficos, epidemiológicos e clínicos dos pacientes (n=31).

	n=31
Idade (anos)	77,4 ± 7,1
Sexo Feminino, n (%)	11 (35,5)
Doenças de Base, n (%)	
Nefroesclerose Hipertensiva	14 (45,2)
Nefropatia do Diabetes	11 (35,5)
Outras	6 (19,3)
Peso (Kg)	67,5 ± 15,3
Estatura (m)	1,61 ± 0,1
Índice de Massa Corpórea (Kg/m ²)	25,8 ± 5,8
Cálcio (mg/dL)	8,91 ± 1,04
iPTH (pg/mL)	194 (125-432)
25(OH)D (ng/mL)	27 (22-32)
Colesterol (mg/dL)	156 ± 1,6
Creatinina (mg/dL)	7 ± 3
Albumina (g/dL)	3,8 (3,70 – 4,10)
Ferro (µg/dL)	60 ± 31,6
Glicose	134 (111 – 185)
Potássio (mEq/L)	5,1 ± 0,95
Sódio (mEq/L)	139 ± 4,8
Triglicérides (mg/dL)	154 (69 – 231)
Ureia (mg/dL)	143 ± 53,6

iPTH, paratormônio intacto. 25(OH)D, 25 Hidroxi Vitamina D.

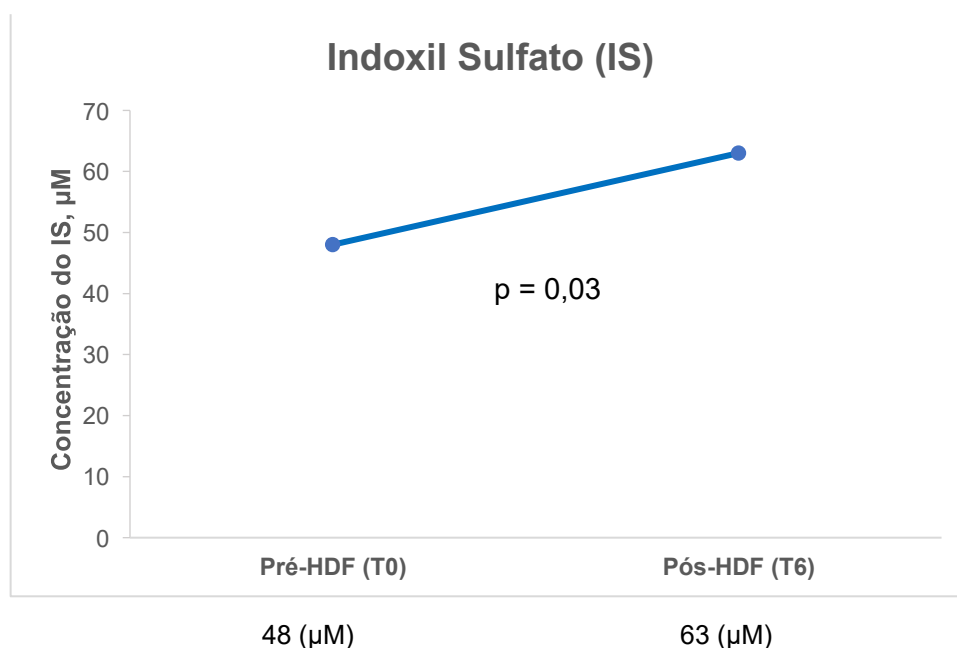
Tabela 3 – Comparação das toxinas urêmicas, dados bioquímicos, biomarcadores do distúrbio mineral ósseo, do endotélio e inflamatório dos pacientes nos tempos pré-HDF (T0) e pós-HDF (T6).

	Pré-HDF (T0)	Pós-HDF (T6)	p
Ácido Indol Acético (µM)	7,87 (5,64-11,1)	8,10 (5,01-10,2)	0,72
Indoxil Sulfato (µM)	69,9 (36,3-86,0)	68,0 (52,7-114)	0,01
p-cresil Sulfato (µM)	187 (131-266)	183 (128-258)	1,00
B2M (ng/mL)	13,3 (11,4-15,3)	17,6 (15,9-23,6)	<0,01
Ureia (mg/dL)	120 (83-148)	160 (139-185)	<0,01
Creatinina (mg/dL)	6,13 ±2,80	7,67 ±3,01	<0,01
Sódio (mEq/L)	139 (137-142)	139 (137-142)	0,92
Potássio (mEq/L)	4,58 ± 0,81	5,41 ±0,92	<0,01
Glicose (mg/dL)	138 (119-190)	121 (108-153)	<0,01
Albumina (g/dL)	3,80 (3,70-4,10)	3,90 (3,70-4,10)	0,65
Cálcio Total (mg/dL)	8,40 (8,10-9,00)	8,80 (8,50-9,50)	0,01
Fósforo (mg/dL)	4,39 ± 1,41	4,81 ± 1,08	0,15
Fosfatase Alcalina (U/L)	81 (66-124)	82 (68-94)	0,11
iPTH (pg/mL)	194 (125-432)	208 (128-284)	0,36
25(OH)D (ng/mL)	27 (22-32)	25,0 (17-29)	0,06
FGF-23 (pg/mL)	40 (2-452)	102 (19-990)	0,05
Esclerostina (ng/mL)	1,09 (0,64-1,38)	0,93 (0,54-1,38)	0,69
Osteopontina (ng/mL)	110 (33-178)	65 (45-149)	0,35
Endotelina (pg/mL)	2,5 (2,1-2,8)	2,8 (2,2-3,3)	0,42
TNF-α (pg/mL)	2,3 (1,9-2,6)	2,0 (1,7-2,7)	0,72
Interleucina-6 (pg/mL)	7,4 (5,5-9,9)	6,4 (5,5-10,3)	0,36
Interleucina-10 (pg/mL)	2,6 (0,1-6,6)	2,3 (1,2-9,7)	0,37
Proteína C Reativa (mg/L)	6,3 (1,9-26,4)	3,8 (1,7-15,5)	0,10

B2M – beta-2 microglobulina, iPTH, paratormônio intacto. 25(OH)D, 25 hidroxí vitamina D. FGF23, fator de crescimento de fibroblastos 23. TNF-α, fator de necrose tumoral alfa. tumoral Alfa.

Quando comparamos as variáveis nos tempos Pré-HDF (T0) e Pós-HDF (T6) considerando as doenças de base dos pacientes, não observamos diferenças entre elas na hipertensão. Entretanto, na diabetes observamos diferença significativa apenas para IS (gráfico 1) as demais variáveis não apresentam diferenças.

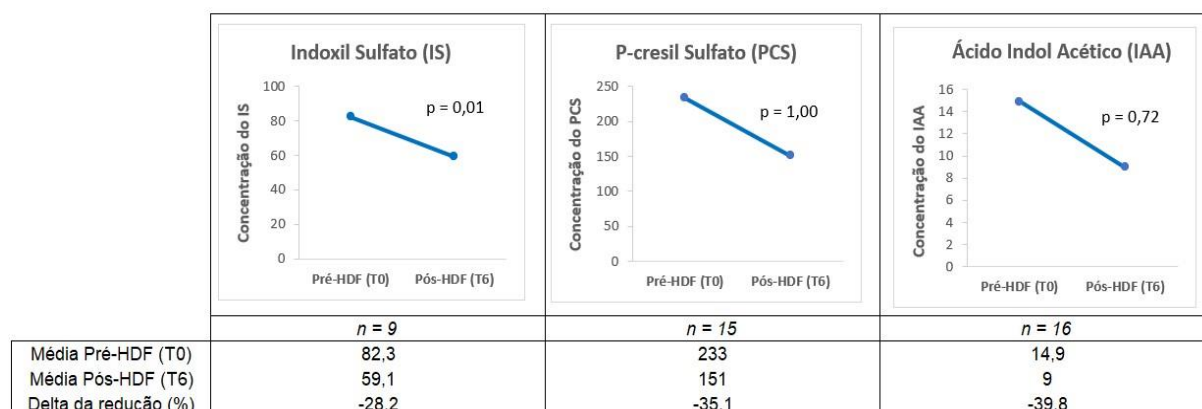
Gráfico 1 – Comparação do IS nos tempos Pré-HDF (T0) e Pós-HDF (T6) nos pacientes diabéticos.



Fonte: Produção do próprio autor. IS, Indoxil Sulfato.

Não observamos diferenças entre as variáveis estudadas nos pacientes que apresentaram redução, significativa ou não, da concentração sérica das toxinas IS, PCS e IAA pós-HDF. O gráfico 2 mostra o número de pacientes que apresentaram redução, a média nos tempos Pré-HDF e Pós-HDF e o delta (%) da redução das respectivas toxinas.

