Maria Alice Muniz Domingos

**RBP urinária e sérica: associação com doença renal crônica
e fatores de risco cardiovascular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Dr.^a Silvia Maria de Oliveira Titan

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Domingos, Maria Alice Muniz

RBP urinária e sérica : associação com doença renal crônica e fatores de risco cardiovascular / Maria Alice Muniz Domingos. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Sílvia Maria de Oliveira Titan.

Descritores: 1.Proteínas de ligação ao retinol 2.Insuficiência renal crônica
3.Proteinúria 4.Proteínas sanguíneas 5.Marcadores biológicos 6.Resistência à insulina
7.Doenças cardiovasculares 8.Fatores de risco

USP/FM/DBD-478/15

Dedicatória

Aos meus queridos pais, Jalil e Julia
por todo esforço e cuidado na minha formação
como ser humano e profissional.

Ao meu grande amor, Agnus
que trouxe cor e alegria aos meus dias.

Aos filhos que teremos,
ainda que a espera seja longa.

Agradecimentos

Finalmente concluo mais uma etapa da minha trajetória profissional, mas este trabalho de modo algum é resultado do meu esforço individual. Portanto, é necessário deixar aqui registrado minha gratidão por todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que ele pudesse ser realizado.

Agradeço primeiramente aos meus pais, por me proporcionarem um ambiente fecundo para o aprendizado e crescimento tanto pessoal como profissional. Vocês mais que inspiração, norteiam minha vida em todos os sentidos. Amo vocês.

Aos meus avós Alfredo (*in memoriam*), Nair, Jorge (*in memoriam*) e Nadima (*in memoriam*), que há muito tempo já haviam plantado a semente da valorização do conhecimento e do estudo em nossa família.

Agradeço também à mãe que a vida me deu, Luzinete, por todo seu amor e cuidado comigo em todos esses anos. Aos meus irmãos Jamile, Juliana e Michel, minha cunhada Giovanna e minha afilhada Gabi, pelos deliciosos momentos de descontração juntos.

Ao Agnus, meu amor, obrigada pelo seu bom humor, paciência e compreensão. Com você a vida é mais leve e feliz.

À minha querida orientadora Dra Silvia Titan, agradeço sua acessibilidade, por estar sempre tão próxima e por ter confiado à mim o projeto de construção da coorte PROGREDIR, tão cuidadosamente idealizado. Admiro muito você e sua família.

Agradeço à toda equipe do Centro de Pesquisa do Hospital Universitário, especialmente à Dra Isabela e Dr Paulo, por viabilizarem toda

a execução do projeto, disponibilizando todos os recursos físicos e humanos. Agradeço ainda à equipe de enfermagem, representadas pelas enfermeiras Edna e Tereza, pela dedicação e esforços para que tudo desse certo. À Lídia, pela difícil tarefa de organizar todos os documentos e exames do PROGREDIR. À Lígia, responsável técnica pelas análises clínicas do HU, pela sua imensa ajuda e disponibilidade. Aos amigos e alunos Nilton, Fernanda, Eliane, Estela, Paula, Alisson e Gesiane, pela ajuda nas diversas fases de recrutamento, análises, estudos e desfecho. Agradeço também aos funcionários da Dbios pela digitalização de todo banco de dados da coorte.

Por fim, a todos aqueles que sempre me apoiaram e me incentivaram nessa caminhada, meus tios e primos, minhas amigas Eryjane, Valéria, Lídia, meus pacientes e equipe da diálise do Hospital Santa Virgínia, amigos do Hospital Pérola Byngton, Brigadeiro, Villa-Lobos e Fundação Paliar. Muito obrigada a todos vocês.

Essa tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação; Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****RESUMO****SUMMARY**

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. OS RETINÓIDES E A RBP: METABOLISMO E FUNÇÃO	2
1.2. RBP URINÁRIA COMO MARCADOR DE LESÃO TUBULAR RENAL	8
1.3. RBP SÉRICA COMO MARCADOR DE RESISTÊNCIA INSULÍNICA E OBESIDADE	14
1.4. FUNÇÃO RENAL E RBP SÉRICA	22
1.5. RBP E RISCO CARDIOVASCULAR	24
2. OBJETIVOS	28
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
3.1. BIORREPOSITÓRIO E DOSAGENS LABORATORIAS	32
3.2. EXAMES COMPLEMENTARES	33
3.3. TAMANHO AMOSTRAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
3.4. RECURSOS FINANCEIROS	38
3.5. COMITÊS DE ÉTICA	38
4. RESULTADOS	40
4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PARTICIPANTES RECRUTADOS	40
4.2. RBP URINÁRIA	43
4.3. RBP SÉRICA	56
4.4. CALCIFICAÇÃO ARTERIAL CORONARIANA	67
4.4.1. EFEITO DE LOG DE RBP URINÁRIA SOBRE CALCIFICAÇÃO CORONARIANA	68
4.4.2. EFEITO DE LOG DE RBP SÉRICA SOBRE CALCIFICAÇÃO CORONARIANA	70
5. DISCUSSÃO	72
5.1. RBP URINÁRIA	72
5.2. RBP SÉRICA	77
6. CONCLUSÕES	82
6.1. RBP URINÁRIA	82
6.2. RBP SÉRICA	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

Lista de Abreviatura e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

9cisRA	9cis ácido retinóico
AE	Átrio esquerdo
atRA	<i>all-trans</i> ácido retinóico
AVC	Acidente vascular cerebral
CAC	Calcificação coronariana
CG	<i>Cockroft Gault</i>
Cl.cr	<i>Clearance</i> de creatinina
CRBP	<i>Cellular retinol-binding protein</i>
DCV	Doença cardiovascular
Ddve	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DM	Diabetes mellitus
DRC	Doença renal crônica
Dsve	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
ECO	Ecodopplercardiograma
EMIC	Espessura média-intimal da carótida
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GESF	Glomeruloesclerose segmentar e focal
GLUT4	<i>Glucose transporter 4</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Hb-glicada	Hemoglobina glicada
HOMA	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
HU	Hospital Universitário
IAM	Infarto agudo do miocárdio

IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
Incor	Instituto do coração
ITQ	Interquartil
JAK	<i>Janus kinase 2</i>
JNK	<i>c-Jun-N terminal kinase</i>
KIM1	<i>Kidney injury molecule 1</i>
LRAT	Lecitina retinol acil-transferase
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDRC	<i>Modification of Diet in Renal disease</i>
NAG	N-acetyl beta-D glicosaminidase
NKF	<i>National Kidney Foundation</i>
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína C reativa
PECK	Fosfoenol-piruvato carboxiquinase
PI3Kinase	Fosfoinosítide 3 quinase
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
Ppve	Parede posterior do ventrículo esquerdo
PTH	Paratormônio
QMr	Quilomicrons remanescentes
RAR	Receptor de ácido retinóico

RBP	<i>Retinol binding protein</i>
RBPR2	<i>Retinol binding protein receptor 2</i>
RBP _s	<i>Retinol binding protein sérica</i>
RBP _u	<i>Retinol binding protein urinária</i>
RCQ	Relação cintura quadril
RNA _m	RNA mensageiro
RXR	Receptor retinóide X
SCR	Síndrome cardiorrenal
Siv	Septo interventricular
SOCS3	<i>Supressor of cytokine signal 3</i>
STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcriptional 5</i>
STRA6	<i>Stimulated by retinoic acid 6</i>
Th	<i>T-helper</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TRS	Terapia renal substitutiva
TTR	Transtirretina
UNIFESP	Universidade Federal do Estado de São Paulo
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VOP	Velocidade de onda de pulso

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MECANISMOS DE ABSORÇÃO DE PROTEÍNAS NO TÚBULO PROXIMAL... .8	
FIGURA 2. KAPLAN MEIER 56 PACIENTES COM NEFROPATIA DIABÉTICA DE ACORDO COM RBP E MCP1 URINÁRIAS	12
FIGURA 3. HISTOGRAMA DA RBP URINÁRIA.	44
FIGURA 4. HISTOGRAMA DA RBP SÉRICA.	56
FIGURA 5. HISTOGRAMA DO ESCORE DE CAC.....	67

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DOS 454 PACIENTES DA COORTE PROGREDIR.....	41
TABELA 2. CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DOS 454 PACIENTES DA COORTE PROGREDIR.....	42
TABELA 3. PREVALÊNCIA DAS CLASSES DE DRC-NKF NA POPULAÇÃO 454 PACIENTES.....	43
TABELA 4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DOS 454 PACIENTES DA COORTE PROGREDIR DE ACORDO COM OS TERCIS DE RBP URINÁRIA.....	45
TABELA 5. CARACTERÍSTICAS LABORATORIAS DOS 454 PACIENTES DA COORTE PROGREDIR DE ACORDO COM OS TERCIS DE RBP URINÁRIA	46
TABELA 6. CORRELAÇÕES DE VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAS COM RBP URINÁRIA.....	48
TABELA 7. CLASSES DE DRC-NKF DE ACORDO COM OS TERCIS DE RBP URINÁRIA	49
TABELA 8. REGRESSÃO LINEAR UNIVARIADA DE VARIÁVEIS CLÍNICAS E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES SOBRE LOG DE RBP URINÁRIA.	50
TABELA 9. REGRESSÃO LINEAR UNIVARIADA DE VARIÁVEIS LABORATORIAS SOBRE LOG DE RBP URINÁRIA.....	51
TABELA 10. REGRESSÃO LINEAR MULTIVARIADA VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAS SOBRE LOG DE RBP URINÁRIA	52
TABELA 11. REGRESSÃO LINEAR MULTIVARIADA DE VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAS SOBRE LOG DE RBP URINÁRIA.	53
TABELA 12. REGRESSÃO LINEAR MULTIVARADA SOBRE LOG DE RBP URINÁRIA.....	53
TABELA 13. REGRESSÃO LINEAR MULTIVARADA <i>STEPWISE</i> SOBRE LOG DE RBP URINÁRIA.....	54
TABELA 14. REGRESSÃO LINEAR MULTIVARIADA <i>STEPWISE</i> SOBRE LOG DE RBP URINÁRIA ESTRATIFICADA PELA ALBUMINÚRIA.....	55
TABELA 15. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DOS 454 PACIENTES DA COORTE PROGREDIR DE ACORDO COM OS TERCIS DE RBPSÉRICA.....	57
TABELA 16. CARACTERÍSTICAS LABORATORIAS DOS 454 PACIENTES DA COORTE PROGREDIR DE ACORDO COM OS TERCIS DE RBP SÉRICA.....	58
TABELA 17. CORRELAÇÕES DE VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAS COM RBP SÉRICA.....	60
TABELA 18. CLASSES DE DRC-NKF DE ACORDO COM OS TERCIS DE RBP SÉRICA.....	61
TABELA 19. REGRESSÃO LINEAR UNIVARIADA DE VARIÁVEIS CLÍNICAS E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES SOBRE LOG DE RBP SÉRICA.	63
TABELA 20. REGRESSÃO LINEAR UNIVARIADA DE VARIÁVEIS LABORATORIAS SOBRE LOG DE RBP SÉRICA.....	64

TABELA 21. REGRESSÃO LINEAR MULTIVARIADA DE VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAS SOBRE LOG DE RBP SÉRICA.....	65
TABELA 22. REGRESSÃO LINEAR MULTIVARADA SOBRE LOG DE RBP SÉRICA.....	66
TABELA 23. REGRESSÃO LINEAR MULTIVARADA <i>STEPWISE</i> SOBRE LOG DE RBP SÉRICA.....	66
TABELA 24. REGRESSÃO LINEAR GENERALIZADA GAMA SOBRE ESCORE DE CÁLCIO.....	68
TABELA 25. REGRESSÃO LINEAR GENERALIZADA GAMA SOBRE ESCORE DE CÁLCIO.....	69
TABELA 26. REGRESSÃO LINEAR GENERALIZADA GAMA <i>STEPWISE</i> SOBRE ESCORE DE CÁLCIO.....	69
TABELA 27. REGRESSÃO LINEAR GENERALIZADA GAMA SOBRE ESCORE DE CÁLCIO.....	70

Resumo

Resumo

Domingos MAM. *RBP urinária e sérica: associação com doença renal crônica e fatores de risco cardiovascular* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015

A RBP urinária tem seu papel bem definido como marcador de progressão de doença renal em tubulopatias, em glomerulopatias e em pacientes transplantados. No entanto, seu papel em DRC *lato senso* foi pouco estudado. Por sua vez, a dosagem de RBP sérica, caracterizada recentemente como biomarcador de resistência insulínica, também não teve seu papel esclarecido em população portadora de DRC. O objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre a RBP (urinária e sérica) e a função renal, assim como sua relação com fatores de risco cardiovascular em população de DRC. Para tanto, foram analisados os dados da linha de base da Coorte PROGREDIR, constituída por 454 participantes portadores de DRC, oriundos do Hospital das Clínicas, São Paulo. Inicialmente, além de estar inversamente relacionada às medidas de depuração de creatinina, a RBP urinária mostrou-se relacionada a diversos fatores de risco cardiovascular e variáveis associadas à função renal, como proteinúria, metabolismo ósseo, anemia, acidose, albumina, RPB sérica, Hb glicada, HOMA, lípidos, velocidade de onda de pulso (VOP), átrio esquerdo (ECO AE), diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (ECO-Ddve), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (ECO-Dsve) e fração de ejeção (ECO-Fe). Entretanto, após diversos modelos de regressão, permaneceram como variáveis independentemente associadas à RBP urinária a função renal, a

pressão arterial sistólica, a albuminúria, a acidose e a medida do AE. Esse resultado se manteve quando o modelo foi repetido mediante estratificação por albuminúria, sugerindo que mesmo em população normoalbuminúrica a RBP urinária correlacione-se inversamente com função renal. Além disso, a relação inversa de RBP urinária com dilatação cardíaca sugere que, em população com DRC já estabelecida, a RBP urinária possa ter um papel em identificar mecanismos etiológicos, possivelmente por distinguir mecanismos hemodinâmicos daqueles onde há uma patologia renal intrínseca. Por sua vez, a RBP sérica relacionou-se inversamente à função renal e idade, e positivamente a triglicérides, albumina e potássio. Curiosamente, a RBP sérica não se mostrou associada às medidas de metabolismo de carboidrato, sugerindo que seu papel como biomarcador de resistência insulínica seja atenuado na DRC. Também não foram encontradas relações entre RBP urinária ou sérica e calcificação coronária ou espessura de carótidas.

Nossos resultados sugerem que a RBP urinária deva ser melhor explorada como marcador de função renal e, possivelmente, como marcador de risco de progressão da DRC.

Descritores: 1. Proteínas de ligação ao retinol; 2. Insuficiência renal crônica; 3. Proteínas sanguíneas; 4. Proteinúria; 5. Fatores de risco; 6. Doenças cardiovasculares; 7. Marcadores biológicos; 8. Resistência à insulina.