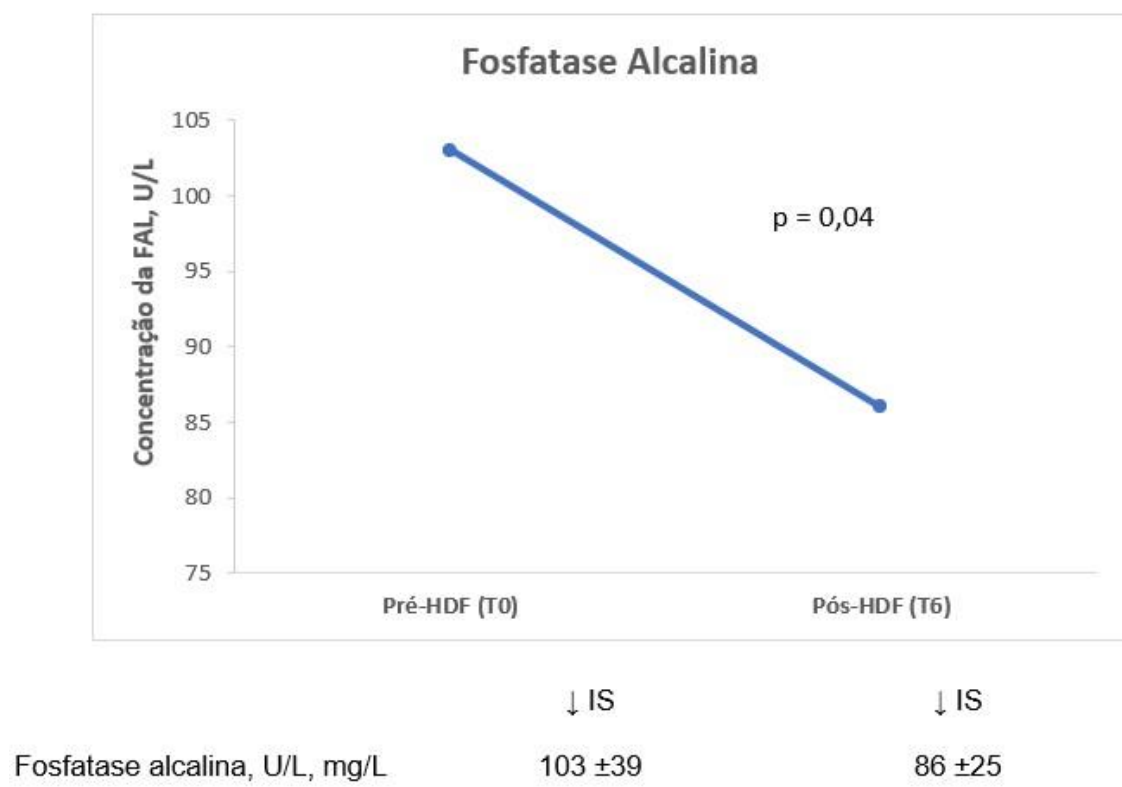
Gráfico 2 – Demonstrativo da redução da concentração sérica das toxinas urêmicas através do delta (%) de uma subpopulação do estudo.



Fonte: Produção do próprio autor.

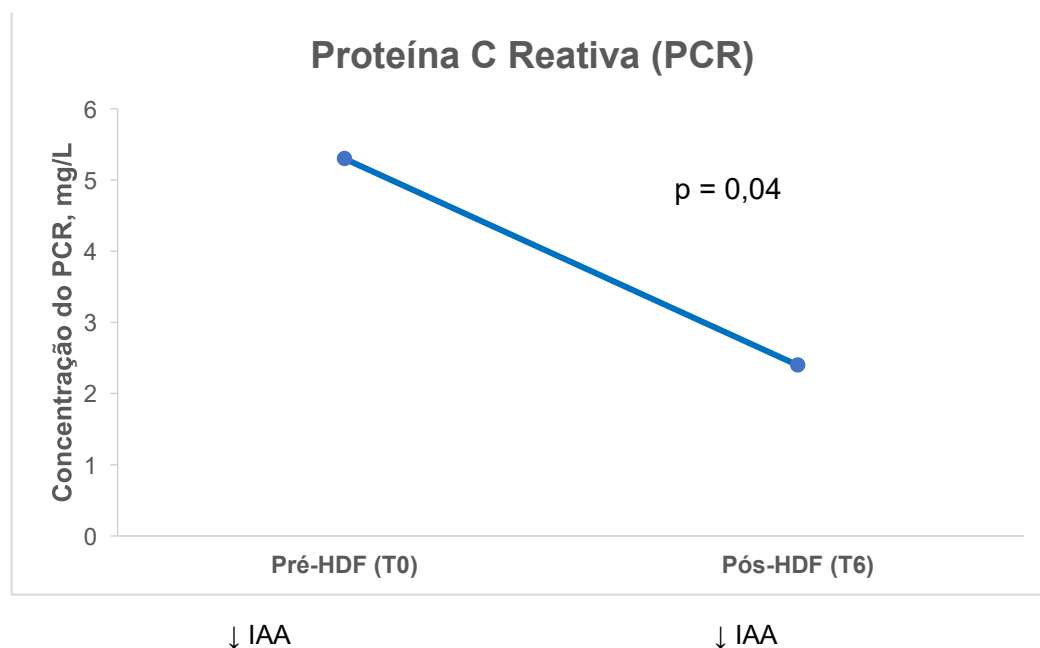
Nas toxinas estudadas os pacientes que apresentaram redução da concentração sérica de IS tiveram menor concentração de Fosfatase Alcalina (gráfico 3) e os pacientes que apresentaram redução da concentração sérica de IAA tiveram menor concentração da PCR (gráfico 4).

Gráfico 3 – Comportamento da fosfatase alcalina nos pacientes que apresentaram redução da concentração sérica de IS ao longo de 6 meses.



Fonte: Produção do próprio autor. FAL, Fosfatase Alcalina.

Gráfico 4 – Comportamento da PCR nos pacientes que apresentaram redução da concentração sérica de IAA ao longo de 6 meses.

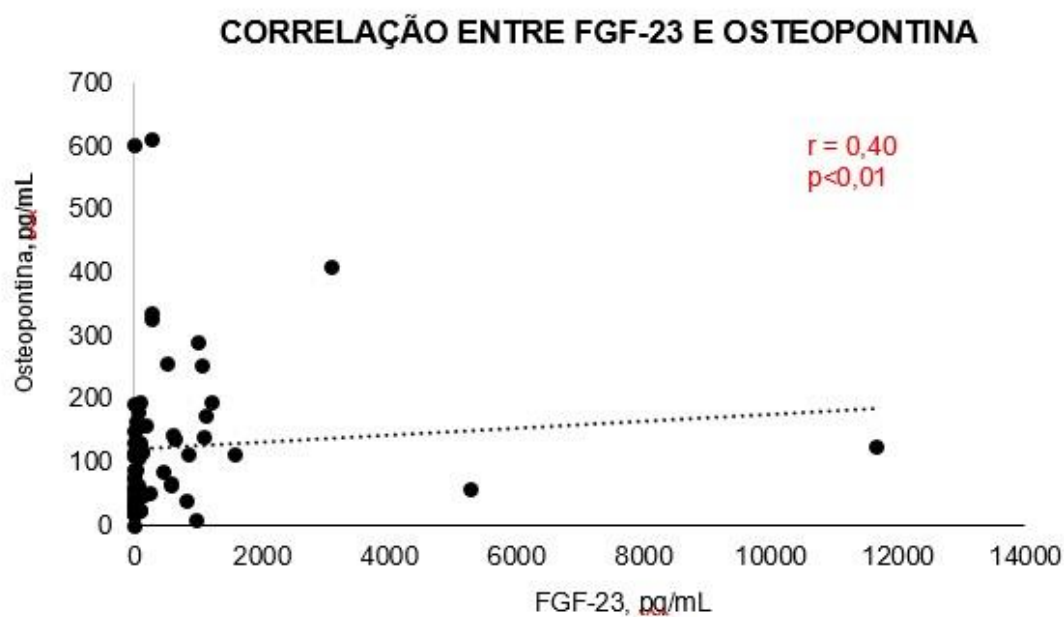


PCR, mg/L 5,30 (1,23-26,0)

2,44 (1,59-11,1)