Summary

Summary

Domingos MAM. *Urinary and serum RBP: relationship with chronic kidney disease and cardiovascular risk factors* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

The role of urinary RBP as a biomarker of tubular injury and CKD progression in tubulopathies, glomerulopathies and in transplantation is well established. However, its role in CKD is less studied. In addition, serum RBP has been recently characterized as an insulin resistance marker, but controversial results have been shown. The aim of the study was to evaluate the association of both urinary RBP and serum RBP with kidney function and other variables related to the uremic syndrome and cardiovascular risk in a CKD population. We used the baseline data from the PROGREDIR Cohort, which comprehends 454 participants with CKD, recruited from Hospital das Clínicas, São Paulo. In univariate analysis, urinary RBP was inversely related to renal function. In addition, it was also related to albuminuria, SBP, anemia, mineral metabolism, acidosis, albumin, serum RBP, glycated hemoglobin, HOMA, lipids, pulse-wave velocity, left atrium diameter, left ventricle diastolic diameter, left ventricle systolic diameter and ejection fraction. However, in the multivariate analysis, only SBP, albuminuria, acidosis, left atrium diameter and renal function remained significantly associated to urinary RBP. After stratification for albuminuria levels, the same relationship was observed, suggesting that even in the normoalbuminuric population urinary RBP is significantly related to renal function. Interestingly, the inverse association between urinary RBP and cardiac dilation suggests that urinary RBP may play a role in identifying mechanisms related to CKD, by differentiating

vascular/cardio-renal conditions versus more intrinsic kidney disease and possibly tubule-interstitial fibrosis. The serum RBP was positively related to renal function, triglycerides, albumin, age and potassium, but not to measurements of carbohydrate metabolism. No relationship between urinary or serum RBP and coronary calcification or carotid thickness was found.

Our results suggest that urinary RBP should have its role as a marker of CKD and CKD progression further explored.

Descriptors: 1.Retinol-binding proteins; 2.Renal insufficiency; 3.Chronic; 4.Proteinuria; 5.Blood proteins; 6.Biological markers; 7.Insulin resistance; 9.Cardiovascular diseases; 8. Risk factors

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os Retinóides e a RBP (retinol-binding protein): metabolismo e função.

A retinol-binding protein (RBP), atualmente conhecida como RBP4, pertence à família das lipocalinas,(1) que são proteínas responsáveis pelo transporte de pequenas moléculas hidrofóbicas. A RBP é primordialmente sintetizada no fígado, mas o seu RNA mensageiro (mRNA) já foi encontrado em outros tecidos como: adipócitos, rim, pulmão, entre outros.(2) Sua principal função é transportar o retinol (vitamina A) do fígado até os tecidos periféricos.

A vitamina A, por sua vez, é um nutriente lipossolúvel, essencial para muitas funções biológicas como: diferenciação celular, metabolismo, imunidade, visão e reprodução. Pode ser tanto de origem animal, como é o caso da vitamina A pré-formada, os ésteres de retinil, como de origem vegetal onde é encontrada em forma de pró-vitamina, representado principalmente pelo beta-caroteno.(3)

No lúmen intestinal, os ésteres de retinil provenientes da dieta são emulsificados com os sais biliares e hidrolisados a retinol por várias enzimas pancreáticas e hidrolases, antes da sua absorção. No enterócito, o retinol se liga à *cellular retinol-binding protein* (CRPBI) e o retinol complexado é reesterificado pela lecitina retinol aciltransferase (LRAT).(4) Quando grandes

quantidades são absorvidas e a CRPBII se torna saturada, a esterificação do retinol livre é feita pela acyl CoA retinol aciltransferase (ARAT).(5) Os ésteres de retinil são então incorporados aos quilomícrons, entram na circulação linfática e migram para circulação sanguínea onde sofrem vários processos bioquímicos resultando em quilomicrons remanescentes (QMr).(6) Embora o fígado seja o principal destino dos QMr, a captação extra-hepática destes pode ser uma via alternativa de captação do retinol para tecidos como medula óssea, baço, tecido adiposo, músculo esquelético e rins.(7,8) Em contrapartida, o beta-caroteno proveniente da dieta, é transformado em retinaldeído na mucosa intestinal por uma clivagem na posição central pela ação da enzima monooxigenase, posteriormente reduzido a retinol, seguindo então a mesma via descrita anteriormente.(9,10) A vitamina A pré-formada é amplamente biodisponível, enquanto a biodisponibilidade e bioconversão dos carotenóides depende de vários outros fatores. Porém, a eficiência da absorção de ambos parece depender da quantidade e da qualidade de lipídios dietéticos.(11)

No fígado, cerca de 50 a 80% dos ésteres de retinil podem ficar armazenados nas células estreladas. Quando hidrolisados a retinol por meio da ação da retinil-éster-hidrolase, são liberados na circulação acoplados à RBP sérica, que permite o transporte do retinol até os tecidos periféricos.(6) No entanto, é importante frisar que tanto humanos como ratos com deficiência de RBP, mas ingestão adequada de retinóides apresentam fisiologia e fenótipos relativamente normais, pois o transporte de retinóides aos tecidos periféricos pode ser suplantado através do transporte

pós-prandial de ésteres de retinil via QMr.(12,13) Foi demonstrado que a visão é particularmente afetada pela deficiência de RBP em ratos, já que os olhos têm capacidade limitada de captação dos ésteres de retinil dos QMr.(14)

Uma vez nas células, o retinol é oxidado de forma irreversível em ácido retinóico e seus isômeros: all-trans ácido retinóico (atRA), 9-cis ácido retinóico (9cisRA), considerados os principais metabólitos ativos da vitamina A. Esses metabólitos podem ligar-se aos receptores nucleares específicos, o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor X retinóide (RXR), ativando a transcrição gênica. Cada metabólito possui afinidade específica por seu receptor nuclear: o atRA e o retinaldeído têm alta afinidade com RAR, enquanto o 9cisRA tem alta afinidade pelo RXR.(15)

O RXR atua como parceiro obrigatório do RAR e de outros receptores nucleares, como o *peroxisome-proliferator activated receptors* (PPAR), receptores hepáticos X (LXR), *farsenoid X receptor* (FXR), receptores de hormônio tireoideano (TR), e receptores de vitamina D (VRD), formando heterodímeros.(16) A ligação pode dar-se também com outra molécula de RXR, formando um homodímero. Os heterodímeros do RXR podem ser ativados por outros ligantes como hormônios, colesterol e ácidos graxos, além dos retinóides, que podem desempenhar papéis agonistas ou antagonistas em relação ao outro receptor acoplado. Algumas ações dos heterodímeros do RXR estão relacionados à síndrome metabólica, como adipogênese, resistência à insulina e dislipidemia, o que justifica o interesse

em explorar esses receptores como sítios de ações de drogas, como ocorre com as glitazonas e os fibratos.(16)

Ainda há questionamentos a respeito do modo como o retinol complexado à RBP (holo-RBP) é entregue à célula. Por muito tempo acreditou-se que a difusão passiva da vitamina A através da membrana celular fosse a única maneira deste processo ocorrer. No entanto, desde a metade dos anos 70 foram crescentes as evidências acerca da existência de um receptor de membrana celular específico para RBP, que só nos últimos anos foi reconhecido como *stimulated by retinoic acid 6* (STRA6).(17,18)

O STRA6 é uma proteína estruturalmente composta por cinco domínios extracelulares, quatro domínios intracelulares e nove domínios transmembranas, entre os quais (domínio VI e VII) está localizado o sítio de ligação com a RBP. O mecanismo relacionado a esse receptor é distinto, pois ele não depende de qualquer fonte de energia (ATP) e também não depende do gradiente eletroquímico do ligante livre. A ativação do receptor STRA6 controla tanto o influxo como efluxo de retinol da célula dependendo das diferentes proporções de apo-RBP e holo-RBP, e parece estar diretamente ligada à atividade da LRAT e da CRBP-I.(19)

A mutação do receptor STRA6 em estudos experimentais leva a um largo espectro fenotípico de malformações incluindo: anoftalmia, retardo mental, cardiopatia congênita, hiperplasia pulmonar, retardo de crescimento uterino e letalidade embrionária.(20-27) No entanto, outros grupos demonstraram fenótipos mais brandos do que esses, apenas com alterações do epitélio pigmentado da retina, alteração da morfologia ocular e defeitos

visuais, sugerindo que o STRA6 seja fundamental para a visão, mas dispensável para homeostasia de retinóides na maioria dos órgãos.(28-31) Em relação aos fenótipos metabólicos, camundongos com deficiência de STRA6 são mais sensíveis à insulina que seus pares e parcialmente protegidos contra resistência insulínica induzida por dieta.(28,29)

Outro receptor do retinol, denominado RBPR2, com características relacionadas ao STRA6, foi recentemente descrito pelo grupo de Alapatt e cols. em 2013. Seu RNAm é expresso no fígado, intestino delgado, baço e tecido adiposo.(32)

Estudos cinéticos demonstraram que cada molécula de retinol circula várias vezes do fígado até os outros órgãos, antes de ser degradada. Essa recirculação e mobilização do retinol entre os diferentes órgãos parece ser auxiliada pela RBP sintetizada em tecidos extra-hepático.(33,34) No plasma, a concentração de retinol é controlada e permanece dentro de um intervalo estreito, a despeito das reservas hepáticas aumentadas ou reduzidas.(35) A expressão de mRNA-RBP hepática não parece ser influenciada pelo retinol. Em estudo com ratos depletados e não depletados de retinol, não houve diferença dos níveis de mRNA-RBP hepática entre os dois modelos.(36) Entretanto, a secreção hepática de RBP depende da disponibilização de vitamina A.(37)

A RBP, quando acoplada ao retinol (holo-RBP), circula em sua maior parte ligada à transtirretina (TTR), antiga pré-albumina, uma proteína igualmente produzida nos hepatócitos, de peso molecular aproximadamente de 55 KDa, também conhecida por ser transportadora do hormônio da

tireóide, a tiroxina.(38,39) Esta ligação da TTR à holo-RBP, além de conferir maior estabilidade ao complexo, impede a filtração glomerular da RBP.(38) No entanto, cerca de 4-5% da holo-RBP circula livremente no sangue, sendo filtrado pelo rim e, em condições normais, reabsorvido e degradado pelo túbulo renal.(39)

No túbulo proximal, a RBP se liga à megalina, uma proteína receptora presente na borda em escova, que age como um transportador transmembrana (Figura 1). Esta proteína é responsável pela internalização da RBP em vesículas endocíticas.(40) As vesículas formadas adquirem progressivamente pH ácido através de H⁺ATPases. Essa acidez é necessária para a ação de enzimas lisossomais, no intuito de degradar a RBP absorvida. Estudo com camundongos *knock-out* para o gene da megalina demonstrou aumento da excreção urinária da RBP e do retinol em contrapartida à diminuição da recaptção de RBP no túbulo proximal.(41) A megalina também funciona como receptor endocítico para outras moléculas, entre elas: a albumina, vitamina D, paratormônio, transcobalamina, beta2-microglobulina e cálcio.(40) Vale lembrar também, que a cubilina é outra proteína transportadora presente no túbulo proximal, que tem como principais ligantes a albumina, imunoglobulinas de cadeia leve, apolipoproteína A-I, HDL e fator intrínscio da vitamina B12.(42) Não existem relatos de ligação da cubilina com a RBP. Diferente da megalina, a cubilina não possui domínio transmembrana, mas os dois receptores podem ligar-se mutuamente e essa ligação possivelmente permite que a megalina internalize a cubilina e seus ligantes.(42,43)

Figura 1. Mecanismos de absorção de proteínas no túbulo proximal

Em modelos animais, o rim parece ser responsável por grande parte da restituição do retinol à circulação. A RBP absorvida pelo túbulo proximal é degradada nos lisossomos, e a restituição do retinol à circulação ocorre através do re-acoplamento do mesmo a uma nova molécula de RBP recém-sintetizada no próprio túbulo proximal.(41,44) Análises utilizando *Northern blot*, demonstraram presença de 5 a 10% de RNAm-RBP no rim de ratos, do total presente no fígado.(44) Posteriormente, também foi demonstrado através de análise de imunohistoquímica de túbulos proximais de ratos e humanos, que além da coloração de grânulos em localização usual de endossomos e lisossomos, há coloração de pequenos grânulos próximos a

membrana basal, corroborando a hipótese de síntese e secreção basolateral de RBP, no túbulo proximal.(41)

Dentro deste panorama, ao longo dos últimos anos, muitos estudos avaliaram o papel potencial da dosagem de RBP urinária como marcador de lesão tubular.

1.2 RBP urinária como marcador de lesão tubular renal

Atualmente, na prática clínica, podemos estimar o ritmo de filtração glomerular através da dosagem de creatinina sérica, pela depuração de creatinina na urina de 24 horas, por fórmulas que incluem dados clínicos e creatinina sérica, através da cistatina C ou através da depuração de marcadores de medicina nuclear. Outro marcador importante de lesão renal e de risco de progressão de DRC é a albuminúria. Entretanto, estes marcadores apresentam algumas limitações. A creatinina sérica é um marcador mais tardio de lesão, é sofre influência de uma série de fatores como massa muscular, sexo, idade, sobrepeso, estado nutricional, hepatopatia e condições de amputação.(45) As fórmulas dela derivadas também tem um grau de imprecisão grande, principalmente quando há perda de função renal mais acentuada.(46) A cistatina C, inicialmente promissora, também mostrou-se limitada em condições de perda mais importante de função renal.(47-49) A albuminúria, que substituiu amplamente a função renal como desfecho intermediário de progressão de DRC nos últimos anos, teve seu desempenho como marcador questionado

em estudos recentes.(50-52) Estes estudos sugeriram que numa parcela significativa de pacientes com DRC em progressão ocorra um desacoplamento entre a perda de função e a piora da albuminúria, o que comprometeria o desempenho da albuminúria como marcador intermediário de função renal. O uso de desfechos renais “sólidos”, como duplicação de creatinina e início de TRS, mesmo que mais trabalhoso e dispendioso, voltou a ser priorizado. Além disso, esses estudos também alertaram a comunidade científica para um novo olhar sobre um grupo expressivo de pacientes que apresentam DRC normoalbuminúrica. Nos últimos anos, tanto a pesquisa experimental, como os estudos clínicos em Nefrologia estiveram essencialmente concentrados em doenças proteinúricas, o que negligencia uma parcela considerável da população portadora de DRC. Por este motivo, a busca de novos biomarcadores de diagnóstico e progressão de doença renal segue intensa, em vistas à somar o desempenho de novos marcadores ao desempenho daqueles já consagrados anteriormente.