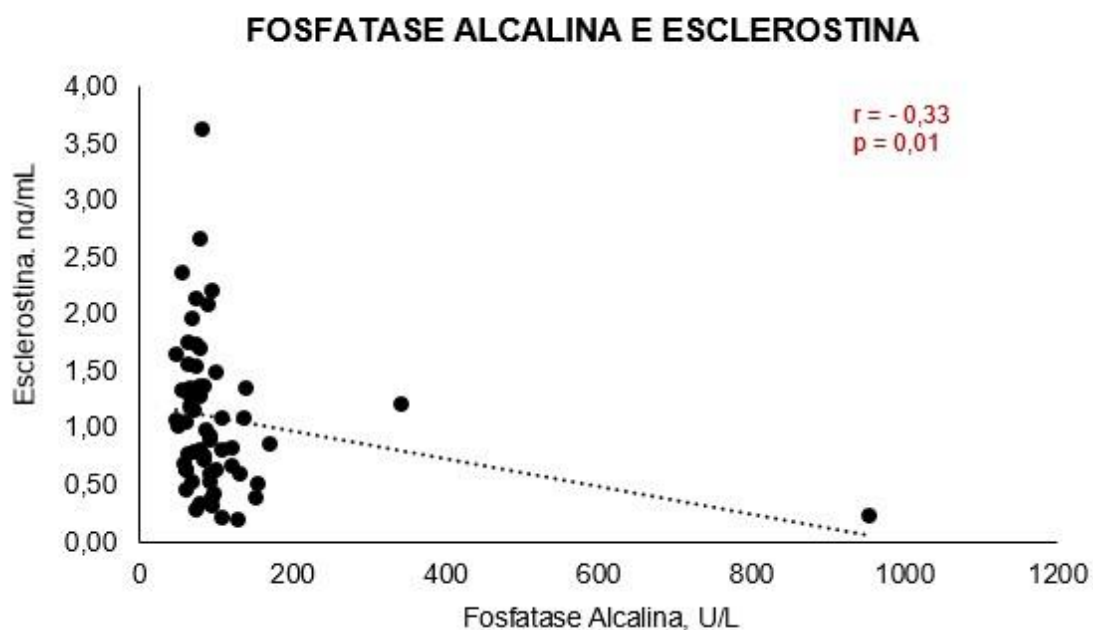
Fonte: Produção do próprio autor. PCR, Proteína C Reativa.

Gráfico 5 – Correlação entre FGF-23 e Osteopontina.



Fonte: Produção do próprio autor.

Gráfico 6 – Correlação entre Fosfatase Alcalina e Esclerostina.



Fonte: Produção do próprio autor.

Como esperado, encontramos correlação positiva entre as toxinas urêmicas IS com B2M ($r = 0,495$ $p < 0,01$), B2M com IAA ($r = 0,311$ $p = 0,03$) e IAA com PCS ($r = 0,377$ $p < 0,01$) entre os biomarcadores de inflamação TNF- α com IL-6 ($r = 0,436$ $p < 0,02$), TNF- α com PCR ($r = 0,438$ $p < 0,01$), IL-6 com PCR ($r = 0,47$ $p < 0,01$) e entre os biomarcadores do distúrbio mineral ósseo, fósforo com iPTH ($r = 0,363$ $p < 0,01$) e FGF-23 com OPN ($r = 0,397$ $p < 0,01$). Também encontramos correlações negativas entre IS com 25(OH)D ($r = -0,353$ $p < 0,01$), cálcio com iPTH ($r = -0,342$ $p < 0,01$) e iPTH com 25(OH)D ($r = -0,33$ $p = 0,01$). Entretanto, não observamos correlações entre os biomarcadores de inflamação com os do distúrbio mineral ósseo nem com a endotelina.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que após 6 meses de tratamento dialítico por HDF pós-dilucional, entre as toxinas avaliadas observamos uma redução de IS em 6 meses, mas não encontramos diferença para PCS e IAA. Também não observamos diferenças entre os marcadores inflamatórios e DMO.

Corroborando com nossos dados, mas em população mais jovem, Panichi et al.⁷⁵ em estudo cross-over com HD versus HDF avaliaram 36 pacientes com

idade média 66,7 anos, por 6 meses e observaram menores concentrações séricas de IS e PCS em HDF.

Meert et al.⁷⁶ confrontaram HDF pré-diluição versus HDF pós-diluição versus hemofiltração em 14 pacientes com idade média 63,5 anos, e observaram que os solutos ligados a proteínas (IS, PCS e IAA) não apresentaram diferenças entre HDF pré versus pós-diluição.

Krieter et al.⁷⁷ em um estudo comparando HD e HDF, observaram uma redução significativa das concentrações plasmáticas de IS livre e total e PCS total com exceção da porção livre de PCS, que não foi significativamente diminuída por ambos os tratamentos. Por sua vez, Thammathiwat et al.⁷⁸ em estudo para comparar a eficácia entre HD e HDF na remoção de toxinas urêmicas (IS, PCS e B2M), não observaram diferenças entre as duas modalidades de diálise. Além disso, Krieter et al.⁷⁹ relatam que mesmo tendo sido observado uma redução sérica dos níveis de IS e PCS superior na HDF, esta redução não se sustentou a longo prazo.

Apesar de somente o IS ter apresentado significante redução da concentração sérica pós 6 meses de HDF, quando avaliamos todos os pacientes (n = 31), observamos que 29% apresentaram um delta de redução no T(6) para IS, 48,4% para PCS e 51,6% de IAA. Entretanto, nessa subpopulação que apresentou redução séricas destas toxinas, não observamos diferença entre as variáveis estudadas (dados não apresentados). Além disso, embora não tenha sido o objetivo do estudo, observamos que os pacientes com Diabetes Mellitus (DM) apresentaram maior concentração sérica de IS, toxina urêmica derivada do triptofano, produzida pelas bactérias intestinais⁸⁰, modificada pelas sulfotransferases no intestino que está diretamente associada à disfunção endotelial e desregulação imune na DRC^{81, 82}.

Vale a pena lembrar que o diabetes é uma doença metabólica que está associada a um microbioma intestinal alterado^{83, 84}, essa alteração é caracterizada por uma menor abundância de bactérias produtoras de butirato⁸⁵. Além disso, fatores dietéticos associados ao tratamento da DM, que envolvem restrições alimentares para controle de glicemia podem afetar diretamente a composição microbiana, responsável por fornecer substrato necessário para catalização de enzimas geradoras de metabólitos⁸⁶, o que poderia justificar o possível aumento nos níveis séricos de IS nesta população. Cheng et al.⁸⁷ no

primeiro relatório a abordar a associação significativa entre os níveis totais de PCS e IS em pacientes com DM2 concluiu, que os níveis séricos totais de PCS e IS estavam aumentados em pacientes com DM2. Adicionalmente Atoh et al.⁸⁸, confirmaram que níveis séricos IS se elevam precocemente em pacientes com nefropatia diabética.

Na subpopulação de pacientes que apresentaram redução na concentração sérica IS, PCS e IAA, não foram observadas diferenças significantes para os biomarcadores de inflamação (TNF- α , IL-6 e IL-10), para os biomarcadores do distúrbio mineral ósseo (cálcio, fósforo, iPTH, 25(OH)D, FGF23, osteopontina e esclerostina) e para o biomarcador endotelial endotelina, por outro lado, a PCR se mostrou diminuída nos pacientes com menor concentração sérica de IAA. O IAA se correlaciona intima e positivamente com a PCR^{17, 89}, fato que poderia explicar os resultados individuais encontrados em nossa sub-análise entre esta toxina e a PCR como variável inflamatória.

Encontramos diferença significativa para B-2 microglobulina, porém com resultados superiores no Pós-HDF T6. Penne et al.⁹⁰ observaram em 406 pacientes tratados por HDF durante 6 meses, uma redução significativa nos níveis séricos da B2M que foi mais acentuada nos pacientes sem FRR em comparação aos pacientes com FRR. Porém, Agbas et al.⁹¹ e Wizemann et al.⁹² observaram redução nos níveis de B2M no tratamento com HDF. Zehnder et al.⁹³ observaram uma maior eliminação de B2M ao comparar 16 pacientes que estavam em HD e foram transferidos para HDF, com base em uma maior remoção no dialisato dos pacientes tratados em HDF, quando comparado com HD, concluindo que a HDF melhorou significativamente a eliminação de B2M.

Em relação ao TNF- α , IL-6, IL-10 e PCR não encontramos diferenças entre os tempos Pré-HDF T0 e o Pós-HDF T6. Embora, todos apresentaram menor concentração sérica 6 meses após o tratamento, sugerindo que a HDF esteja associada a biomarcadores reduzidos de inflamação. Jia et al.⁴¹ demonstraram que a IL-6 foi significativamente reduzida na HDF versus HD e não encontram diferença para a PCR. Panichi et al.²⁵ encontraram níveis reduzidos de IL-6 e PCR nos pacientes tratados com HDF²⁵. Por outro lado, no estudo de Agbas et al.⁹¹ houve redução significativa para o PCR, mas não houve diferença para IL-6 e IL-10. Morad et al.⁹⁴ em uma população pediátrica, avaliaram o efeito de 6 meses de tratamento por HDF sobre os biomarcadores

de inflamação e observaram uma redução significativa para PCR, IL-6 e TNF- α em comparação com a HD. O fato desta população ser pediátrica sugere que o fator idade possa ter impacto na redução destes marcadores quando comparado com população exclusivamente idosa. Corroborando com a hipótese anterior e utilizando metodologia similar à aplicada em nosso trabalho, porém em indivíduos adultos com DRC, Kuo et al.³² avaliaram a redução de citocinas próinflamatórias por meio de HDF em 17 pacientes tratados com HD, que foram colocados em HDF. IL-6, IL18, TNF-a e PCR, foram quantificadas no plasma antes e 6 meses após o início do tratamento HDF.

Neste estudo os níveis plasmáticos de IL-18 e TNF-a, reduziram significativamente em HDF, porém não houve alteração nos níveis de PCR e IL6. As citocinas IL-6 e IL-10, pró-inflamatória e anti-inflamatória, respectivamente, são moléculas de tamanho intermediário, logo devem ser removidas por HDF. Porém resultados conflitantes são relatados em diferentes estudos, em alguns não foi demonstrada diminuição significativa na comparação entre HDF e HD^{95, 96}, outros relatam níveis reduzidos de IL-6^{29, 94, 97} e aumento de IL-10²⁹. Achados como estes, podem sugerir que os marcadores inflamatórios tendem a se comportar de forma diferente em idosos, independente do tratamento aplicado. De fato, sabe-se que o próprio processo natural de envelhecimento é acompanhado por aumentos de 2 a 4 vezes nos níveis séricos e plasmáticos de mediadores inflamatórios, como citocinas e proteínas de fase aguda^{98, 99}.

Em nosso estudo embora não evidenciamos diferença entre T0 e T6 para Endotelina-1 sua concentração sérica foi ligeiramente aumentada após os 6 meses de HDF. Está definido que o aumento da concentração de ET-1 circulante em pacientes em diálise, acompanhado da hiperprodução de ET-1, pode levar ao desenvolvimento de disfunção endotelial¹⁰⁰ levando ao aumento do risco de morbimortalidade cardiovascular em pacientes com DRC¹⁰¹. Entretanto, não há relatos sobre ET-1 em pacientes dialisados por HDF.

Jia et al.⁴¹ avaliaram 20 pacientes comparando HD e HDF onde pareceu sugerir que o HDF de curto prazo pode reduzir a lesão das células endoteliais e melhorar a função endotelial, vale ressaltar que este estudo não avaliou a ET-1. Por outro lado, Rebic et al.¹⁰² em um estudo longitudinal prospectivo por 1 ano, observou após o início do tratamento de diálise peritoneal (DP) redução significativa de Endotelina-1 após 12 meses de tratamento em comparação aos

valores basais. Desta forma, os resultados em relação a remoção de ET-1 por tratamentos dialíticos e seus efeitos permanecem objeto de estudos.

Quanto aos biomarcadores do distúrbio mineral ósseo, observamos um aumento na concentração sérica do cálcio, estatisticamente diferente no PósHDF (T6) em comparação ao Pré-HDF (T0), os demais marcadores, fósforo, iPTH, 25(OH)D, FGF-23, esclerostina e osteopontina não apresentaram diferença.

Karkar et al.¹⁰³ também observaram maior concentração sérica do cálcio pós HDF em estudo de seguimento de 2 anos, mas diferente de nosso estudo, redução significativa nos níveis de fósforo e do iPTH. Este, porém, não foi o objetivo principal do estudo, que focou em qualidade de vida. Pacientes tiveram aumento do cálcio e redução de fósforo e PTH já na transição de HD de baixo fluxo para HD de alto fluxo, com ganho adicional em HDF. Vale ressaltar que o aumento de cálcio por nós observado pós 6 meses, ainda estava dentro dos valores de referência. A não observação de menor concentração de fósforo e PTH no nosso estudo pode ter ocorrido devido as diferenças no perfil de pacientes estudados (no nosso caso especificamente idosos), ao tempo de tratamento por sessão (menor no nosso estudo), ao menor tempo de tratamento por HDF (6 meses) ou ainda por falta de aderência ao tratamento de quelantes de fósforo ou dieta pobre em fósforo, ou ainda uso de medicamentos de tratamento do DMO, que não foram avaliados no presente estudo.

Adicionalmente, Oates et al.¹⁰⁴ em estudo comparando HD (n = 34) *versus* HDF (n = 44) não observaram diferenças para cálcio e iPTH, porém evidenciaram uma redução significativa na concentração sérica do fósforo nos pacientes tratados por HDF, já evidente a partir do terceiro mês de terapia. Vale ressaltar que o tempo de diálise por sessão neste estudo foi de 4 horas.

Não encontramos diferença estatística para o FGF-23 em nosso estudo, no entanto a concentração sérica foi maior após os 6 meses de tratamento com HDF. Corroborando com nosso achado Uhlin et al.¹⁰⁵ em estudo comparando pacientes em HD e transferidos para HDF observaram que o FGF-23 permaneceu inalterado.

Ao contrário, Patrier et al.¹⁰⁶ avaliaram pacientes em HD *versus* pacientes em HDF e diferente de nosso estudo, observaram redução significativa de FGF23 no grupo HDF. Além disso, clearance de FGF-23 e o Kt/V-FGF-23,

póstratamento foram significativamente menores do que os valores pré-tratamento em ambos os grupos. Vale ressaltar que o período de tratamento foi maior e a população estudada foi de pacientes mais jovens do que os do nosso estudo.

Novos biomarcadores associados ao DMO e à inflamação tem sido recentemente descritos na literatura, entre eles a osteopontina (OPN). Adicionalmente, altos níveis de OPN também estão associados ao aumento do risco cardiovascular, especialmente em pacientes com DRC¹⁰⁷. Uhlin et al.¹⁰⁸ avaliaram 35 pacientes por 6, 12 e 24 meses após a mudança de HD para HDF e não observaram diferença significativa para OPN. Observamos correlação entre OPN e o FGF-23, entretanto, não há como avaliar se esta associação é causa efeito para efeitos sobre o osso, já que não fizemos nenhuma análise por biópsia óssea ou exame de imagem.

Nos indivíduos saudáveis a esclerostina diminui a formação óssea inibindo a função dos osteoblastos e promovendo a regulação dos osteoclastos⁶⁴. A concentração sérica da esclerostina está inversamente relacionada à função renal nos indivíduos com DRC, encontra-se especialmente aumentada nos pacientes tratados com HD¹⁰⁹. Nosso estudo apresentou resultados de esclerostina menores após 6 meses de tratamento por HDF, porém, não significativos. Corroborando com o nosso resultado Lips et al.⁶¹ observaram que a esclerostina está diminuída nos pacientes tratados por HDF versus HD. Eles também avaliaram a HDF por tercís de volume de convecção (baixo, médio e alto) e observaram no decorrer de um ano uma redução nos níveis esclerostina quanto maior o volume de convecção concluindo que esta redução depende da magnitude do volume de convecção.

Observamos uma correlação negativa entre esclerostina e fosfatase alcalina, embora tenhamos analisado a fosfatase alcalina total, sabe-se que em condições normais as formas óssea e hepática são predominantes na circulação (90% do total), a forma intestinal também circula em concentrações significativas, porém representa menos de 5% do total¹¹⁰. Durante a formação óssea, antes da mineralização ocorre a fase de produção de matriz colágena que coincide com maior produção de fosfatase alcalina decorrente da alteração na diferenciação dos osteoblastos, caracterizando a FA como marcador de formação óssea¹¹¹. Sendo a esclerostina um marcador de reabsorção óssea poderia explicar a correlação encontrada.

Nosso estudo apresenta algumas limitações, dentre elas: 1 - as dosagens das toxinas urêmicas, biomarcadores de inflamação, endotélio e distúrbio mineral ósseo foram avaliados apenas no soro e não no dialisato, impossibilitando o cálculo da depuração das substâncias por HDF; 2 - falta de dados da função renal residual e K/tV por sessão, que poderiam fornecer informações para melhor ajuste quanto a eficiência da HDF e seus efeitos sobre os biomarcadores.

Em resumo, esse estudo prospectivo observacional em população idosa, é o primeiro estudo que mostrou que a terapia renal substitutiva por HDF diminuiu a concentração sérica da toxina urêmica indoxil sulfato nesta população. Embora a literatura ainda apresente resultados conflitantes sobre os efeitos da HDF, os estudos que descrevem efeitos benéficos quanto a modulação de biomarcadores inflamatórios e possível impacto sobre desfechos clínicos em pacientes com DRC são observados em população mais jovem, diferentemente do nosso estudo. Embora não tenhamos observado efeito na redução da concentração sérica dos biomarcadores de inflamação, da endotelina e dos biomarcadores do distúrbio mineral ósseo, a observação da diminuição do IS a longo prazo, pode ter efeito sobre desfechos clínicos nesta população idosa. Entretanto, essa hipótese deve ser avaliada em estudos futuros.