Há algum tempo, a dosagem urinária de proteínas de baixo peso molecular, como a RBP, a beta-2-microglobulina, alfa-1-microglobulina, a *N-acetyl-beta-D-glucosaminidase* (NAG) e *kidney-injury molecule 1* (KIM-1) vem sendo usada, não só no intuito de diagnóstico diferencial das patologias que cursam com proteinúria (diferenciação entre proteinúria glomerular e tubular), mas também como marcador precoce de lesão túbulo-intersticial na DRC.(53-76)

Alguns poucos estudos na década de 80, avaliaram o papel de marcadores tubulares em nefropatia diabética ou em diabetes mellitus. Em

estudo com diabéticos tipo 2 com função renal normal, a excreção urinária de RBP demonstrou correlação com excreção urinária de albumina.(53) Em diabéticos tipo 1, também foi possível encontrar boa correlação dos níveis da RBP urinária com excreção urinária de albumina, NAG e beta-2 microglobulina.(54,55) Alguns trabalhos sugerem que a RBP seja o melhor marcador de função tubular, por ser mais sensível do que a NAG e por apresentar melhor desempenho do que a beta-2-microglobulina em meio ácido urinário.(56,57) Além desses achados, a excreção urinária aumentada da RBP foi vista também em pacientes diabéticos tipo 1 e 2 normoalbuminúricos, sugerindo seu papel como marcador mais precoce de risco de progressão de DRC.(53,58-60) Também foi demonstrada a correlação da RBP urinária com retinopatia diabética (61,62) e níveis de Hb-glicada.(58,59)

Entretanto, apesar desses estudos iniciais, o uso de marcadores tubulares em nefropatia diabética foi posteriormente esquecido. Apenas recentemente, Vaidya e cols. avaliaram o papel de dois marcadores de túbulo-interstício (KIM-1 e NAG), e demonstraram que níveis urinários baixos de KIM-1 e NAG estavam relacionados à regressão de microalbuminúria em pacientes diabéticos tipo 1 após dois anos de seguimento.(63) Em outro estudo caso-controle com diabéticos tipo 1, a excreção urinária de NAG foi um fator preditor independente de evolução para microalbuminúria e macroalbuminúria.(64) Estes estudos apresentam a limitação de serem transversais. Em 2012, nosso grupo demonstrou que em 56 pacientes com nefropatia diabética macroalbuminúrica, a RBP e MCP1 urinários foram

preditores independentes do risco de desfecho combinado (duplicação da creatinina sérica, necessidade de diálise ou morte).(65) (Figura 2)

Figura 2. Kaplan-Meier de 56 pacientes com nefropatia diabética de acordo com RBP e MCP-1 urinárias (65)

Já em outras condições patológicas renais, como glomerulopatias, disfunção crônica de enxerto e nefrotoxicidade por inibidores de calcineurina, o papel da RBP urinária foi mais amplamente estudado.

Na nefrite lúpica, a excreção urinária de RBP relaciona-se à atividade da doença, proteinúria, função renal e resposta terapêutica.(66) Outro estudo, que acompanhou 149 pacientes com diversas causas de glomerulopatias por 10 anos, demonstrou que níveis de RBP urinária maior que 1mg/l associam-se a pior prognóstico da doença (medido como desfecho de duplicação de creatinina).(67) O mesmo grupo também constatou que níveis elevados de RBP urinária antes do tratamento de pacientes com síndrome nefrótica (GESF, lesão mínima e glomerulonefrite mesangial proliferativa) indicavam maior resistência à ação terapêutica de glicocorticóides.(68)

Na população de transplantados renais, estudos pioneiros na área demonstraram a associação entre a RBP urinária e a perda de função de enxerto após o seguimento médio de um ano.(69,70) Outro estudo do mesmo grupo caracterizou ainda que a RBP urinária associava-se à presença de toxicidade por ciclosporina e risco de perda de função renal em pacientes transplantados cardíacos.(71)

Esses resultados em glomerulopatias e transplantados sugerem que o uso adicional de marcadores de função tubular acrescenta informação clínica ao uso dos marcadores de função de filtração e de proteinúria. Além de indicar lesões específicas a uma região anatômica renal (como é o caso de tubulopatias proximais como Doença de Dent, Fanconi ou cistinose), é possível que marcadores de disfunção tubular reflitam em maior escala a presença de agressão e fibrose túbulo-intersticial, um dos parâmetros histológicos mais fortes de predição de perda de função em nefropatias

crônicas (até porque a fibrose representa em si o processo de DRC). Poucos estudos avaliaram a correlação entre RBP urinária e dados de histologia renal. Numa análise com 162 pacientes encaminhados para biópsia renal por proteinúria $>0,5\text{g/L}$ e/ou perda da função RFG $<60\text{ml/min}$, a relação RBP urinária/Cr se mostrou fortemente associada ao grau de fibrose intersticial.(72) A especificidade do teste com valor de corte de RBP urinária $>20\text{mg/g creat}$ foi de 95% para índices de fibrose $>25\%$.(72)

No entanto, apesar dos dados promissores, a RBP urinária ou mesmo outros marcadores tubulares são na prática pouco explorados e utilizados no âmbito da DRC. Nesse sentido, seria importante caracterizar melhor o comportamento desses biomarcadores na DRC, tanto em doença renal diabética como em nefropatias não-diabéticas, sua associação com fatores de risco cardiovascular clássicos, assim como testar o seu desempenho em relação aos marcadores já tradicionais de DRC (ou seja, testar o quanto esses biomarcadores acrescentam informação aos marcadores já utilizados rotineiramente).

1.3 RBP sérica como marcador de resistência insulínica e obesidade

Numa linha mais recente de pesquisa, a RBP sérica (RBP4) vem sendo caracterizada como uma adipocina, sendo crescente o interesse na sua associação às alterações no metabolismo de glicose e adipogênese.

O papel da RBP4 na resistência insulínica foi primeiramente documentado pelo grupo da Prof. Barbara Kahn, a partir de modelos experimentais em camundongos transgênicos com alteração na expressão do GLUT4, transportador que facilita a entrada de glicose através da membrana plasmática das células do tecido adiposo e músculo esqueléticas. Camundongos com supressão do GLUT4 em tecido adiposo apresentavam aumento da resistência insulínica hepática e em tecidos periféricos, enquanto aqueles com aumento em sua expressão mostravam aumento da sensibilidade à insulina e melhor tolerância à glicose.(77-78) Estes dados foram inicialmente inquietantes, uma vez que acreditava-se que o tecido adiposo não participasse do processo de sensibilidade periférica à insulina (dada essencialmente pela sensibilidade da célula do músculo esquelético). Assim, surgiu a possibilidade de haver um fator secretado pelos adipócitos que levasse às alterações do metabolismo da glicose, modulando a sensibilidade do tecido muscular e hepático. Neste contexto, Yang e cols., utilizando técnica de microarray DNA, detectaram 5 tipos de RNAm que estavam aumentados no tecido adiposo dos camundongos com supressão de GLUT 4.(79) A identificação da proteína codificada por um desses mRNA levou ao reconhecimento da RBP4.(79) Foi avaliado então o mecanismo envolvido na indução de resistência insulínica pela ação da RBP4, sendo constatado que os ratos que apresentavam aumento da expressão da RBP4 no tecido adiposo expressavam um aumento da gliconeogênese hepática por aumento da atividade da enzima fosfoenol-piruvato carboxiquinase

(PECK) e atenuação da sinalização insulínica no músculo esquelético por diminuição da atividade da fosfoinositide-3 quinase (PI3Kinase).(79)

Outros achados deste estudo corroboraram estes dados. O uso da rosiglitazona, droga anti-diabética, reverteu a resistência insulínica dos camundongos *knock-out* para GLUT4 e normalizou os níveis séricos de RBP4 e da expressão de mRNA-RBP4 no tecido adiposo.(66) A indução de maior perda urinária e consequente diminuição sérica da RBP4 em camundongos obesos hiperalimentados pelo uso de fenretinide (um retinóide sintético que se liga à RBP4 impedindo sua ligação à transtirretina), levou à melhora da resistência insulínica destes animais.(79)

Em humanos, um estudo importante, realizado por Ghahan, Yang e cols. demonstrou que níveis elevados de RBP4 estão correlacionados positivamente com a magnitude da resistência insulínica tanto em pacientes obesos com intolerância à glicose ou diabetes tipo 2, como também em pacientes não obesos e não diabéticos mas com história familiar positiva para diabetes.(80) Nos pacientes em que houve melhora da resistência insulínica após introdução de atividade física foi evidenciado queda em paralelo dos níveis séricos de RBP4. Houve ainda associação da RBP a outros parâmetros da síndrome metabólica como triglicérides, pressão arterial sistólica e baixos níveis de HDL.(80)

As vias de sinalização envolvidas na indução de resistência insulínica pela RBP4 não estão totalmente esclarecidas. Uma das hipóteses é que a regulação da PECK seja mediada pela alteração na homeostasia dos retinóides, pois muitos dos genes envolvidos na gliconeogênese respondem

ao status nutricional de vitamina A e são induzidos pelo atRA.(81) Nesse contexto, a entrada do retinol na célula através da ligação da holo-RBP com o receptor RBPR2, que é abundantemente expresso no fígado, promove a ativação do RAR pelos produtos de oxidação do retinol que levará a decodificação gênica de enzimas gliconeogênicas.(32) De acordo com essa hipótese, camundongos com deleção gênica da retinaldeído dehidrogenase (enzima que converte o retinaldeído em atRA), apresentam diminuição da glicemia de jejum como resultado de atenuação da produção de glicose hepática.(82)

Em 2011, no entanto, o grupo de Berry e cols propôs um mecanismo alternativo, independente da ativação do RAR pelos produtos de oxidação do retinol, para explicar a resistência insulínica.(83) Neste estudo foi demonstrado que a holo-RBP quando ligada ao STRA6, induz a uma fosforilação transitória da tirosina/treonina perto da cadeia C-terminal desse receptor, o que desencadeia o recrutamento e ativação da Janus Kinase 2 (JAK2) e da signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5).(83) A cascata de sinalização RBP/retinol/STRA6/JAK2/STA5 induz a expressão dos genes *suppressor of cytokine signalins 3* (SOCS3), que é um potente inibidor do receptor de insulina periférico, e do *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ), que promove a lipogênese.(83) Esses achados justificam o rápido desenvolvimento de resistência insulínica em camundongos após injeção de holo-RBP recombinante, enquanto que a deleção da STRA6 confere proteção à resistência insulínica em camundongos obesos hiper-alimentados ou após injeção de holo-RBP

recombinante.(28) Ainda mais intrigante é que a deleção da STRA6 especificamente do tecido adiposo confere uma perda de peso e de massa adiposa, diminuição da leptina e dos níveis de insulina mesmo com dieta normal.(84) Apesar deste mecanismo ser independente da sinalização dos receptores nucleares RAR e RXR, outros componentes da homeostasia dos retinóides parecem ser importantes para ativação da via JAK2/STAT5 como, por exemplo, a translocação do retinol da holo-RBP para um receptor intracelular como a CRBP ou a LRAT ou a possível interferência da TTR, impedindo a ligação da holo-RBP com STRA6.(85,86)

A terceira hipótese para explicar a resistência insulínica associada à RBP4, proposta por alguns grupos, é a resposta imunomediada às adipocinas. Há mais de uma década a inflamação crônica do tecido adiposo é reconhecida como passo crucial na patogênese de complicações ligadas à obesidade, especialmente na evolução para quadros de resistência insulínica e diabetes.(87,88) O tecido adiposo é constituído principalmente por adipócitos, porém outras células compõem sua estrutura e contribuem para seu crescimento e função, como os pré-adipócitos, linfócitos, macrófagos, fibroblastos e células vasculares. A obesidade, além de poder levar a mudanças na composição celular do tecido adiposo, pode ainda levar a modulação fenotípica de cada uma dessas células de forma dinâmica, afetando profundamente a função metabólica sistêmica.(89)

Conforme a obesidade se desenvolve, ocorre hipertrofia dos adipócitos, com o aumento dos estoques de triglicérides. Quando esse processo ocorre de forma auto-limitada, o tecido persiste ainda com

funcionamento metabólico habitual e baixa ativação imunológica. Se, por outro lado, o processo se perpetuar, ocorre uma hipertrofia gradativa dos adipócitos, que pode levar a uma hipóxia tecidual por rarefação relativa da vascularização e consequente morte celular destes adipócitos.(90) Os adipócitos liberam adipocinas e quimiocinas que levam à amplificação do recrutamento de macrófagos e linfócitos T-helper (Th). Histologicamente, esse processo forma imagens conhecidas como *crown-like structures*, que representam o acúmulo de macrófagos ao redor do adipócito morto no tecido adiposo inflamado.(91-92)

Conceitualmente, as adipocinas são moléculas sintetizadas no tecido adiposo, com funções autócrinas, parácrinas e endócrinas. Estados de desregulação secretório podem ocorrer tanto em situações de acúmulo excessivo de tecido adiposo (obesidade), como em depleção do tecido adiposo (lipoatrofia). As adipocinas podem ser divididas em antiinflamatórias representada principalmente pela adiponectina, e as pró-inflamatórias representadas pela leptina, resistina, lipocalina-2, RBP4, visfatina (ou NAMPT), entre outras.(90)

No tecido adiposo de não-obesos predominam os macrófagos do tipo M2 (via alternativa) e linfócitos CD4+ e Th2, que têm características anti-inflamatórias e de reparo tecidual.(93-94) O Th2 atua através da liberação IL4, IL10 e IL13. Essas citocinas têm função de conter a expansão das células inflamatórias. Recentemente, foi demonstrado que os linfócitos CD4+ têm papel fundamental na regulação do peso corporal, hipertrofia dos adipócitos e controle da homeostasia de carboidratos, impedindo a

progressão para diabetes e resistência insulínica em camundongos obesos.(95) Por outro lado, no tecido adiposo de obesos são predominantes os macrófagos do tipo M1 (via clássica), linfócitos CD8+ e linfócitos Th1, que têm características pró-inflamatórias.(93-94)

A ativação da imunidade adaptativa parece preceder a ativação da imunidade inata na cascata inflamatória da obesidade.(96) Os linfócitos CD8+ são responsáveis pela diferenciação, ativação e migração dos macrófagos.(96) Os linfócitos Th1, através da liberação de IFN γ , também contribuem para a migração e polarização de macrófagos para M1.(97) Por sua vez, os macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL6 e IL12) e expressam óxido nítrico sintetase (NOS), espécies reativas de oxigênio (ROS) e intermediários de nitrogênios que causam dano tecidual.(97-99) Durante a progressão da obesidade, as concentrações relativamente constantes de CD4+ e Th2, são insuficientes em conter a expansão de linfócito Th1, propiciando a progressão para resistência insulínica.(95)

Interessantemente, foi demonstrado que a RBP4 promove a polarização de células CD4+ para Th1 e induz a expressão de citocinas inflamatórias em macrófagos de ratos e humanos, através da ligação com o Toll-like receptor 4 (TLR4), inibindo a sinalização da insulina através da ativação da via JNK.(100-101) Ou seja, esse mecanismo de indução a resistência insulínica é independente da ligação com STRA6, e independente também da relação da RBP com a hemostasia dos retinóides,

já que tanto a holo como a apo-RBP podem ligar-se ao TLR4 e induzir esse efeito.(100)

A RBP4 é preferencialmente expressa no tecido adiposo visceral quando comparada ao tecido adiposo subcutâneo e níveis elevados de RBP4 estão relacionados à maior circunferência abdominal e maior relação cintura–quadril.(102-103) Medidas como perda de peso secundária à dieta, exercício físico ou cirurgia bariátrica, diminuem os níveis séricos de RBP4, e a queda desses níveis está relacionada à melhora da sensibilidade à insulina e à perda de tecido adiposo visceral, mas não à perda de massa adiposa corporal total.(80,104,105) Outros grupos, no entanto, não obtiveram os mesmos resultados e não foi possível achar associação entre a RBP4 sérica e a distribuição do tecido adiposo, à expressão de RNAm-RBP4 no tecido adiposo ou mesmo aos índices de resistência insulínica, intolerância à glicose e DM2.(106-108)