6. CONCLUSÃO

A HDF reduziu os níveis sérico da toxina urêmica indoxil sulfato em população idosa e não teve efeito na redução dos biomarcadores inflamatórios e de distúrbio mineral ósseo e vascular.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2020;395(10225):709-33.
2. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2006;69(11):1945-53.
3. Archibald G, Bartlett W, Brown A, Christie B, Elliott A, Griffith K, et al. UK Consensus Conference on Early Chronic Kidney Disease--6 and 7 February 2007. *Nephrol Dial Transplant*. 22. England 2007. p. 2455-7.
4. Nasri H. World Kidney Day 2014; Chronic Kidney Disease and Aging: A Global Health Alert. *Iran J Public Health*. 2014;43(1):126-7.
5. Kikuchi K, Itoh Y, Tateoka R, Ezawa A, Murakami K, Niwa T. Metabolomic analysis of uremic toxins by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(20):1662-8.
6. De Smet R, David F, Sandra P, Van Kaer J, Lesaffer G, Dhondt A, et al. A sensitive HPLC method for the quantification of free and total p-cresol in patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta*. 1998;278(1):1-21.
7. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(7):1258-70.
8. Barreto FC, Stinghen AE, de Oliveira RB, Franco AT, Moreno AN, Barreto DV, et al. The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins. *J Bras Nefrol*. 2014;36(2):221-35.
9. Niwa T. Indoxyl Sulfate Is a Nephro-Vascular Toxin. *Journal of Renal Nutrition*. 2010;20(5, Supplement):S2-S6.
10. Wang WJ, Cheng MH, Sun MF, Hsu SF, Weng CS. Indoxyl sulfate induces renin release and apoptosis of kidney mesangial cells. *J Toxicol Sci*. 2014;39(4):637-43.
11. Boelaert J, Lynen F, Glorieux G, Eloit S, Van Landschoot M, Waterloos MA, et al. A novel UPLC-MS-MS method for simultaneous determination of seven uremic retention toxins with cardiovascular relevance in chronic kidney disease patients. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(6):1937-47.

12. Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, Nagler EV, Glorieux G. The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. J Am Soc Nephrol. 2014;25(9):1897-907.

13. Meert N, Schepers E, Glorieux G, Van Landschoot M, Goeman JL, Waterloos MA, et al. Novel method for simultaneous determination of p-cresylsulphate and p-cresylglucuronide: clinical data and pathophysiological implications. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(6):2388-96.
14. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, et al. pCresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int*. 2013;83(4):582-92.
15. Jourde-Chiche N, Dou L, Cerini C, Dignat-George F, Vanholder R, Brunet P. Protein-bound toxins--update 2009. *Semin Dial*. 2009;22(4):334-9.
16. Fernandez-Prado R, Esteras R, Perez-Gomez MV, Gracia-Iguacel C, Gonzalez-Parra E, Sanz AB, et al. Nutrients Turned into Toxins: Microbiota Modulation of Nutrient Properties in Chronic Kidney Disease. *Nutrients*. 2017;9(5).
17. Dou L, Sallée M, Cerini C, Poitevin S, Gondouin B, Jourde-Chiche N, et al. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(4):876-87.
18. Lee CT, Hsu CY, Tain YL, Ng HY, Cheng BC, Yang CC, et al. Effects of AST-120 on blood concentrations of protein-bound uremic toxins and biomarkers of cardiovascular risk in chronic dialysis patients. *Blood Purif*. 2014;37(1):76-83.
19. Lin CJ, Chuang CK, Jayakumar T, Liu HL, Pan CF, Wang TJ, et al. Serum p-cresyl sulfate predicts cardiovascular disease and mortality in elderly hemodialysis patients. *Arch Med Sci*. 2013;9(4):662-8.
20. Meijers BK, Van Kerckhoven S, Verbeke K, Dehaen W, Vanrenterghem Y, Hoylaerts MF, et al. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. *Am J Kidney Dis*. 2009;54(5):891-901.
21. Locatelli F, Manzoni C, Viganò S, Cavalli A, Di Filippo S. Hemodiafiltration - state of the art. *Contrib Nephrol*. 2011;168:5-18.
22. Locatelli F, Manzoni C, Del Vecchio L, Cavalli A, Pontoriero G. Recent trials on hemodiafiltration. *Contrib Nephrol*. 2011;171:92-100.
23. den Hoedt CH, Mazairac AHA, van den Dorpel MA, Grooteman MPC, Blankestijn PJ. Effect of hemodiafiltration on mortality, inflammation and quality of life. *Contrib Nephrol*. 2011;168:39-52.

24. Lin CL, Huang CC, Yu CC, Yang HY, Chuang FR, Yang CW. Reduction of advanced glycation end product levels by on-line hemodiafiltration in long-term hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2003;42(3):524-31.
25. Panichi V, Rizza GM, Paoletti S, Bigazzi R, Aloisi M, Barsotti G, et al. Chronic inflammation and mortality in haemodialysis: effect of different renal replacement therapies. Results from the RISCAVID study. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(7):2337-43.
26. Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16 Suppl 1:S83-8.
27. Zoccali C, Tripepi G, Mallamaci F. Predictors of cardiovascular death in ESRD. *Semin Nephrol*. 2005;25(6):358-62.
28. Vilar E, Fry AC, Wellsted D, Tattersall JE, Greenwood RN, Farrington K. Long-term outcomes in online hemodiafiltration and high-flux hemodialysis: a comparative analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(12):1944-53.
29. Panichi V, Manca-Rizza G, Paoletti S, Taccola D, Consani C, Filippi C, et al. Effects on inflammatory and nutritional markers of haemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate (HFR) vs online haemodiafiltration: a crossover randomized multicentre trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(3):756-62.
30. Seino Y, Ikeda U, Ikeda M, Yamamoto K, Misawa Y, Hasegawa T, et al. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine*. 1994;6(1):87-91.
31. Liu Y, Berthier-Schaad Y, Fallin MD, Fink NE, Tracy RP, Klag MJ, et al. IL6 haplotypes, inflammation, and risk for cardiovascular disease in a multiethnic dialysis cohort. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(3):863-70.
32. Kuo HL, Chou CY, Liu YL, Yang YF, Huang CC, Lin HH. Reduction of proinflammatory cytokines through hemodiafiltration. *Ren Fail*. 2008;30(8):796-800.
33. den Hoedt CH, Bots ML, Grooteman MP, van der Weerd NC, Mazairac AH, Penne EL, et al. Online hemodiafiltration reduces systemic inflammation compared to low-flux hemodialysis. *Kidney Int*. 2014;86(2):423-32.
34. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med*. 2002;8(11):1218-26.

35. Eleftheriadis T, Antoniadi G, Liakopoulos V, Kartsios C, Stefanidis I. Disturbances of acquired immunity in hemodialysis patients. *Semin Dial*. 2007;20(5):440-51.
36. Girndt M, Sester U, Sester M, Kaul H, Köhler H. Impaired cellular immune function in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(12):2807-10.
37. França CN, Izar MC, Amaral JB, Tegani DM, Fonseca FA. Microparticles as potential biomarkers of cardiovascular disease. *Arq Bras Cardiol*. 2015;104(2):169-74.
38. Vanholder R, De Smet R, Hsu C, Vogeleere P, Ringoir S. Uremic toxicity: the middle molecule hypothesis revisited. *Semin Nephrol*. 1994;14(3):205-18.
39. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332(6163):411-5.
40. Kitamura K, Tanaka T, Kato J, Ogawa T, Eto T, Tanaka K. Immunoreactive endothelin in rat kidney inner medulla: marked decrease in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;162(1):38-44.
41. Jia P, Jin W, Teng J, Zhang H, Zou J, Liu Z, et al. Acute Effects of Hemodiafiltration Versus Conventional Hemodialysis on Endothelial Function and Inflammation: A Randomized Crossover Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(16):e3440.
42. Calò LA, Naso A, Davis PA, Pagnin E, Corradini R, Tommasi A, et al. Hemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate: effect on hemeoxygenase-1 and inducible subunit of nitric oxide synthase and implication for oxidative stress and inflammation. *Artif Organs*. 2011;35(2):183-7.
43. Reichel H, Deibert B, Schmidt-Gayk H, Ritz E. Calcium metabolism in early chronic renal failure: implications for the pathogenesis of hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 1991;6(3):162-9.
44. Charytan DM, Fishbane S, Malyszko J, McCullough PA, Goldsmith D. Cardiorenal Syndrome and the Role of the Bone-Mineral Axis and Anemia. *Am J Kidney Dis*. 2015;66(2):196-205.
45. Cunningham J, Locatelli F, Rodriguez M. Secondary hyperparathyroidism: pathogenesis, disease progression, and therapeutic options. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(4):913-21.