Algumas possíveis explicações para a incongruência de dados podem estar baseadas na influência de diferentes metodologias usadas nas medições da RBP4. O uso do *western blotting* quantitativo parece ser superior às demais técnicas empregadas, como o ELISA.(80) O modo de coleta e armazenamento da amostra para RBP4 também pode alterar a imunorreatividade da RBP4 devido à interação com anticoagulantes (heparina, EDTA, citrato). Existe ainda especulações sobre possível interferência dos níveis séricos de RBP4 por ação da TTR.(109,110) Camundongos obesos por alteração genética (deficiência de leptina) mostraram níveis mais elevados de TTR quando comparados ao controle e

aos camundongos obesos hiperalimentados, com consequente diminuição da fração de excreção e maiores níveis séricos de RBP4. (110)

Finalmente, e de nosso maior interesse, a sobreposição de disfunção renal, comumente presente nesses pacientes diabéticos e com síndrome metabólica, também pode funcionar como variável de confusão por elevar a RBP4 sérica.(111-117)

1.4 Função renal e RBP sérica

No passado, já havia sido demonstrado a correlação positiva entre os níveis séricos de RBP e de creatinina sérica.(111-112) No entanto, por algum tempo, tal associação ficou esquecida. Mais recentemente, após o surgimento do conceito de RBP4 como adipocina, alguns estudos voltaram a avaliar a interferência da função renal na dosagem de RBP sérica.(113-117)

Henze e cols. estratificaram duas coortes de diabéticos e não diabéticos, de acordo com a depuração de creatinina, demonstrando não haver diferença nos níveis séricos de RBP4 entre os grupos diabético e não-diabético nas diferentes faixas de depuração de creatinina. Entretanto, em ambos os grupos, houve aumento dos níveis de RBP4 associado à diminuição da depuração de creatinina. Neste estudo, não foi observado correlação da RBP4 com os parâmetros de IMC, glicemia de jejum, hemoglobina glicada, colesterol total, HDL e LDL.(116)

Alguns estudos pequenos e limitados avaliaram pacientes em terapia renal substitutiva. RBP4 e PCR mostraram-se mais elevados em pacientes

(não obesos e não diabéticos) em hemodiálise, e também em pacientes renais crônicos em tratamento conservador, em relação ao grupo controle (saudáveis), com a normalização destes valores após transplante renal.(115) O grupo de Ziegelmeier e cols. também descreveu nível de RBP4 quatro vezes mais elevado em pacientes (diabéticos e não diabéticos) em hemodiálise do que no grupo controle com taxa de depuração de creatinina inferior a 50 ml/min/1,73m².(117)

Não fica claro, no entanto, com os dados disponíveis, se a relação da RBP4 sérica com função renal ocorre em função do acúmulo de RBP4 pela queda de filtração, ou em função da associação real entre duas condições de risco cardiovascular. Fica evidente, entretanto, que a função renal é um fator confundidor para elevação de RBP4 e que falta ainda determinar se há relação entre resistência insulínica e RBP4 mesmo nessa população.

A resistência insulínica é comumente presente na população de DRC e está diretamente relacionada com o aumento da morbi mortalidade nesses pacientes, por contribuir com a desnutrição proteico-energética (sarcopenia), aterosclerose e mortes por causas cardiovasculares.(118-122)

Os mecanismos que levam à resistência insulínica na uremia crônica são complexos e multifatoriais, e independem da presença da obesidade. Em obesos com DRC, como na população geral, a inflamação do tecido adiposo parece ter papel central no desenvolvimento de resistência insulínica. No entanto, em não obesos com DRC, o papel do tecido adiposo não está tão bem estabelecido, sendo que outros mecanismos como a possível participação do paratormônio, a acidose crônica, a inflamação

sistêmica e o estresse oxidativo parecem contribuir para esse processo.(123-126) Alguns autores sugerem que o estresse oxidativo provoque uma modulação negativa da expressão de adiponectina (adipocina anti-inflamatória) no tecido adiposo em pacientes com DRC independente da obesidade.(127) Mas não foi possível achar aumento da expressão de RNAm de RBP4 em tecido adiposo de pacientes com DRC não obesos.(115)

Interessantemente, foi ainda demonstrado que parâmetros de síndrome metabólica estão diretamente associados à progressão de DRC. Em estudo recente com 146 pacientes submetidos à nefrectomia eletiva, aqueles com critérios diagnósticos para síndrome metabólica, histologicamente, apresentaram maior prevalência de atrofia tubular, fibrose intersticial, esclerose arterial e glomeruloesclerose segmentar que os controles.(128)

Portanto, o interesse em se avaliar a performance da RBP como marcador de resistência insulínica em DRC, justifica-se pelo seu potencial papel de demonstrar tanto risco cardiovascular como de progressão de DRC.

1.5 RBP e risco cardiovascular

O número de trabalhos que associam a RBP4 a fatores de risco e a eventos cardiovasculares é crescente, mas com resultados ainda conflitantes. Alguns estudos transversais demonstraram que níveis elevados de RBP4 estão relacionados acidente vascular cerebral prévio, à espessura

íntima-média de artérias carótidas e calcificação arterial coronariana.(129-132)

Estudos prospectivos também avaliaram o papel da RBP4 com doença aterosclerótica.(133,134) Na coorte EPIC–Norfolk, incluindo 25.336 participantes da população geral, ocorreram 1.036 casos incidentes de doença coronariana (fatal ou não fatal), que foram comparados a 1.889 pacientes controles (livres do evento no período de seguimento) pareados por sexo, idade e tempo de seguimento. Os níveis de RBP4 mostraram-se significativamente mais elevados nos casos do que no grupo controle. Entretanto, após ajuste para variáveis clássicas de risco cardiovascular, a RBP4 deixou de ser fator independente de risco de evento.(133) No entanto, outro estudo caso-controle com a coorte da Nurse’s Health Study, que comparou 468 mulheres que desenvolveram doença coronariana contra 472 livres do evento, a RBP4 se mostrou como fator de risco para desenvolver doença coronariana, mesmo após ajuste, nos primeiros 8 anos de seguimento.(134) O grupo de Pala e cols. por sua vez, mostrou que a RBP4 está associada à acidente vascular cerebral, mas não à doença coronariana.(135) Nenhum destes estudos contemplou a interferência da função renal nos resultados.

Em estudo transversal, Cabré e cols. avaliaram 165 pacientes diabéticos com disfunção renal, demonstrando que níveis mais elevados de RBP4 estavam associados à creatinina sérica e à presença de eventos ateroscleróticos prévios.(136) No entanto, Chu e cols demonstrou

associação da RBP4 com DRC, mas não com EMIC em população de diabéticos tipo 2.(137)

2 . Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar a associação entre RBP (urinária e sérica) e função renal e fatores de risco cardiovasculares em pacientes com DRC.

2.2 Objetivos secundários

2.2.1 Avaliar associação entre a RBP (urinária e sérica) e as diversas classes da NKF de DRC.

2.2.2 Avaliar a associação entre RBP urinária e sérica e fatores clássicos de risco cardiovascular (DM, HAS, dislipidemia, tabagismo, obesidade, resistência à insulina, etc) e relacionados à DRC (albuminúria, acidose metabólica, hiperparatireoidismo, anemia, etc).

2.2.3 Avaliar a associação entre RBP (urinária e sérica) e metabolismo de carboidratos (glicemia de jejum, Hb-glicada, HOMA e curva glicêmica após sobrecarga de glicose-120min) em pacientes diabéticos e não-diabéticos com DRC.

3 . Casuística e Métodos

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado a partir dos dados iniciais da coorte **“PROGREDIR: Doença Renal Crônica-determinantes de progressão e de risco cardiovascular. Estudo de coorte em população brasileira”**. Esta coorte contempla pacientes já portadores de DRC (coorte secundária), residentes na cidade de São Paulo, oriundos do Hospital das Clínicas.

Inicialmente, junto aos serviços de tecnologia da informação do Hospital das Clínicas e do Incor foram geradas listas com dados de contatos de potenciais candidatos ao estudo de coorte. Os critérios de inclusão foram: pacientes ambulatoriais, acima de 30 anos de idade, com duas dosagens de creatinina entre janeiro de 2009 a setembro de 2013 maior ou igual a 1,6 mg/dL para homens e maior ou igual a 1,4 mg/dL para mulheres (com intervalo mínimo de 3 meses). A partir dessas listas geradas foram excluídos sistematicamente pacientes oriundos de ambulatórios de especialidades oncológicas, especialidades cirúrgicas, psiquiatria, reumatologia, infectologia e ambulatórios de glomerulopatias da nefrologia.

O paciente candidato ao estudo era então abordado através de contato telefônico, no qual nossos entrevistadores faziam uma explicação sobre o projeto e checavam a existência de critérios de exclusão. Os critérios de exclusão na entrevista telefônica foram: internação nos últimos 6 meses, infarto agudo do miocárdio nos últimos 6 meses, intervenção hospitalar programada para os próximos 6 meses, estar em diálise, doenças

reumatológicas, glomerulonefrites agudas ou em atividade, tratamento atual com drogas imunossupressoras ou quimioterápicos, gestantes, pacientes portadores de doença mental, pacientes portadores de deficiência auditiva grave, participação atual em ensaio clínico, HIV positivo, hepatite B ou C. Aqueles pacientes elegíveis que se manifestavam favoráveis à participação no estudo eram orientados a comparecer em dia agendado, em jejum e já com coleta de urina de 24 horas, ao Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU).

No dia da visita agendada, o participante era recebido por nossa equipe, procedendo-se novamente uma explicação sobre o estudo, seu caráter voluntário, confidencialidade, propósitos de pesquisa, riscos e a programação do dia. Procedia-se então à assinatura do termo de consentimento informado. A seguir, o participante era submetido à seguinte rotina:

- Coleta de exames de sangue em jejum e de urina de amostra isolada;
- Aplicação de sobrecarga oral de glicose (para realização de curva glicêmica- 120 min) para aqueles não-diabéticos;
- Questionário de história médica pessoal e familiar;
- Questionário nutricional realizado por nutricionista treinada para aplicação de questionário de frequência alimentar;
- Antropometria, incluindo peso, altura, medidas de pressão arterial, medidas de cintura e de quadril;

- Realização de eletrocardiograma, variabilidade de frequência cardíaca, ecodopplercardiograma, retinografia, medida de velocidade de onda de pulso (VOP), medida de índice de espessura de carótida, USG de fígado para avaliação de diâmetro ântero-posterior do lobo hepático direito, tomografia para determinação de escore de cálcio.

Não foi fornecido nenhum tipo de ressarcimento pela aceitação de participação no estudo, caracterizando-se sempre desde o início seu caráter voluntário. No entanto, durante o período de realização de exames, o participante recebia duas refeições, lanche e almoço, assim como auxílio transporte.

O estudo utilizou amplamente a infra-estrutura física e humana do Centro de estudo ELSA-Brasil, que tem sede no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário (HU).

3.1 Biorrepositório e dosagens laboratoriais

O soro coletado foi separado em amostras para realização de exames laboratoriais já previstos para análise inicial e alíquotas que foram estocados em tanque de nitrogênio no CPC-HU. A bioteca armazenada incluiu 16 alíquotas de soro, 4 alíquotas de soro pós sobrecarga de glicose, 3 de plasma, 3 de plasma citratado, 4 de urina de amostra isolada e 5 de urina de 24h. Além disso, foi feita a extração de DNA genômico, armazenado no Laboratório de Genética Cardiovascular do Incor.

Os exames realizados já na linha de base foram: uréia, creatinina, hemograma, sódio, potássio, cálcio total, fósforo, gasometria venosa, ferro, ferritina, proteína total e frações, colesterol total e frações, triglicérides, proteína C reativa ultra-sensível, glicemia, hemoglobina glicada, insulina, curva glicêmica após 120 minutos, todos em soro; albuminúria, creatinina, RBP em urina de amostra isolada; e proteinúria, uréia, creatinina, sódio, potássio, fósforo, cálcio em urina de 24h.

Para avaliação da função renal foram ainda calculadas as taxas de depuração de creatinina, MDRD e Cockcroft-Gault, e para avaliação de resistência insulínica foram calculados o HOMA-IR (resistência periférica) e HOMA beta (resistência pancreática).

Todas as dosagens foram feitas no Laboratório Clínico do Hospital Universitário, seguindo métodos padronizados. A RBP urinária foi dosada no Laboratório Clínico do Hospital do Rim e da Hipertensão – Unifesp usando o método imunoenzimático com anticorpo monoclonal e expressa em mg/g de creatinina (intervalo de referência: 0,10-2,7mg/g creatinina).(138) A RBP sérica, por sua vez, foi medida também no Hospital do Rim e da Hipertensão – Unifesp, através de turbidimetria com anticorpo policlonal de coelho dirigido contra RBP humana (DAKO / Biogen; intervalo de referência 26-60mg/L).

3.2 Exames complementares

Para avaliação da esteatose hepática foi utilizado método a medida do diâmetro ântero-posterior do lobo direito do fígado. Pacientes com esteatose apresentam um aumento desse diâmetro. As imagens do fígado foram obtidas com equipamento padronizado (Toshiba SSA-770A Aplio, Japão) e transdutor de banda larga convexo (PVT-375BT) com frequência central de 3,5 MHz (2,5 MHz-5,5 MHz). O transdutor era posicionado no espaço intercostal, utilizando a vesícula biliar e a veia cava inferior como reparos anatômicos para ajuste e controle do ganho na obtenção da imagem do parênquima hepático, permitindo ajuste da técnica para o biótipo do participante. A análise da ecogenicidade do parênquima hepático é feita pela atenuação do feixe acústico, que aumenta em presença de esteatose. A visualização do diafragma foi o parâmetro utilizado para a avaliação semiquantitativa da atenuação do feixe acústico com três graus considerados nessa análise: diafragma bem visualizado (normal), parcialmente visualizado e não visualizado. A medida foi realizada traçando-se uma linha reta perpendicular ao plano da pele no eixo ântero-posterior do lobo hepático direito, unindo a superfície hepática anterior e o ângulo hepato-diafragmático posterior.

O ecodopplercardiograma foi realizado em todos os pacientes pelo mesmo ecocardiografista. As imagens foram obtidas com transdutor setorial de 2.5 MHZ em aparelho (Aplio XG, Toshiba). A leitura considerou análises quantitativas e qualitativas, incluindo tamanho do ventrículo esquerdo (VE), do átrio esquerdo AE, espessura da parede posterior e septo, funções

sistólica e diastólica do VE, disfunção segmentar, lesões valvulares e aspecto do pericárdio.

A VOP carotídeo-femoral foi medida com aparelho automático validado (Complior, Artech Medica, França) com o participante deitado em sala com temperatura controlada (20°C- 24°C). Antes da medida da VOP, a PA era aferida na posição deitada com aparelho oscilométrico (Omron HRM 705 CP) no braço direito. A medida da distância da fúrcula do esterno até o pulso femoral direito foi realizada com fita métrica. Não se levou em consideração a curvatura abdominal na medida da distância. Os sensores de pulso eram posicionados nas artérias carótida e femoral direitas, permitindo a visualização das ondas de pulso em tela de computador. Um software identificava as ondas de pulso com boa qualidade de registro. A VOP foi calculada dividindo-se a distância da fúrcula até o pulso femoral pela defasagem temporal entre os pulsos carotídeo e femoral. A VOP de cada participante foi calculada pela média aritmética obtida em dez ciclos cardíacos consecutivos em ritmo cardíaco regular.