46. Ix JH, Katz R, Kestenbaum BR, de Boer IH, Chonchol M, Mukamal KJ, et al. Fibroblast growth factor-23 and death, heart failure, and cardiovascular events in community-living individuals: CHS (Cardiovascular Health Study). *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(3):200-7.
47. Singh S, Grabner A, Yanucil C, Schramm K, Czaya B, Krick S, et al. Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2016;90(5):985-96.
48. Jean G, Souberbielle JC, Chazot C. Vitamin D in Chronic Kidney Disease and Dialysis Patients. *Nutrients*. 2017;9(4).
49. Kim SM, Choi HJ, Lee JP, Kim DK, Oh YK, Kim YS, et al. Prevalence of vitamin D deficiency and effects of supplementation with cholecalciferol in patients with chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2014;24(1):20-5.
50. Leyssens C, KU Leuven CaEM, Leuven, Belgium, carlien.leyssens@med.kuleuven.be, Verlinden L, KU Leuven CaEM, Leuven, Belgium, lieve.verlinden@med.kuleuven.be, et al. The future of vitamin D analogs. *Frontiers in Physiology*. 2014;5.
51. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2302-9.
52. Vervloet M, Cozzolino M. Vascular calcification in chronic kidney disease: different bricks in the wall? *Kidney Int*. 2017;91(4):808-17.
53. Uhlig K, Berns JS, Kestenbaum B, Kumar R, Leonard MB, Martin KJ, et al. KDOQI US commentary on the 2009 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of CKD-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Am J Kidney Dis*. 2010;55(5):773-99.
54. Bover J, Ureña P, Aguilar A, Mazzaferro S, Benito S, López-Báez V, et al. Alkaline Phosphatases in the Complex Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorders. *Calcif Tissue Int*. 2018;103(2):111-24.
55. Bover J, Ureña-Torres P, Cozzolino M, Rodríguez-García M, GómezAlonso C. The Non-invasive Diagnosis of Bone Disorders in CKD. *Calcif Tissue Int*. 2021;108(4):512-27.
56. Gracioli FG, Neves KR, Barreto F, Barreto DV, Dos Reis LM, Canziani ME, et al. The complexity of chronic kidney disease-mineral and bone disorder across stages of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2017;91(6):1436-46.

57. Crisafulli A, Romeo A, Floccari F, Aloisi E, Atteritano M, Cincotta M, et al. Osteoprotegerin and bone mineral density in hemodiafiltration patients. *Ren Fail.* 2005;27(5):531-9.
58. Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem.* 2018;59:17-24.
59. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *Faseb j.* 1993;7(15):1475-82.
60. Mazzaferro S, Bagordo D, De Martini N, Pasquali M, Rotondi S, Tartaglione L, et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Bone in Chronic Kidney Disease in the Osteoimmunology Era. *Calcif Tissue Int.* 2021;108(4):452-60.
61. Lips L, de Roij van Zuijdewijn CLM, Ter Wee PM, Bots ML, Blankestijn PJ, van den Dorpel MA, et al. Serum sclerostin: relation with mortality and impact of hemodiafiltration. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(7):1217-23.
62. Chellaiah MA, Hruska KA. The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int.* 2003;72(3):197-205.
63. Abdalrhim AD, Marroush TS, Austin EE, Gersh BJ, Solak N, Rizvi SA, et al. Plasma Osteopontin Levels and Adverse Cardiovascular Outcomes in the PEACE Trial. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156965.
64. Moester MJ, Papapoulos SE, Lowik CW, van Bezooijen RL. Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int.* 2010;87(2):99-107.
65. Stegen S, Stockmans I, Moermans K, Thienpont B, Maxwell PH, Carmeliet P, et al. Osteocytic oxygen sensing controls bone mass through epigenetic regulation of sclerostin. *Nat Commun.* 92018.
66. Canalis E. Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(10):575-83.
67. Qadir AS, Lee HL, Baek KH, Park HJ, Woo KM, Ryoo HM, et al. Msx2 is required for TNF-alpha-induced canonical Wnt signaling in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;408(3):399-404.
68. Vincent C, Findlay DM, Welldon KJ, Wijenayaka AR, Zheng TS, Haynes DR, et al. Pro-inflammatory cytokines TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNFalpha induce the mitogen-activated protein kinase (MAPK)dependent expression of sclerostin in human osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2009;24(8):1434-49.

69. Milovanova LY, Dobrosmyslov IA, Milovanov YS, Taranova MV, Kozlov VV, Milovanova SY, et al. Fibroblast growth factor-23 (FGF-23) / soluble Klotho protein (sKlotho) / sclerostin glycoprotein ratio disturbance is a novel risk factor for cardiovascular complications in ESRD patients receiving treatment with regular hemodialysis or hemodiafiltration. *Ter Arkh.* 2018;90(6):48-54.
70. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* 2000;50(3):184-95.
71. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(2).
72. Wei H, Li B, Sun A, Guo F. Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1172:79-96.
73. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem.* 2004;279(47):48487-90.
74. Cuschieri S. The STROBE guidelines. *Saudi J Anaesth.* 2019;13(Suppl 1):S31-s4.
75. Panichi V, Rocchetti MT, Scatena A, Rosati A, Migliori M, Pizzarelli F, et al. Long term variation of serum levels of uremic toxins in patients treated by postdilution high volume on-line hemodiafiltration in comparison to standard low-flux bicarbonate dialysis: results from the REDERT study. *J Nephrol.* 2017;30(4):58391.
76. Meert N, Eloot S, Waterloos MA, Van Landschoot M, Dhondt A, Glorieux G, et al. Effective removal of protein-bound uraemic solutes by different convective strategies: a prospective trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(2):562-70.
77. Krieter DH, Hackl A, Rodriguez A, Chenine L, Moragues HL, Lemke HD, et al. Protein-bound uraemic toxin removal in haemodialysis and post-dilution haemodiafiltration. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(1):212-8.
78. Thammathiwat T, Tiranathanagul K, Limjariyakul M, Chariyavilaskul P, Takkavatakarn K, Susantitaphong P, et al. Super high-flux hemodialysis provides comparable effectiveness with high-volume postdilution online hemodiafiltration in removing protein-bound and middle-molecule uremic toxins: A prospective cross-over randomized controlled trial. *Ther Apher Dial.* 2021;25(1):73-81.
79. Krieter DH, Kerwagen S, R  th M, Lemke HD, Wanner C. Differences in Dialysis Efficacy Have Limited Effects on Protein-Bound Uremic Toxins Plasma Levels over Time. *Toxins (Basel).* 2019;11(1).

80. Meijers BK, Evenepoel P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. *Nephrol Dial Transplant*. 26. England 2011. p. 759-61.
81. Raff AC, Meyer TW, Hostetter TH. New insights into uremic toxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(6):560-5.
82. De Smet R, Dhondt A, Eloot S, Galli F, Waterloos MA, Vanholder R. Effect of the super-flux cellulose triacetate dialyser membrane on the removal of nonprotein-bound and protein-bound uraemic solutes. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(7):2006-12.
83. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013;498(7452):99-103.
84. Wu H, Tremaroli V, Schmidt C, Lundqvist A, Olsson LM, Krämer M, et al. The Gut Microbiota in Prediabetes and Diabetes: A Population-Based CrossSectional Study. *Cell Metab*. 2020;32(3):379-90.e3.
85. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490(7418):55-60.
86. Schroeder BO, Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. 2016;22(10):1079-89.
87. Chiu CA, Lu LF, Yu TH, Hung WC, Chung FM, Tsai IT, et al. Increased levels of total P-Cresylsulphate and indoxyl sulphate are associated with coronary artery disease in patients with diabetic nephropathy. *Rev Diabet Stud*. 2010;7(4):275-84.
88. Atoh K, Itoh H, Haneda M. Serum indoxyl sulfate levels in patients with diabetic nephropathy: relation to renal function. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009;83(2):220-6.
89. Borges NA, Barros AF, Nakao LS, Dolenga CJ, Fouque D, Mafra D. Protein-Bound Uremic Toxins from Gut Microbiota and Inflammatory Markers in Chronic Kidney Disease. *Journal of Renal Nutrition*. 2016;26(6):396-400.
90. Penne EL, van der Weerd NC, Blankestijn PJ, van den Dorpel MA, Grooteman MP, Nubé MJ, et al. Role of residual kidney function and convective volume on change in beta2-microglobulin levels in hemodiafiltration patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(1):80-6.