A espessura médio-intimal das carótidas (EMIC) foi medida em todos os participantes de forma padronizada em equipamento (Aplio XGTM, Toshiba) com transdutor linear de 7,5 MHz. A bifurcação das carótidas foi analisada na extensão de 3 cm para pesquisa de placas, além da coleta da imagem das carótidas comuns ao longo de 1 cm, iniciando-se 1 cm abaixo da bifurcação. A leitura do exame foi centralizada e automatizada, utilizando-se o software MIATM com imagens de três ciclos cardíacos,

sendo o valor da EMIC calculado pela média das carótidas direita e esquerda.

A tomografia torácica para avaliação da calcificação arterial coronariana (CAC) foi realizada com um escâner de 64 detectores (Phillips Brilliance, Philips Healthcare, Andover, EUA), utilizando principalmente a aquisição prospectiva, com 120 kV e mA ajustados para o biótipo. A CAC foi calculada utilizando software específico e os resultados foram apresentados como o escore de Agatston.

3.3 Tamanho amostral e análises estatísticas

O tamanho de amostra foi calculado em função do objetivo principal da coorte que é a avaliação de desfechos clínicos renais e cardiovasculares prospectivamente e não propriamente em função das análises transversais da linha de base do estudo. A partir de dados de literatura, considerando-se que a taxa anual de progressão em nefropatia diabética é de aproximadamente 2% ao ano e que a taxa de eventos cardiovasculares associada a pacientes com nefropatia diabética é de 2- 3,5% ao ano, e que estas taxas podem ser menores em pacientes portadores de nefropatia não-diabética, calculamos que para uma coorte inicial de 500 pacientes, teríamos aproximadamente 5-10 pacientes apresentando desfechos renais e 5-10 pacientes com eventos cardiovasculares a cada ano.(139) Com esta taxa de eventos, poderíamos fazer as primeiras análises comparativas com poder estatístico após um período de 5-10 anos de seguimento da coorte.

Para as análises descritivas as variáveis contínuas paramétricas foram apresentadas como média e desvio padrão e as não-paramétricas como mediana e intervalo interquartil. Nas análises de tercís de RBP urinária e sérica, para avaliação das diferenças entre os grupos, foi calculado os p valores utilizando os testes: Qui-quadrado para as variáveis categóricas; ANOVA para variáveis contínuas e Kruskal-Wallis para as assimétricas. Foram também calculados os coeficientes e os p valores das correlações de Spearman para as diversas variáveis.

Os modelos de regressão linear uni e multivariados foram construídos utilizando o log de RBP urinária e sérica como variáveis dependentes. Para avaliação da interferência da albuminúria no modelo de regressão multivariada sobre log de RBP urinária a amostra foi previamente estratificada em normoalbuminúricos, microalbuminúricos e macroalbuminúricos.

Devido à distribuição assimétrica e unicaudal da variável calcificação arterial coronariana (CAC), optamos por analisá-la separadamente, fixando-a como variável resposta e utilizando o modelo linear generalizado gama com função de ligação (g). A seguir, depuramos o modelo usando o critério de informação de Akaike generalizado (*stepwise*), para avaliar quais variáveis explicaram o comportamento da variável CAC

Para todos os testes utilizamos o modelo bicaudal, estabelecendo o nível de significância em 5%. Utilizamos o software SPSS® for Windows versão 17.0 para a maioria das análises e o R® for Windows para o modelo linear generalizado.

3.4 Recursos financeiros

O estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (processo 2011/17341-0). Além disso, a formação da linha de base da coorte foi amplamente assegurada pela estrutura de equipamentos e de pessoal já existente no Centro do Pesquisa Clínica do HU / ELSA-Brasil.

3.5 Comitês de ética

Como o estudo foi realizado no CPC-HU, mas os pacientes foram captados do Hospital das Clínicas-FMUSP, registramos o HC como Instituição Co-Participante na CONEP e apresentamos o projeto aos dois comitês de Ética – CEP-HU e Cappelq, ambos aprovados.

4 . Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Características clínicas dos pacientes recrutados

Ao longo de 2 anos de recrutamento, foram captados 454 participantes para a coorte. As listas geradas pela PRODESP e pela Informática do Incor totalizaram 3585 e 2203 pacientes HC potencialmente candidatos ao estudo. Na abordagem telefônica inicial, entretanto, o número de perdas foi muito elevado e multifatorial. Entre os diversos motivos, listamos a não possibilidade de contato em função de números de telefones incorretos (mudança de endereço, troca de celulares), óbitos, recusa em participar e presença de critérios de exclusão durante a entrevista telefônica. Mesmo entre aqueles que concordavam inicialmente em participar, observamos uma perda média de 30-40% no agendamento realizado. Assim, apesar do número aparentemente grande de pacientes HC/INCOR candidatos a participar da coorte, encerramos nossa fase de recrutamento com amostra um pouco inferior ao planejado (500 pacientes).

As Tabelas 1 e 2 mostram as características clínicas e laboratoriais destes pacientes ao ingresso no estudo. A maioria dos pacientes da coorte era do sexo masculino, de baixa escolaridade, cor branca (auto-referida) e com idade média avançada (67,5 anos). A amostra apresentou alta prevalência de hipertensos (90%), e quase metade era composta por diabéticos. A função renal média estimada pela fórmula MDRD foi de 37,7ml/min/1.73 m².

Tabela 1. Características clínicas e parâmetros cardiovasculares dos 454 pacientes da coorte PROGREDIR

	Todos n=454	
Idade (anos; média/dp)	67,5	11,9
Sexo masculino (n/%)	287	63,2%
Cor de pele (auto-referida: branca; n/%)	300	66,1%
2° grau completo ou mais (n/%)	142	31,3%
HAS (n/%)	409	90,1%
DM (n/%)	208	45,8%
Hipercolesterolemia (n/%)	282	62,1%
IAM (n/%)	147	32,4%
AVC (n/%)	73	16,1%
Doença renal conhecida (n/%)	381	83,9%
Nefrologista (n/%)	249	54,8%
Tabagismo (n/%)	270	59,5%
PAS (mmHg; média/dp)	140	24,1
PAD (mmHg; média/dp)	76,2	12,9
FC (BPM; mediana/IQ)	64	58 - 72,3
IMC (média/dp)	29,4	5,4
RCQ (média/dp)	0,97	0,10
Diâmetro lobo hepático (mm; média/dp)	104,8	12,9
VOP (m/s; média/dp)	12,8	3,0
ECO Ao (mm; média/dp)	34,4	4,2
ECO AE (mm; média/dp)	41,4	5,4
ECO Vd (mm; mediana/IQ)	24	21 - 26
ECO Siv (mm; mediana/IQ)	12	11 - 13,5
ECO Ddve (mm; mediana/IQ)	50	46 - 54
ECO Ppve (mm; mediana/IQ)	11	10 - 12,0
ECO Dsve (mm; mediana/IQ)	31	28 - 37
ECO Fe (mediana/IQ)	0,7	0,6 - 0,7
MassaVE index (g/m ² ; média/dp)	130,6	37,4
EMIC (mm; média/dp)	0,75	0,20
Escore de Agatston (pontos; mediana/ IQ)	165	8 - 785
Agaston>0 (n/%)	295	79,3%
Agaston >100 (n/%)	205	55,1%

Tabela 2. Características laboratoriais dos 454 pacientes da coorte

PROGREDIR

		Todos n=454
Sódio (mEq/L; mediana/IQ)	142	140 - 144
Potássio (mEq/L; média/dp)	4,6	0,5
Uréia (mg/dL; mediana/IQ)	69	54 - 89
Creatinina (mg/dL; mediana/IQ)	1,7	1,4 - 2,1
Albuminúria (mg/g; mediana/IQ)	80	15 - 640
Proteinúria 24h (g/dL/1.73 m ² ; mediana/IQ)	0,17	0,08 - 0,61
RBP urinária/creatinina (mg/g; mediana/IQ)	0,29	0,08 - 1,47
Cl.cr-CG (mL/min/1.73 m ² ; média/dp)	41,9	15,9
Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m ² ; média/dp)	37,7	13,6
Fósforo (mg/dL; média/dp)	3,6	0,6
Cálcio total (mg/dL; média/dp)	9,6	0,6
Fosfatase alcalina (mg/dL; mediana/IQ)	74,5	57 - 97
Paratormônio (pg/mL; mediana/IQ)	93	64 - 143
Fração de excreção de fósforo- urina de 24h (%; média/dp)	27	14,1
RBP sérica (mg/L; mediana/IQ)	66,1	55,2 - 79,8
Glicemia (mg/dL; mediana/IQ)	104	95 - 126
Hemoglobina glicada (%; mediana/IQ)	6,2	5,8 - 7,2
Glicemia 2h pós TTOG 75g (mg/dL; média/dp)*	155	51,8
HOMA-IR (mediana/IQ)*	3,4	2,3 - 5,8
HOMA-Beta (média/dp)*	163,6	98,7
Insulinemia (μUI/mL; mediana/IQ)	16,1	10,4 - 25,4
Colesterol total (mg/dL; média/dp)	168,6	39,9
LDL-Colesterol (mg/dL; média/dp)	91,4	32,2
HDL- Colesterol (mg/dL; média/dp)	46	14,3
Triglicérides (mg/dL; mediana/IQ)	142	99 - 192
pH (média/dp)	7,4	0,04
Bicarbonato (mmol/L; média/dp)	25,6	2,9
Hemoglobina (g/dL; média/dp)	13,1	1,9
Ferro (mcg/dL; média/dp)	77,1	28,3
Ferritina (ng/mL; mediana/IQ)	104	52 - 197
PCR (mg/L; mediana/IQ)	2,8	1 - 6,5
Albumina (g/dL; média/dp)	4,3	0,3

* calculado apenas para não-diabéticos

Como esperado, no estudo predominaram pacientes classes de DRC-NKF III e IV (64,8% e 26,2% respectivamente).(tabela 3)

Tabela 3. Prevalência das classes de DRC-NKF na população 454 pacientes

DRC- NKF	Todos	
	n	%
II	26	5,7%
III	294	64,8%
IV	119	26,2%
V	11	2,4%
II e III	320	70,5%
IV e V	130	28,6%

4.2 RBP urinária

A Figura 3 mostra a distribuição da variável RBP urinária, que apresentou comportamento assimétrico na população estudada.

Figura 3. Histograma de RBP urinária

Para avaliar a relação entre a dosagem de RBP urinária e as diversas variáveis clínico-laboratoriais, estratificamos a amostra de acordo com os tercís de RBP urinária/creatinina urinária (RBPu) (tabelas 4 e 5). Nota-se que a RBPu associa-se a sexo feminino, diabetes, dislipidemia, PAS, e inversamente à relação cintura quadril (RCQ) e história prévia de IAM.

Tabela 4. Características clínicas e parâmetros cardiovasculares dos 454 pacientes da coorte PROGREDIR de acordo com os tercís de RBP urinária

	Tercil 1-RBPu n=144		Tercil 2-RBPu n=144		Tercil 3-RBPu n=144		p
Idade (anos; média/dp)	67,5	12	67,8	11,3	66,5	12,4	0,64
Sexo masculino (n/%)	108	75%	83	57,6%	84	58,3%	0,002
Cor de pele (auto-referida: branca; n/%)	90	62,5%	97	67,8%	98	69,5%	0,42
2º grau completo ou mais (n/%)	40	27,8%	47	32,6%	48	33,6%	0,52
HAS (n/%)	131	91%	125	87,4%	135	93,8%	0,18
DM (n/%)	53	36,8%	72	50,3%	76	53,1%	0,04
Dislipidemia (n/%)	80	55,9%	96	67,1%	97	68,3%	0,002
IAM (n/%)	47	32,9%	52	36,4%	44	30,8%	0,004
AVC (n/%)	27	19,1%	30	21,4%	15	10,8%	0,09
Doença renal conhecida (n/%)	114	79,2%	116	81,1%	133	93%	0,004
Nefrologista (n/%)	64	45,1%	69	48,9%	103	72,5%	<0,0001
Tabagismo (n/%)	93	64,6%	81	56,6%	86	59,7%	0,38
PAS (mmHg; média/dp)	133,1	20,3	140,3	25,1	146,3	24,3	<0,0001
PAD (mmHg; média/dp)	74,2	12,3	76,5	13,6	77,5	12,2	0,08
FC (BPM; mediana/IQ)	63,3	57,7 - 73,7	63,7	57,7 - 71,2	64,7	58,5 - 72	0,58
IMC (média/dp)	30,3	6,5	29,1	4,6	29	5,1	0,11
RCQ (média/dp)	1,00	0,13	0,97	0,08	0,97	0,09	0,014
Diâmetro lobo hepático (mm; média/dp)	105,7	14,8	104,5	12,6	104,2	11,4	0,58
VOP (m/s; média/dp)	12,1	3,1	12,5	2,8	13,6	2,8	<0,0001
ECO Ao (mm; média/dp)	34,4	4,1	34,2	3,9	34,7	4,6	0,69
ECO AE (mm; média/dp)	42,5	5,6	41,7	6,2	40,2	4,1	0,001
ECO Vd (mm; mediana/IQ)	24	21 - 26	24	21 - 26	23	20 - 25	0,16
ECO Siv (mm; mediana/IQ)	12	10,0 - 14,0	12	11 - 13,0	12	11 - 14,0	0,17
ECO Ddve (mm; mediana/IQ)	52	47 - 56	50	46 - 54	48	45 - 52,5	0,003
ECO Ppve (mm; mediana/IQ)	11	10 - 12,0	11	10 - 12,0	12	10 - 12,0	0,32
ECO Dsve (mm; mediana/IQ)	32	29 - 40	30	28 - 36	30	27 - 34	0,001
ECO Fe (mediana/IQ)	0,62	0,53 - 0,69	0,67	0,58 - 0,70	0,67	0,6 - 0,70	<0,0001
Massa VE index (g/m²; média/dp)	130,8	36,2	133,2	41,7	127,5	32,9	0,44
EMIC (mm; média/dp)	0,77	0,24	0,73	0,19	0,73	0,18	0,13
Escore de Agatston (pontoss; mediana/ IQ)	134,0	8 - 635	174,0	2 - 1002	166	2,5 - 786	0,76
Agaston>0 (n/%)	93	79,5%	88	77,2%	98	79%	0,90
Agaston>100 (n/%)	63	53,8%	62	54,4%	69	55,6%	0,96

Kruskal-Wallis para variáveis contínuas não-paramétricas, ANOVA para contínuas paramétricas e qui-quadrado para categóricas