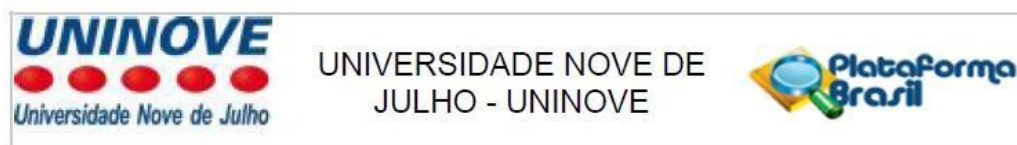
91. Ağbaş A, Canpolat N, Çalışkan S, Yılmaz A, Ekmekçi H, Mayes M, et al. Hemodiafiltration is associated with reduced inflammation, oxidative stress and improved endothelial risk profile compared to high-flux hemodialysis in children. PLoS One. 2018;13(6):e0198320.
92. Wizemann V, Lotz C, Techert F, Uthoff S. On-line haemodiafiltration versus low-flux haemodialysis. A prospective randomized study. Nephrol Dial Transplant. 2000;15 Suppl 1:43-8.
93. Zehnder C, Gutzwiller JP, Renggli K. Hemodiafiltration--a new treatment option for hyperphosphatemia in hemodialysis patients. Clin Nephrol. 1999;52(3):152-9.
94. Morad AA, Bazaraa HM, Abdel Aziz RE, Abdel Halim DA, Shoman MG, Saleh ME. Role of online hemodiafiltration in improvement of inflammatory status in pediatric patients with end-stage renal disease. Iran J Kidney Dis. 2014;8(6):481-5.
95. Filiopoulos V, Hadjiyannakos D, Metaxaki P, Sideris V, Takouli L, Anogiati A, et al. Inflammation and oxidative stress in patients on hemodiafiltration. Am J Nephrol. 2008;28(6):949-57.
96. Vaslaki LR, Berta K, Major L, Weber V, Weber C, Wojke R, et al. On-line hemodiafiltration does not induce inflammatory response in end-stage renal disease patients: results from a multicenter cross-over study. Artif Organs. 2005;29(5):406-12.
97. Carracedo J, Merino A, Nogueras S, Carretero D, Berdud I, Ramírez R, et al. On-line hemodiafiltration reduces the proinflammatory CD14+CD16+ monocyte-derived dendritic cells: A prospective, crossover study. J Am Soc Nephrol. 2006;17(8):2315-21.
98. Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. Exp Gerontol. 2004;39(5):687-99.
99. Brüunsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. Immunol Allergy Clin North Am. 2003;23(1):15-39.
100. Liu H, Peng Y, Liu F, Liu Y, Ouyang L, Xiao W, et al. Correlation between endothelin-1 and atherosclerosis in chronic hemodialysis patients. J Nephrol. 2010;23(5):593-602.
101. Ochodnický P, Vettoretti S, Henning RH, Buikema H, Van Dokkum RP, de Zeeuw D. Endothelial dysfunction in chronic kidney disease: determinant of susceptibility to end-organ damage and therapeutic response. J Nephrol. 2006;19(3):246-58.

102. Rebic D, Rasic S, Rebic V. Influence of endothelin-1 and nitric oxide on left ventricular remodelling in patients on peritoneal dialysis. *Ren Fail.* 2014;36(2):232-6.
103. Karkar A, Abdelrahman M, Locatelli F. A Randomized Trial on HealthRelated Patient Satisfaction Level with High-Efficiency Online Hemodiafiltration versus High-Flux Dialysis. *Blood Purif.* 2015;40(1):84-91.
104. Oates T, Pinney JH, Davenport A. Haemodiafiltration versus high-flux haemodialysis: Effects on phosphate control and erythropoietin response. *Am J Nephrol.* 2011;33(1):70-5.
105. Uhlin F, Magnusson P, Larsson TE, Fernström A. In the backwater of convective dialysis: decreased 25-hydroxyvitamin D levels following the switch to online hemodiafiltration. *Clin Nephrol.* 2015;83(6):315-21.
106. Patrier L, Dupuy AM, Granger Vallée A, Chalabi L, Morena M, Canaud B, et al. FGF-23 removal is improved by on-line high-efficiency hemodiafiltration compared to conventional high flux hemodialysis. *J Nephrol.* 2013;26(2):342-9.
107. Lorenzen J, Krämer R, Kliem V, Bode-Boeger SM, Veldink H, Haller H, et al. Circulating levels of osteopontin are closely related to glomerular filtration rate and cardiovascular risk markers in patients with chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest.* 2010;40(4):294-300.
108. Uhlin F, Fernström A, Knapen MHJ, Vermeer C, Magnusson P. Long-term follow-up of biomarkers of vascular calcification after switch from traditional hemodialysis to online hemodiafiltration. *Scand J Clin Lab Invest.* 2019;79(3):174-81.
109. Pelletier S, Dubourg L, Carlier MC, Hadj-Aissa A, Fouque D. The relation between renal function and serum sclerostin in adult patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(5):819-23.
110. Vieira JGH, Paulo UFdS. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2021;43:415-22.
111. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev.* 1993;14(4):424-42.

Anexos

8. ANEXOS

Anexo 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DA HEMODIAFILTRAÇÃO (HDF) E LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI) EM IDOSOS COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

Pesquisador: Rosilene Motta Elias

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 97475918.5.0000.5511

Instituição Proponente: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.962.842

Apresentação do Projeto:

Informações extraídas do documento PB_informações_basicasdoprojeto_1206352.pdf de 03/10/2018. "A prevalência da doença renal crônica (DRC) varia entre 1,7% a 8,1%, com prevalência média estimada de 5,6% na população geral, mas já é hoje reconhecida como tendo grande impacto na saúde pública em idosos, afetando até 11% dessa população. O diagnóstico de DRC crônica é feito mediante um ritmo de filtração glomerular (RFG) diminuído por pelo menos 3 meses e alterações estruturais renal de maneira definitiva e irreversível. Em caso de um paciente com sintomas clássicos de uremia, como náuseas, vômitos, inapetência, perda de peso, desnutrição, além de dificuldade de controle volêmico mesmo após ajuste de doses de diuréticos, não há dúvidas sobre a indicação de terapia renal substitutiva. Da mesma forma, na presença de anormalidades eletrolíticas como hiperpotassemia refratária e acidose em pacientes com função renal comprometida, a terapia renal substitutiva está indicada. Os métodos de diálise que podem ser oferecidos ao paciente com DRC são a hemodiálise e a diálise peritoneal. A hemodiálise (HD) em geral é realizada por cerca de 90% dos pacientes. A maior parte dos pacientes realiza a hemodiálise conhecida como "convencional", onde são realizadas 3 sessões semanais com duração média de 4h. Este tipo de diálise porém leva a grandes flutuações de peso, osmolaridade e concentração de ureia e eletrólitos e portanto, efeitos adversos. Além disso, este tipo de diálise não remove todas as substâncias tóxicas (toxinas urêmicas); principalmente aquelas com peso molecular médio ou ligadas a proteínas. O acúmulo destas no plasma dos pacientes em HD tem



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE



Continuação do Parecer: 2.962.842

pode favorecer a inflamação, trombose, vasoconstrição e formação aterosclerótica. Além do endotélio, a desregulação de monócitos, neutrófilos e linfócitos e suas associações com inflamação e efeitos vasculares têm sido estudadas nos pacientes com DRC em hemodiálise convencional. O distúrbio mineral ósseo (DMO) também é uma complicação comum no cenário clínico da DRC. Além do complexo mecanismo do eixo Ca, P, PTH e FGF-23, a relação entre inflamação e o DMO na DRC já é conhecida há alguns anos, pois a presença de hiperfosfatemia, hipovitaminose D ou hiperparatireoidismo pode agravar as alterações vasculares, com lesão de células endoteliais e calcificação vascular, induzidas pela inflamação e maior risco de DCV. Diante do estado de inflamação e seus efeitos na DRC, a busca de várias estratégias terapêuticas em conjunto têm sido buscadas. Nos últimos anos, a laserterapia com o uso do laser de baixa intensidade (LBI) tem sido amplamente utilizada em muitas situações clínicas por produzir um efeito anti-inflamatório local e sistêmico; demonstrando que esta terapia não invasiva e segura, ainda por mecanismos desconhecidos; tem impacto favorável na modulação de processos inflamatórios. Entretanto, o estudo do efeito anti-inflamatório de LBI na população com DRC nunca não foi investigado. Portanto, o estudo de novas abordagens de tratamento, como Hemodiafiltração e LBI, podem ter efeitos benéficos sobre a sarcopenia, desnutrição, inflamação sistêmica e endotelial e ainda sobre o impacto da inflamação sobre o distúrbio mineral ósseo, principalmente nos idosos com DRC; o que pode contribuir para menor eventos de possivelmente devido à remoção mais eficaz de maiores solutos e de fluidos. Apenas 1 dos 3 maiores DCV e mortalidade. Desta forma o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da HDF no idoso com DRC nos seguintes aspectos: Fatores inflamatórios, endoteliais e sobre o distúrbio mineral ósseo, fatores nutricionais e sarcopenia e atividade funcional. Para isto, neste estudo prospectivo observacional serão selecionados 30 pacientes idosos (65 anos) em HD que se iniciará no tratamento por HDF, onde serão seguidos por 0, 3 e 6 meses e estudados os marcadores: Medida Circunferência Coxa, DEXA – densitometria óssea, Questionário funcional (DASI); Coleta de 20 mL de sangue para marcadores de sarcopenia (Miostatina, IGF-1, NF-KB); marcadores Inflamatórios (IL-6, TNF-, IL17 e IL-10, PCR; marcadores de Avaliação Endotelial (Micropartículas endoteliais e plaquetárias e VEGF); Marcadores da imunidade (Neutrófilos, monócitos e linfócitos); marcadores do distúrbio mineral ósseo (Ca, P, PTH, vitamina D, Esclerostina (SOST), FGF-23 e klotho, pelas técnicas de citometria de fluxo e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Para o tratamento com laserterapia, 15 pacientes idosos (65 anos) em HD serão submetidos a aplicação do LBI na região da boca, na área sublingual por 60 segundos, 3x/semana antes do início da sessão de HD no período total de 4 semanas (12 sessões). Após o período de 12 sessões de intervenção com o LBI (tempo 12), serão coletados novamente 20 mL de sangue para a mesma avaliação laboratorial:

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9010

E-mail: comitedeetica@uninove.br

Página 03 de 08



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE



Continuação do Parecer: 2.962.842

marcadores Inflamatórios (IL-6, TNF-, IL17 e IL-10, PCR; marcadores de Avaliação Endotelial (Micropartículas endoteliais e plaquetárias e VEGF); Marcadores da imunidade (Neutrófilos, monócitos e linfócitos); marcadores do distúrbio mineral ósseo (Ca, P, PTH, vitamina D, Esclerostina (SOST), FGF-23 e klotho."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Consiste na avaliação dos efeitos da HDF no idoso com DRC nos seguintes aspectos:

1. Fatores inflamatórios, endoteliais e sobre o distúrbio mineral ósseo
2. Fatores nutricionais e sarcopenia
3. Atividade funcional

Objetivo Secundário:

1. Comparar resultados do método de imagem com o padrão considerado ouro - densitometria com dupla emissão de RX (DXA)
2. Identificação precoce de pacientes com pré sarcopenia e sarcopenia, avaliando o efeito da HDF
3. Identificar pacientes com perda de força e/ou funcionalidade avaliando o efeito da HDF
4. Identificar pacientes desnutridos e propor suplementação nutricional intra-dialítica objetivando uma intervenção nutricional e reabilitação mais precoce e ativa, avaliando o efeito da HDF
5. Avaliação do perfil inflamatório do indivíduo idoso submetido à HDF e o efeito desta terapia nos marcadores de citocinas pró-inflamatórias, marcadores de lesão endotelial e marcadores do metabolismo mineral ósseo.
6. Avaliação do efeito da terapia com laser de baixa potência 2 x semana sobre os marcadores de inflamação e lesão endotelial
7. Validação de método de imagem de avaliação nutricional comparado com densitometria com dupla emissão de RX (DXA)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios da Pesquisa: Não há nenhum benefício direto e imediato ao Sr(a). É possível que haja um benefício indireto para essa população de pacientes no futuro, caso haja sejam comprovados bons resultados com a terapia a ser testada.

Desconforto ou Riscos Esperados: É possível que ocorra pequeno hematoma na hora da punção da fístula para sua diálise e coleta de sangue. É possível também que sua pressão baixe por causa da diálise. Entretanto, o Sr. (a) estará dentro da Unidade de Diálise onde a equipe médica e de enfermagem poderá atende-lo de imediato. Não existe nenhum risco para todos os outros

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9010

E-mail: comitedeetica@uninove.br

Página 04 de 08



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE



Continuação do Parecer: 2.962.842

exames.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é pertinente e de tema relevante de saúde pública para pesquisar melhorias no tratamento dialítico dos pacientes com doença renal crônica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As seguintes pendências pontuadas no parecer anterior:

- recomenda-se fortemente que os pesquisadores consultem o link do CEP-UNINOVE (que consta em "recomendações") para atualizar alguns itens conforme descrito abaixo (exemplo: inclusão de medidas protetivas). Pendência atendida pelo pesquisador

- Participante da pesquisa deve ser informado que fará um exame em que haverá emissão de raios x. Deve-se mencionar as medidas protetivas; Pendência atendida pelo pesquisador

- Deve-se incluir o risco de constrangimento ao realizar "medida do tamanho da cintura e do quadril". Devese também descrever a medida protetiva adotada; Pendência atendida pelo pesquisador

O risco de constrangimento ao responder o questionário DASI deve ser descrito no item que aborda os "riscos" do TCLE. Devem ser descritas as medidas protetivas; Pendência não atendida pelo pesquisador. Não ficou claro no TCLE o risco de constrangimento ao responder os questionários propostos. Assim como, o número de questões e o tempo total que o participante precisará dispensar para responder os questionários.

- Os pesquisadores devem descrever os riscos inerentes ao processo dialítico no TCLE, incluindo a hemodiálise tradicional e a hemodiafiltração com as diferenças no tempo de aplicação e como os mesmos serão tratados; Pendência atendida pelo pesquisador

- Informar no TCLE quanto tempo necessário para dedicação em cada sessão de aplicação de laser e de hemofiltração e o total de sessões; Pendência atendida pelo pesquisador

Os pesquisadores devem esclarecer quais os tratamentos que serão realizados em cada local (Unidade de diálise do Santa Maggiore, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e Universidade Nove de Julho/UNINOVE). Em outras palavras, os pesquisadores devem esclarecer os tratamentos/locais da pesquisa e verificar a necessidade de 2 termos de consentimento; Pendência atendida pelo pesquisador

- Deixar claro aos pacientes (no TCLE) se eles terão que fazer deslocamentos extras em função da pesquisa; Pendência atendida pelo pesquisador

- Esclarecer se as pessoas idosas incluídas no estudo tem autonomia plena. Esclarecer a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa idosos durante a

Continuação do Parecer: 2.962.842

pesquisa. -Atualizar local do Comitê de ética em pesquisa (12o andar); Os pesquisadores devem incluir uma breve descrição do orçamento do estudo. Pendência atendida pelo pesquisador

Recomendações:

Recomenda-se:

Não ficou claro no TCLE o risco de constrangimento ao responder os questionários propostos. O risco de constrangimento ao responder o questionário DASI deve ser descrito no item que aborda os "riscos" do TCLE. Assim como, o número de questões e o tempo total que o participante precisará dispensar para responder os questionários.

No cronograma do projeto, atualizar as datas deixando claro que a metodologia será iniciada apenas após a aprovação do comitê de ética;

Na carta de anuência do HC foi assinada por um funcionário, cujo cargo não é informado. A assinatura da carta de anuência deve ser feita pelo diretor do Setor e esta informação (do cargo) deve ser explicitada na carta.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá se apresentar na instituição de realização da pesquisa (que autorizou a realização do estudo) para início da coleta dos dados

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá se apresentar na instituição de realização da pesquisa (que autorizou a realização do estudo) para início da coleta dos dados.

O participante da pesquisa (ou seu representante) e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo, conforme Carta Circular no 003/2011 da CONEP/CNS.

Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEP antes de ser implementada.

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9010

E-mail: comitedeetica@uninove.br

Ao pesquisador cabe manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP (Res. CNS 466/12 item X1. 2. f).

De acordo com a Res. CNS 466/12, X.3.b), o pesquisador deve apresentar a este CEP/SMS os relatórios semestrais. O relatório final deverá ser enviado através da Plataforma Brasil, ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1206352.pdf	03/10/2018 15:17:09		Aceito
Outros	Resposta.pdf	03/10/2018 15:16:21	Rosilene Motta Elias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HDFidosos.pdf	03/10/2018 15:14:36	Rosilene Motta Elias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	03/10/2018 15:13:19	Rosilene Motta Elias	Aceito
Outros	CartaanuenciaPrevent.pdf	27/08/2018 14:19:53	Rosilene Motta Elias	Aceito
Outros	cartacienciaHDHCFMUSP.pdf	26/08/2018 09:19:32	Rosilene Motta Elias	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE



Continuação do Parecer: 2.962.842

SAO PAULO, 15 de Outubro de 2018

Assinado por:
CHRISTIANE PAVANI
(Coordenador(a))