Tabela 5. Características laboratoriais dos 454 pacientes da coorte

PROGREDIR de acordo com os tercís de RBP urinária

	Tercil 1-RBPu n=144		Tercil 2-RBPu n=144		Tercil 3-RBPu n=144		p
Sódio (mEq/L; mediana/IQ)	142	141 - 144	142	140 - 144	143	141 - 145	0,03
Potássio (mEq/L; média/dp)	4,6	0,5	4,5	0,5	4,7	0,5	0,001
Uréia (mg/dL; mediana/IQ)	63	50 - 89	64	51 - 79	80	63,5 - 97	<0,0001
Creatinina (mg/dL; mediana/IQ)	1,6	1,3 - 1,9	1,5	1,3 - 1,8	2,1	1,7 - 2,6	<0,0001
Albuminúria (mg/g; mediana/IQ)	17	11 - 119	61	21 - 310	654	94 - 1759	<0,0001
Proteinúria 24h (g/dL/1.73 m ² ; mediana/IQ)	0,08	0,06 - 0,17	0,14	0,09 - 0,33	0,71	0,24 - 1,80	<0,0001
RBP urinária/creatinina (mg/g; mediana/IQ)	0,05	0,03 - 0,08	0,29	0,18 - 0,42	3,09	1,47 - 10,69	<0,0001
Cl.cr-CG (mL/min/1.73 m ² ; média/dp)	46,2	17,9	45,9	15	33,7	11,6	<0,0001
Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m ² ; média/dp)	41,7	14,3	42,1	12,5	29,3	10,1	<0,0001
Fósforo (mg/dL; média/dp)	3,6	0,7	3,6	0,6	3,8	0,6	<0,0001
Cálcio total (mg/dL; média/dp)	9,5	0,6	9,6	0,5	9,5	0,6	0,16
Fosfatase alcalina (mg/dL; mediana/IQ)	72	55,5 - 92,5	76	55,0 - 93	78	61,5 - 104	0,04
Paratormônio (pg/mL; mediana/IQ)	88	55,0 - 136,0	88	63,5 - 126	114	77,0 - 184	0,001
Fração de excreção de fósforo- urina de 24h (%; média/dp)	25,7	13,1	23,3	16,3	31,9	11,8	<0,0001
RBP sérica (mg/L; mediana/IQ)	63,3	51,1 - 77,6	60,5	53,9 - 78,3	75	62,1 - 85,7	<0,0001
Glicemia (mg/dL; mediana/IQ)	102	95 - 120,5	108,5	94,5 - 129,5	107,5	92,5 - 136	0,69
Hemoglobina glicada (%; mediana/IQ)	6,1	5,7 - 6,7	6,3	5,8 - 7,5	6,4	5,9 - 7,7	0,003
Glicemia 2h pós TTOG 75g (mg/dL; média/dp)*	163	52,7	145,1	48,1	155,1	54,5	0,13
HOMA-IR (mediana/IQ)*	4,2	2,4 - 6,5	2,9	2,2 - 5,0	2,8	2,2 - 5,3	0,02
HOMA-Beta (média/dp)*	184	111,4	149	86,3	153,5	97	0,05
Insulinemia (μU/mL; mediana/IQ)	17,1	10,9 - 26,6	16,4	11,4 - 25,5	14,5	9,8 - 24,6	0,30
Colesterol total (mg/dL; média/dp)	161,9	35,3	169,8	42,6	173,6	41,7	0,04
LDL-Colesterol (mg/dL; média/dp)	89	28,4	90,3	35,4	93,9	33,1	0,42
HDL-Colesterol (mg/dL; média/dp)	42,9	10,8	47,2	17,6	47,7	13,7	0,007
Triglicérides (mg/dL; mediana/IQ)	143	101,5 - 188	141	99,5 - 204	141	94,0 - 196,5	0,89
pH (média/dp)	7,36	0,04	7,36	0,04	7,34	0,04	<0,0001
Bicarbonato (mmol/L; média/dp)	25,9	3,0	26,1	2,7	24,6	2,9	<0,0001
Hemoglobina (g/dL; média/dp)	13,5	2,0	13,2	1,7	12,7	1,9	0,003
Ferro (mcg/dL; média/dp)	81,8	30	77,4	27,6	72,1	25,4	0,01
Ferritina (ng/mL; mediana/IQ)	115,7	67,3 - 203,3	96,7	46,4 - 191,8	99	51,5 - 208,3	0,11
PCR (mg/L; mediana/IQ)	2,7	1,1 - 6,5	2,8	1,1 - 5,9	2,5	0,7 - 7,2	0,70
Albumina (g/dL; média/dp)	4,3	0,3	4,4	0,3	4,2	0,3	0,001

Kruskal-Wallis para variáveis contínuas não-paramétricas, ANOVA para contínuas paramétricas e qui-quadrado para categóricas

* calculado apenas para não-diabéticos

Houve ainda relação inversa da RBPu com as medidas de função renal e associação positiva com proteinúria. Outros parâmetros relacionados a DRC também associaram-se à RBP urinária: variáveis do metabolismo ósseo (fósforo, fosfatase alcalina e PTH), anemia (Hb e ferro), acidose (pH e bicarbonato) e albumina. Houve também associação da RBPu com a RPB sérica, Hb glicada, inversamente ao HOMA-IR e HOMA-beta, e positivamente ao colesterol total e HDL.

Em relação às variáveis de avaliação cardiovascular, a velocidade de onda de pulso (VOP) mostrou boa relação com diferentes tercís de RBP urinária, porém não foi possível encontrar relação da RBP urinária com EMIC ou CAC. Interessantemente, as medidas ecocardiográficas do átrio esquerdo (ECO AE), do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (ECO-Ddve), do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (ECO-Dsve) e da fração de ejeção (ECO-Fe), apresentaram relação com a RBP urinária, porém, no sentido inverso ao inicialmente esperado, ou seja, quanto maior a RBP urinária, menor a dilatação das câmaras e a fração de ejeção.

Os achados anteriores foram essencialmente confirmados pelas análises de correlação de Spearman da RBPu com as diversas variáveis clínico-laboratoriais (Tabela 6), apenas diferindo nesse modelo a correlação da RBPu com PAD e ECO-VD.

Em relação às classes de DRC-NKF, após estratificação pelos tercís de RBPu, percebe-se claramente, maior prevalência de classes mais avançadas de DRC no tercil mais elevado de RBPu (Tabela 7).

Tabela 6. Correlações de variáveis clínico-laboratoriais com RBP urinária

	R	p		R	p
Idade	-0,054	0,26	Cl.cr-CG	-0,349	<0,0001
PAS	0,227	<0,0001	Cl.cr-MDRD	-0,446	<0,0001
PAD	0,110	0,02	Fósforo	0,237	<0,0001
FC	0,029	0,54	Cálcio total	-0,077	0,11
IMC	-0,056	0,24	Fosfatase alcalina	0,137	0,004
RCQ	-0,108	0,03	Paratormônio	0,184	0,0001
Diâm. Lobo Hepático	-0,063	0,20	RBP sérica	0,230	<0,0001
VOP	0,237	<0,0001	Glicemia	0,043	0,37
ECO Ao	-0,002	0,96	Hemoglobina glicada	0,177	0,0002
ECO AE	-0,148	0,002	Glicemia 2h pós TTOG 75g	-0,113	0,10
ECO Vd	-0,105	0,03	HOMA-IR	-0,171	0,009
ECOSiv	0,051	0,29	HOMA-Beta	-0,134	0,04
ECO Ddve	-0,153	0,002	Insulinemia	-0,051	0,29
ECO Ppve	0,045	0,35	Colesterol total	0,105	0,03
ECO Dsve	-0,176	0,0003	LDL-Colesterol	0,052	0,28
ECO Fe	0,184	0,0001	HDL-Colesterol	0,128	0,008
MassaVE Index	-0,042	0,39	Triglicérides	0,012	0,80
EMIC	-0,076	0,13	pH	-0,142	0,003
Sódio	0,079	0,10	Bicarbonato	-0,181	0,0002
Potássio	0,133	0,006	PCR	-0,048	0,32
Uréia	0,245	<0,0001	Hemoglobina	-0,214	<0,0001
Creatinina	0,367	<0,0001	Ferro	-0,142	0,003
Albuminúria	0,516	<0,0001	Ferritina	-0,052	0,28
Proteinúria 24h	0,557	<0,0001	Albumina	-0,148	0,002

Spearman (não paramétrico)

Tabela 7. Classes de DRC-NKF de acordo com os tercís de RBPu urinária

DRC- NKF	Tercil 1-RBPu		Tercil 2-RBPu		Tercil 3-RBPu		P
	n	%	n	%	n	%	
II	10	6,9%	15	10,4%	1	0,7%	<0,0001
III	108	75%	109	75,7%	62	43,4%	
IV	21	14,6%	20	13,9%	74	51,7%	
V	5	3,5%	0	0%	6	4,2%	
II e III	118	81,9%	124	86,1%	63	44,1%	<0,0001
IV e V	26	18,1%	20	13,9%	80	55,9%	

Para as análises de regressão linear, a variável RBPu foi transformada em logaritmo, para garantir sua distribuição normal (gaussiana) para realização do modelo. Na regressão linear univariada, conforme observado nos modelos anteriores, a RBPu manteve relação com diabetes, sexo, PAS, RCQ, VOP, ECO-AE, ECO-Ddve, ECO-Dsve e Fe (Tabela 8). Entre as variáveis laboratoriais, também mantiveram relação com RBPu as variáveis de função renal, albuminúria, proteinúria, fósforo, fosfatase alcalina, PTH, colesterol total, HDL colesterol, Hb-glicada, HOMA-IR, pH, bicarbonato, hemoglobina, ferro e albumina (Tabela 8). Nesse modelo, a PAD, o ECO VD e a glicemia também se relacionaram com a RBPu (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8. Regressão linear univariada de variáveis clínicas e parâmetros cardiovasculares sobre log de RBP urinária

	B	Std. Error	IC-95%		p
Idade (anos)	-0,004	0,004	-0,011	0,004	0,33
Sexo (masculino)	-0,275	0,088	-0,447	-0,103	0,002
DM	0,303	0,084	0,138	0,469	<0,0001
HAS	0,101	0,147	-0,188	0,390	0,49
IAM	-0,054	0,091	-0,233	0,124	0,55
AVC	-0,188	0,113	-0,412	0,035	0,10
PAS (mmHg)	0,010	0,002	0,006	0,013	<0,0001
PAD (mmHg)	0,008	0,003	0,001	0,014	0,02
IMC	-0,009	0,008	-0,024	0,006	0,25
RCQ	-1,060	0,425	-1,895	-0,225	0,01
Diâm. lobo hepático (mm)	-0,004	0,003	-0,010	0,003	0,26
VOP (m/s)	0,069	0,015	0,040	0,099	<0,0001
ECO Ao (mm)	-0,002	0,010	-0,022	0,019	0,87
ECO AE (mm)	-0,023	0,008	-0,039	-0,008	0,003
ECO VD (mm)	-0,024	0,010	-0,043	-0,004	0,02
ECO Siv (mm)	0,014	0,022	-0,028	0,057	0,50
ECO Ddve (mm)	-0,012	0,006	-0,023	-0,001	0,03
ECO Ppve (mm)	0,020	0,025	-0,029	0,069	0,42
ECO Dsve (mm)	-0,011	0,004	-0,019	-0,002	0,02
ECO FE	1,055	0,313	0,439	1,671	0,001
Massa VE index (g/m²)	-0,001	0,001	-0,003	0,001	0,51
EMIC (mm)	-0,325	0,218	-0,754	0,103	0,14

Tabela 9. Regressão linear univariada de variáveis laboratoriais sobre log de RBP urinária

	B	Std. Error	IC-95%		p
Sódio (mEq/L)	0,017	0,010	-0,002	0,036	0,08
Potássio (mEq/L)	0,260	0,082	0,100	0,420	0,002
Uréia (mg/dL)	0,007	0,001	0,004	0,010	<0,0001
Creatinina (mg/dL)	0,385	0,053	0,281	0,489	<0,0001
Albuminúria (mg/g)	0,0003	0,00003	0,0002	0,0003	<0,0001
Proteinúria 24h (g/dL/1.73 m ²)	0,324	0,033	0,260	0,388	<0,0001
Cl.cr-CG (ml/min/1.73 m ²)	-0,020	0,002	-0,024	-0,015	<0,0001
Cl.cr-MDRD (ml/min/1.73 m ²)	-0,028	0,003	-0,034	-0,023	<0,0001
Fósforo (mg/dL)	0,333	0,065	0,205	0,461	<0,0001
Cálcio total (mg/dL)	-0,133	0,076	-0,282	0,017	0,08
Fosfatase alcalina (mg/dL)	0,002	0,001	0,0003	0,003	0,02
Paratormônio (pg/mL)	0,002	0,0004	0,001	0,002	0,0004
Colesterol total (mg/dL)	0,002	0,001	0,000	0,004	0,03
LDL-Colesterol (mg/dL)	0,002	0,001	-0,001	0,004	0,23
HDL-Colesterol (mg/dL)	0,007	0,003	0,002	0,013	0,01
Triglicérides (mg/dL)	0,0003	0,0005	-0,001	0,001	0,45
RBP sérica (mg/L)	0,005	0,002	0,002	0,008	0,001
Glicemia (mg/dL)	0,003	0,001	0,001	0,004	0,006
Hemoglobina glicada (%)	0,089	0,029	0,031	0,147	0,003
Glicemia 2h pós TTOG 75g (mg/dL)	-0,002	0,001	-0,004	0,001	0,13
HOMA-IR	-0,039	0,017	-0,072	-0,006	0,02
HOMA-Beta	-0,001	0,001	-0,002	0,000	0,16
Insulinemia (μUI/mL)	-0,001	0,001	-0,003	0,002	0,59
pH	-4,656	1,079	-6,777	-2,535	<0,0001
Bicarbonato (mmol/L)	-0,066	0,014	-0,094	-0,039	<0,0001
Hemoglobina (g/dL)	-0,103	0,022	-0,146	-0,060	<0,0001
Ferro (mcg/dL)	-0,005	0,002	-0,008	-0,002	0,001
Ferritina (ng/mL)	-0,0001	0,0003	-0,001	0,0005	0,77
PCR (mg/L)	-0,002	0,002	-0,006	0,002	0,37
Albumina (g/dL)	-0,498	0,136	-0,766	-0,230	<0,0001

Como há grande covariância entre as variáveis estudadas, foram realizados diversos modelos de ajuste para compreender as interferências

entre elas. A princípio, foram realizados modelos de regressão linear ajustada pelas principais variáveis de confusão: depuração de creatinina avaliada por MDRD, idade, sexo, diabetes, PAS e albuminúria (Tabela 10). Neste modelo, excluindo a variável sexo, todos foram fatores independentemente associados com log de RBPu. A seguir, outras variáveis significativas nas análises anteriores, foram adicionadas ao modelo prévio (Tabela 11). Todas as variáveis significativas desses modelos (Tabelas 10 e 11) foram então avaliadas num modelo geral e em *stepwise*, conforme mostrados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 10. Regressão linear multivariada de variáveis clínico-laboratoriais sobre log de RBP urinária

	Modelos	B	Std. Error	IC-95%		p
¹	Cl.cr-MDRD (ml/min/1.73 m ²)	-0,028	0,003	-0,034	-0,023	<0,0001
²	Cl.cr-MDRD (ml/min/1.73 m ²)	-0,028	0,003	-0,033	-0,022	<0,0001
	Idade (anos)	-0,006	0,003	-0,012	0,0003	0,06
	Sexo (masculino)	-0,098	0,081	-0,258	0,062	0,23
³	Cl.cr-MDRD (ml/min/1.73 m ²)	-0,026	0,003	-0,031	-0,021	<0,0001
	Idade (anos)	-0,009	0,003	-0,015	-0,003	0,004
	Sexo (masculino)	-0,084	0,078	-0,237	0,070	0,28
	DM	0,197	0,074	0,052	0,342	0,008
	PAS (mmHg)	0,009	0,002	0,006	0,012	<0,0001
⁴	Cl.cr-MDRD (ml/min/1.73 m ²)	-0,023	0,003	-0,028	-0,017	<0,0001
	Idade (anos)	-0,007	0,003	-0,013	-0,001	0,02
	Sexo (masculino)	-0,079	0,077	-0,230	0,072	0,30
	DM	0,148	0,074	0,002	0,293	0,05
	PAS (mmHg)	0,007	0,002	0,003	0,010	<0,0001
	Albuminúria (mg/g)	0,0001	0,00003	0,0001	0,0002	<0,0001

Tabela 11. Regressão linear multivariada de variáveis clínico-laboratoriais sobre log de RBP urinária

	Modelos	B	Std. Error	IC-95%	p
¹	RCQ	-0,705	0,397	-1,485 0,076	0,077
²	VOP (m/s)	0,015	0,016	-0,018 0,047	0,37
³	ECO AE (mm)	-0,019	0,007	-0,033 -0,005	0,008
⁴	ECO Fe	0,369	0,284	-0,188 0,927	0,19
⁵	Potássio (mEq/L)	0,083	0,074	-0,061 0,228	0,26
⁶	Fósforo (mg/dL)	0,077	0,063	-0,047 0,201	0,22
⁷	Fosfatase alcalina (mg/dL)	0,0002	0,001	-0,001 0,001	0,70
⁸	Paratormônio (pg/mL)	-0,0004	0,0004	-0,001 0,0004	0,31
⁹	RBP sérica (mg/L)	-0,001	0,001	-0,004 0,002	0,57
¹⁰	Colesterol total (mg/dL)	0,0004	0,001	-0,001 0,002	0,66
¹¹	HDL-Colestetol (mg/dL)	0,007	0,003	0,002 0,012	0,01
¹²	Hemoglobina (g/dL)	-0,020	0,022	-0,064 0,024	0,37
¹³	Ferro (mcg/dL)	-0,001	0,001	-0,004 0,001	0,38
¹⁴	Bicarbonato (mmol/L)	-0,039	0,013	-0,064 -0,013	0,003
¹⁵	Albumina sérica (g/dL)	0,059	0,132	-0,201 0,319	0,66

Modelos ajustados para Cl.cr-MDRD, idade, sexo, diabetes, PAS e albuminúria.

Tabela 12. Regressão linear multivariada sobre log de RBP urinária

Modelo	B	Std. Error	IC-95%	p
Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m ²)	-0,019	0,003	-0,025 -0,014	<0,0001
Idade (anos)	-0,005	0,003	-0,011 0,002	0,15
Sexo (masculino)	-0,028	0,084	-0,194 0,137	0,74
DM	0,123	0,076	-0,027 0,273	0,11
PAS (mmHg)	0,006	0,002	0,003 0,009	0,0004
Albuminúria (mg/g)	0,0002	0,00003	0,0001 0,0002	<0,0001
HDL-Colesterol (mg/dL)	0,005	0,003	-0,001 0,010	0,09
Bicarbonato (mmol/L)	-0,033	0,013	-0,059 -0,006	0,01
ECO AE (mm)	-0,013	0,007	-0,027 0,0004	0,06

Tabela 13. Regressão linear multivariada *stepwise* sobre log de RBP urinária

Modelo	B	Std. Error	IC-95%		p
Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m ²)	-0,019	0,003	-0,024	-0,013	<0,0001
Albuminúria (mg/g)	0,0002	0,00003	0,0001	0,0002	<0,0001
PAS (mmHg)	0,006	0,002	0,002	0,009	0,001
Bicarbonato (mmol/L)	-0,036	0,013	-0,062	-0,011	0,005
ECO AE (mm)	-0,017	0,007	-0,030	-0,004	0,013

Modelo ajustado para Cl.cr-MDRD, idade, sexo, diabetes, PAS, HDL-colesterol, bicarbonato e ECO AE.

Portanto, permaneceram em ambos os modelos finais como variáveis independentemente associadas à RBPu a albuminúria e a PAS (ambas de forma positiva) e a depuração de creatinina, o bicarbonato sérico e ECO-AE (relação inversa) (Tabela13).

Na análise de regressão linear seguinte, a amostra foi estratificada em diferentes níveis de albuminúria: normo, micro e macroalbuminúria. Interessantemente, a relação de log de RBPu com a depuração de creatinina mantêm-se mesmo no grupo com normoalbuminúria (Tabela 14).

Tabela 14. Regressão linear multivariada *stepwise* sobre log de RBP urinária estratificada pela albuminúria

NORMOALBUMINÚRIA					
Modelo	B	Std. Error	IC-95%		p
Bicarbonato (mmol/dL)	-0,048	0,018	-0,084	-0,012	0,01
Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m ²)	-0,010	0,004	-0,019	-0,002	0,02
MICROALBUMINÚRIA					
Modelo	B	Std. Error	IC-95%		p
Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m ²)	-0,025	0,004	-0,033	-0,016	<0,0001
PAS (mmHg)	0,006	0,002	0,001	0,010	0,026
MACROALBUMINÚRIA					
Modelo	B	Std. Error	IC-95%		p
Cl.cr-MDRD (ml/min/1.73 m ²)	-0,020	0,006	-0,031	-0,009	<0,0001

Modelos ajustados para Cl.cr-MDRD, PAS,bicarbonato e ECO AE

4.3 RBP sérica

A figura 4 mostra a distribuição da variável RBP sérica, que também apresentou comportamento assimétrico na população estudada.

Figura 4. Histograma da RBP sérica

Para avaliar a relação entre a dosagem de RBP sérica (RBPs) e as diversas variáveis clínico-laboratoriais, estratificamos a amostra de acordo com os tercís de RBPs (Tabelas 15 e 16).

Tabela 15. Características clínicas e parâmetros cardiovasculares dos 454 pacientes da coorte PROGREDIR de acordo com os tercís de RBP sérica

	Tercil 1-RBPs n=144		Tercil 2-RBPs n=144		Tercil 3-RBPs n=144		p
Idade (anos; média/dp)	70,2	11,4	68,9	11,2	63	12	<0,0001
Sexo masculino (n/ %)	94	62,7%	96	63,6%	96	64%	0,97
Cor de pele (autoreferida: branca; n/ %)	100	67,6%	105	70,9%	94	62,7%	0,31
2º grau completo ou mais (n/ %)	37	24,7%	51	34%	53	35,6%	0,09
HAS (n/ %)	127	84,7%	144	96,6%	136	90,7%	0,008
DM (n/ %)	61	40,7%	78	52,3%	69	46,3%	0,35
Dislipidemia (n/ %)	82	55,4%	88	59,1%	112	75,2%	0,003
IAM (n/ %)	58	38,7%	52	35,1%	36	24,3%	0,10
AVC (n/ %)	27	18,5%	27	18,6%	19	12,9%	0,37
Doença renal (n/ %)	104	69,8%	133	89,3%	142	94,7%	<0,0001
Nefrologista (n/ %)	57	38,3%	87	58,8%	104	71,2%	<0,0001
Tabagismo (n/ %)	84	56,4%	86	57,3%	100	66,7%	0,13
PAS (mmHg; média/dp)	138,9	23,7	140,6	24,4	140,1	24	0,83
PAD (mmHg; média/dp)	76,1	12,8	74,7	11,7	77,7	13,5	0,12
Freq Cardíaca (BPM; mediana/ IQ)	63,8	58,3 - 72,7	64,0	57 - 74,3	63,7	58,3 - 70,7	0,88
IMC (média/dp)	29,2	6,1	29,4	4,8	29,7	5,3	0,75
RCQ (média/dp)	0,97	0,08	0,98	0,13	0,98	0,08	0,39
Diâmetro lobo hepático (mm; média/dp)	103,6	12,1	104,1	12,2	107	14,2	0,05
VOP (m/s; média/dp)	12,7	3,2	12,8	2,8	12,8	2,9	0,90
ECO Ao (mm; média/dp)	34,4	4,2	34,7	4,1	34,2	4,3	0,62
ECO AE (mm; média/dp)	42,2	5,8	41	5,2	41	5,2	0,09
ECO Vd (mm; mediana/ IQ)	24	21 - 26	23	21 - 26	24	21 - 26	0,67
ECO Siv (mm; mediana/ IQ)	12	11 - 14	12	11 - 13,0	12	11 - 13,0	0,76
ECO Ddve (mm; mediana/IQ)	50	46 - 57	50	46 - 54	49	46 - 54	0,32
ECO Ppve (mm; mediana/IQ)	11	10 - 12,0	11	10 - 12,0	11,5	10 - 12,0	0,31
ECO Dsve (mm; mediana/IQ)	32	29 - 39	30	28 - 36	31	28 - 36	0,09
ECO Fe (mediana/ IQ)	0,65	0,5 - 0,7	0,67	0,6 - 0,7	0,68	0,6 - 0,7	<0,0001
Massa VE index (g/m²; média/dp)	133,9	39,5	129	36,3	128,5	35,8	0,40
EMIC (mm; média/dp)	0,78	0,23	0,74	0,18	0,72	0,19	0,02
Escore de Agatston (mediana/ IQ)	186	22 - 1094	199	10,6 - 806	91,5	0 - 588	0,05
Agaston>0 (n/ %)	96	82,8%	99	81,8%	97	73,5%	0,14
Agaston>100 (n/ %)	69	59,5%	71	58,7%	64	48,5%	0,15

Kruskal-Wallis para variáveis contínuas não-paramétricas, ANOVA para contínuas paramétricas e qui-quadrado para categóricas

Tabela 16. Características laboratoriais dos 454 pacientes da coorte PROGREDIR de acordo com os tercís de RBP sérica

	Tercil 1-RBPs n=144		Tercil 2-RBPs n=144		Tercil 3-RBPs n=144		p
Sódio (mEq/L; mediana/IQ)	143	141 - 145	142	141 - 144	142	140 - 144	0,55
Potássio (mEq/L; média/dp)	4,46	0,46	4,64	0,54	4,64	0,54	0,002
Uréia (mg/dL; mediana/IQ)	58	46 - 70	71,5	57 - 86	86	63 - 105	<0,0001
Creatinina (mg/dL; mediana/IQ)	1,4	1,2 - 1,7	1,7	1,4 - 2,0	2,0	1,7 - 2,7	<0,0001
Albuminúria (mg/g; mediana/IQ)	38	11,2 - 257	104	22 - 722	215	44 - 1079	<0,0001
Proteinúria 24h (g/dL/1.73 m ² ; mediana/IQ)	0,11	0,06 - 0,30	0,17	0,09 - 0,71	0,30	0,10 - 1,42	<0,0001
RBP urinária/creatinina (mg/g; mediana/IQ)	0,15	0,06 - 0,49	0,32	0,09 - 1,71	0,39	0,09 - 2,92	<0,0001
Cl.cr-CG (mL/min/1.73 m ² ; média/dp)	47,1	15,8	40,7	14,1	38	16,6	<0,0001
Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m ² ; média/dp)	45	13,5	36,8	10,9	31,4	12,7	<0,0001
Fósforo (mg/dL; média/dp)	3,5	0,5	3,6	0,6	3,8	0,7	<0,0001
Cálcio total (mg/dL; média/dp)	9,5	0,6	9,6	0,5	9,6	0,6	0,77
Fosfatase alcalina (mg/dL; mediana/IQ)	73,5	57 - 96	75,5	59 - 97	74	56 - 99	0,89
Paratormônio (pg/mL; mediana/IQ)	89	63 - 136	95	64 - 140	96	66 - 159	0,28
Fração de excreção de fósforo- urina de 24h (%; média/dp)	22,1	10	28,7	16,9	30,4	13,2	<0,0001
RBP sérica (mg/L; mediana/IQ)	51,1	44,1 - 55,2	66,1	61,4 - 70,7	86,7	79,8 - 94,4	<0,0001
Glicemia (mg/dL; mediana/IQ)	102	92 - 117	108	95 - 138	105,5	96 - 131	0,06
Hemoglobina glicada (%; mediana/IQ)	6,1	5,7 - 6,9	6,3	5,9 - 7,6	6,2	5,8 - 7,0	0,03
Glicemia 2h pós TTOG 75g (mg/dL; média/dp)*	151,1	52	165,6	58,6	149,4	43,9	0,13
HOMA-IR (mediana/IQ)*	3,0	2,2 - 4,4	4,0	2,4 - 6,4	3,7	2,4 - 5,8	0,08
HOMA-Beta (média/dp)*	147,1	79,6	174,7	106,1	174	109,1	0,12
Insulinemia (μUI/mL; mediana/IQ)	13,5	9,8 - 22,2	17,8	11 - 32,4	16,6	10,7 - 26,1	0,006
Colesterol total (mg/dL; média/dp)	158,9	37,7	163,2	33,2	183,1	43,7	<0,0001
LDL-Colesterol (mg/dL; média/dp)	87,5	30,2	89,4	29,1	96,5	36,1	0,04
HDL-Colesterol (mg/dL; média/dp)	48,7	17,3	44,2	13	44,6	11,5	0,01
Triglicérides (mg/dL; mediana/IQ)	104,5	80 - 136	140	102 - 184	186,5	146 - 258	<0,0001
pH (média/dp)	7,35	0,04	7,35	0,04	7,35	0,04	0,54
Bicarbonato (mmol/L; média/dp)	26,4	2,6	25,4	2,9	24,9	3,1	<0,0001
Hemoglobina (g/dL; média/dp)	13,4	1,7	13,1	2,0	13	2,0	0,26
Ferro (mcg/dL; média/dp)	78,1	30,7	76,2	27	77,2	27,2	0,83
Ferritina (ng/mL; mediana/IQ)	88,1	47,8 - 151,5	87,2	54 - 158,6	134	59,4 - 260	<0,0001
PCR (mg/L; mediana/IQ)	2,7	1,2 - 6	2,9	0,9 - 7,7	2,4	1,0 - 6,2	0,52
Albumina (g/dL; média/dp)	4,26	0,3	4,29	0,3	4,33	0,3	0,17

Kruskal-Wallis para variáveis contínuas não-paramétricas, ANOVA para contínuas paramétricas e qui-quadrado para categóricas

Nota-se que a RBP relaciona-se de forma significativa às variáveis: idade (inversamente), história de hipertensão arterial prévia, dislipidemia, albuminúria, proteinúria, RBPu, diâmetro de lobo hepático e função renal. Outros parâmetros relacionados à DRC também se associaram a RBP como: potássio, fósforo, fração de excreção de fósforo e bicarbonato. A RBP não se mostrou associada ao escore de cálcio. (Tabela 15 e 16)

Em relação às variáveis de metabolismo de carboidratos, a RBP relacionou-se com a Hb-glicada e a insulinemia. Entretanto, não houve correlação de RBP com glicemia de jejum, curva glicêmica após sobrecarga de glicose, HOMA-IR e o HOMA-beta. Não houve também relação com medidas antropométricas, como IMC e RCQ. A RBP mostrou-se associada a todas as variáveis do perfil de colesterol, triglicérides e à ferritina. (Tabela 16).

A análise de correlação de Spearman confirmou a relação da RBP com idade, função renal, potássio, albuminúria, proteinúria, RBPu, fósforo, bicarbonato, perfil lipídico, ferritina, diâmetro do lobo hepático, EMIC e ECO Fe. (tabela 16) Além disso, houve correlação da RBP com outras variáveis ecocardiográficas: ECO AE, ECO Ppve, ECO Dsve, PTH e albumina. (Tabela 17).

Tabela 17. Correlações de variáveis clínico-laboratoriais com RBP sérica

	R	p		R	p
Idade	-0,266	<0,0001	RBP urinária/creatinina	0,230	<0,0001
PAS	0,034	0,47	Cl.cr-CG	-0,274	<0,0001
PAD	0,071	0,13	Cl.cr-MDRD	-0,446	<0,0001
FC	0,018	0,70	Fósforo	0,214	<0,0001
IMC	0,061	0,20	Cálcio total	0,027	0,56
RCQ	0,056	0,24	Fosfatase alcalina	-0,004	0,93
Diâm. Lobo Hepático	0,148	0,002	Paratormônio	0,098	0,04
VOP	0,042	0,40	Glicemia	0,081	0,08
ECO Ao	-0,013	0,78	Hemoglobina glicada	0,067	0,16
ECO AE	-0,119	0,01	Glicemia 2h pós TTOG 75g	-0,030	0,66
ECO Vd	-0,043	0,37	HOMA-IR	0,131	0,04
ECOSiv	0,065	0,17	HOMA-Beta	0,110	0,09
ECO Ddve	-0,080	0,09	Insulinemia	0,124	0,009
ECO Ppve	0,110	0,02	Colesterol total	0,264	<0,0001
ECO Dsve	-0,119	0,01	LDL-Colesterol	0,101	0,03
ECO Fe	0,188	<0,0001	HDL-Colesterol	-0,125	0,008
MassaVE Index	-0,047	0,33	Triglicérides	0,551	<0,0001
EMIC	-0,128	0,008	pH	-0,061	0,197
Sódio	-0,034	0,47	Bicarbonato	-0,217	<0,0001
Potássio	0,152	0,001	PCR	-0,056	0,23
Uréia	0,437	<0,0001	Hemoglobina	-0,089	0,06
Creatinina	0,472	<0,0001	Ferro	0,008	0,87
Albuminúria	0,254	<0,0001	Ferritina	0,200	<0,0001
Proteinúria 24h	0,279	<0,0001	Albumina	0,138	0,003

Spearman (não paramétrico)

Nesse modelo também foi possível encontrar correlação da RBPs com HOMA-IR e insulinemia, mas não com Hb-glicada, glicemia ou com a curva glicêmica após sobrecarga de glicose. (Tabela 17)

Na Tabela 18 está demonstrada a prevalência de classes de DRC-NKF de acordo com os tercís de RBP sérica. No Tercil 1 predominaram classe II e III, enquanto no tercil predominaram classe IV e V.

Tabela 18. Classes de DRC-NKF de acordo com os tercís de RBP sérica

DRC- NKF	Terci 1-RBPs		Tercil 2-RBPs		Tercil 3-RBPs		P
	n	%	n	%	n	%	
II	20	13,3%	3	2%	3	2%	<0,0001
III	113	75,3%	107	72,3%	72	48%	
IV	16	10,7%	38	25,7%	65	43,3%	
V	1	0,7%	0	0%	10	6,7%	
II e III	133	88,7%	110	74,3%	75	50%	<0,0001
IV e V	17	11,3%	38	25,7%	75	50%	

Nas análises de regressão linear univariada e multivariada, a variável RBPs foi transformada em logaritmo.

Na regressão linear univariada, a RBPs associou-se com idade, hipertensão, função renal, potássio, proteinúria e albuminúria, RBPu, variáveis do metabolismo ósseo (fósforo, fosfatase alcalina e PTH), albumina sérica, à ferritina, bicarbonato, perfil lipídico (colesterol total, LDL- colesterol, HDL colesterol e triglicérides) e HOMA-IR. Em relação as variáveis

cardiovasculares, a RBPs associou-se positivamente com ECO Ppve, ECO Fe e negativamente com ECO Ddve, ECO Dsve e EMIC (Tabelas 19 e 20)

No entanto, após ajuste de cada uma dessas variáveis pela idade, que foi a principal variável de confusão, permaneceram associados com RBPs: HAS, depuração de creatinina, potássio, fósforo, as variáveis de perfil lipídico (colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides) bicarbonato, ferritina, albumina, PTH, RBPu, albuminúria e ECO Fe. (Tabela 21)

As Tabelas 22 e 23 mostram os modelos finais de regressão linear ajustada por todas as variáveis significativas do modelo anterior. As variáveis idade, MDRD, triglicérides, albumina e potássio foram fatores independentemente associados com a RBP sérica (Tabela 23).

Tabela 19. Regressão linear univariada de variáveis clínicas e parâmetros cardiovasculares sobre log de RBP sérica

	B	Std. Error	IC-95%		p
Idade (anos)	-0,003	0,001	-0,004	-0,002	<0,0001
Sexo (masculino)	-0,003	0,013	-0,028	0,022	0,82
DM	0,022	0,012	-0,003	0,046	0,08
HAS	0,055	0,021	0,013	0,097	0,010
IAM	-0,035	0,013	-0,061	-0,009	0,008
AVC	-0,008	0,017	-0,041	0,025	0,65
PAS (mmHg)	0,0003	0,0003	-0,0002	0,001	0,31
PAD (mmHg)	0,001	0,0005	0,0001	0,002	0,03
IMC	0,001	0,001	-0,002	0,003	0,58
RCQ	0,102	0,063	-0,021	0,225	0,10
Diâm. lobo hepático (mm)	0,001	0,000	0,0002	0,002	0,02
VOP (m/s)	0,002	0,002	-0,002	0,007	0,25
ECO Ao (mm)	-0,0001	0,001	-0,003	0,003	0,95
ECO AE (mm)	-0,002	0,001	-0,004	0,0005	0,12
ECO VD (mm)	-0,001	0,001	-0,004	0,002	0,449
ECO Siv (mm)	0,005	0,003	-0,001	0,011	0,10
ECO Ddve (mm)	-0,002	0,001	-0,003	-0,0002	0,027
ECO Ppve (mm)	0,011	0,004	0,004	0,018	0,002
ECO Dsve (mm)	-0,002	0,001	-0,003	-0,001	0,005
ECO FE	0,166	0,046	0,076	0,256	<0,0001
Massa VE index (g/m²)	-0,0001	0,0002	-0,0004	0,0003	0,69
EMIC (mm)	-0,085	0,031	-0,146	-0,023	0,007

Tabela 20. Regressão linear univariada de variáveis laboratoriais sobre log de RBP sérica

	B	Std. Error	IC-95%		p
Sódio (mEq/L)	-0,001	0,001	-0,004	0,002	0,36
Potássio (mEq/L)	0,040	0,012	0,017	0,063	0,001
Uréia (mg/dL)	0,002	0,000	0,001	0,002	<0,0001
Creatinina (mg/dL)	0,072	0,008	0,058	0,087	<0,0001
Albuminúria (mg/g)	0,00002	0,000005	0,00001	0,00003	0,001
Proteinúria 24h (g/dL/1.73 m ²)	0,025	0,005	0,014	0,035	<0,0001
RBP uninária/creatinina (mg/g)	0,002	0,001	0,001	0,003	0,001
Cl.cr-CG (ml/min/1.73 m ²)	-0,002	0,0004	-0,003	-0,001	<0,0001
Cl.cr-MDRD (ml/min/1.73 m ²)	-0,004	0,0004	-0,005	-0,003	<0,0001
Fósforo (mg/dL)	0,047	0,010	0,028	0,065	<0,0001
Cálcio total (mg/dL)	0,008	0,011	-0,014	0,030	0,48
Fosfatase alcalina (mg/dL)	0,0002	0,0001	0,0000	0,0004	0,03
Paratormônio (pg/mL)	0,0002	0,0001	0,0001	0,0003	0,001
Colesterol total (mg/dL)	0,001	0,0001	0,001	0,001	<0,0001
LDL-Colesterol (mg/dL)	0,0004	0,0002	0,000002	0,001	0,05
HDL-Colesterol (mg/dL)	-0,001	0,0004	-0,002	-0,0003	0,01
Triglicérides (mg/dL)	0,001	0,0001	0,001	0,001	<0,0001
Glicemia (mg/dL)	0,0002	0,0001	-0,0001	0,0005	0,17
Hemoglobina glicada (%)	0,002	0,004	-0,006	0,011	0,59
Glicemia 2h pós TTOG 75g (mg/dL)	-0,0001	0,0002	-0,0005	0,0002	0,41
HOMA-IR	0,005	0,003	-0,0001	0,010	0,05
HOMA-Beta	0,0002	0,0001	-0,00001	0,0003	0,06
Insulinemia (μUI/mL)	0,0003	0,0002	-0,0001	0,001	0,11
pH	-0,284	0,154	-0,588	0,020	0,07
Bicarbonato (mmol/L)	-0,009	0,002	-0,013	-0,005	<0,0001
Hemoglobina (g/dL)	-0,005	0,003	-0,012	0,001	0,12
Ferro (mcg/dL)	-0,0001	0,0002	-0,001	0,0003	0,62
Ferritina (ng/mL)	0,0001	0,00004	0,0001	0,0002	<0,0001
PCR (mg/L)	-0,00005	0,0003	-0,001	0,001	0,88
Albumina(g/dL)	0,066	0,020	0,027	0,105	0,001

Tabela 21. Regressão linear multivariada de variáveis clínico-laboratoriais sobre log de RBP sérica

	Modelos	B	Std. Error	IC-95%		p
1	Idade (anos)	-0,0027	0,0005	-0,0037	-0,0017	<0,0001
2	DM	0,0198	0,0121	-0,0040	0,0437	0,10
3	HAS	0,0656	0,0206	0,0251	0,1062	0,002
4	Diâm. lobo hepático (mm)	0,0005	0,0005	-0,0004	0,0015	0,27
5	ECO Fe	0,1353	0,0450	0,0469	0,2236	0,003
6	EMIC (mm)	-0,0329	0,0338	-0,0993	0,0335	0,33
7	Potássio (mEq/L)	0,0452	0,0114	0,0228	0,0676	0,0001
8	Albuminúria (mg/g)	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,002
9	RBP urinária/creatinina (mg/g)	0,0019	0,0006	0,0007	0,0031	0,002
10	Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m²)	-0,0043	0,0004	-0,0051	-0,0035	<0,0001
11	Fósforo (mg/dL)	0,0446	0,0094	0,0262	0,0630	<0,0001
12	Paratôrmonio (pg/mL)	0,0002	0,0001	0,0001	0,0004	0,0003
13	Glicemia (mg/dL)	0,0001	0,0001	-0,0001	0,0004	0,37
14	Hemoglobina glicada (%)	0,0012	0,0043	-0,0072	0,0096	0,78
15	Glicemia 2h pós TTOG 75g (mg/dL)	-0,00002	0,0002	-0,0003	0,0003	0,89
16	HOMA-IR	0,0029	0,0025	-0,0021	0,0079	0,25
17	HOMA-beta	0,0001	0,0001	-0,0001	0,0002	0,31
18	Insulinemia (µUI/mL)	0,0002	0,0002	-0,0001	0,0005	0,19
19	Colesterol total (mg/dL)	0,0009	0,0001	0,0006	0,0012	<0,0001
20	LDL-Colesterol (mg/dL)	0,0003	0,0002	-0,00005	0,0007	0,09
21	HDL-Colesterol (mg/dL)	-0,0010	0,0004	-0,0018	-0,0002	0,02
22	Triglicérides (mg/dL)	0,0009	0,0001	0,0008	0,0010	<0,0001
23	Bicarbonato (mmol/L)	-0,0072	0,0021	-0,0113	-0,0030	0,0007
24	Ferro (mcg/dL)	-0,0001	0,0002	-0,0006	0,0003	0,53
25	Ferritina (ng/mL)	0,0001	0,00004	0,00003	0,0002	0,006
26	Albumina (g/dL)	0,0563	0,0196	0,0178	0,0949	0,004

Modelos ajustados para idade

Tabela 22. Regressão linear multivariada sobre log de RBP sérica

Modelo	B	Std. Error	IC-95%		p
Idade (anos)	-0,0013	0,0004	-0,0021	-0,0006	0,0004
HAS	0,001	0,015	-0,028	0,029	0,96
Potássio (mEq/L)	0,015	0,008	-0,002	0,031	0,08
Albuminúria (mg/g)	0,000001	0,000004	-0,00001	0,00001	0,83
RBP urinária/creatinina (mg/g)	0,0001	0,0005	-0,0008	0,0010	0,81
Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m ²)	-0,0038	0,0004	-0,0045	-0,0030	<0,0001
Fósforo (mg/dL)	0,010	0,007	-0,004	0,023	0,17
Paratormônio (pg/mL)	0,0001	0,00005	-0,00003	0,0001	0,22
Colesterol total (mg/dL)	-0,0001	0,0001	-0,0003	0,0002	0,64
HDL-Colesterol (mg/dL)	0,0005	0,0003	-0,0001	0,0012	0,11
Triglicérides (mg/dL)	0,0008	0,0001	0,0007	0,0009	<0,0001
Bicarbonato (mmol/L)	-0,002	0,002	-0,005	0,001	0,19
Ferritina (ng/mL)	0,00005	0,00003	-0,00001	0,0001	0,11
Albumina (g/dL)	0,08	0,02	0,05	0,11	<0,0001
ECO Fe	0,03	0,03	-0,03	0,09	0,29

Tabela 23. Regressão linear multivariada *stepwise* sobre log de RBP sérica

Modelo	B	Std. Error	IC-95%		p
Triglicérides (mg/dL)	0,0008	0,00004	0,0007	0,0009	<0,0001
Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m ²)	-0,0042	0,0003	-0,0048	-0,0036	<0,0001
Albumina (g/dL)	0,07	0,01	0,05	0,10	<0,0001
Idade (anos)	-0,0016	0,0003	-0,0023	-0,0009	<0,0001
Potássio (mEq/L)	0,019	0,008	0,003	0,035	0,02

Modelo ajustado para idade, HAS, potássio, fósforo, paratormônio, colesterol total, HDL-colesterol, triglicérides, bicarbonato, ferritina, albumina e ECO Fe.

4.4 Escore de calcificação coronariana

As análises com escore de cálcio foram realizadas separadamente, pois devido à distribuição peculiar foi necessário modelo específico de regressão linear generalizado. A Figura 5 mostra a distribuição da variável escore de calcificação arterial coronariana (CAC). Consideramos CAC como distribuição gama.

Figura 5. Histograma do escore de CAC

4.4.1 Efeito de log de RBP urinária sobre o escore de calcificação coronariana

Para compreender a relação da CAC com log de RBP urinária na amostra estudada, os modelos foram ajustados, pelas principais variáveis de confusão: sexo, idade, albuminúria, depuração de creatinina e diabetes, fixando CAC como variável resposta.

A Tabela 24 mostra o modelo inicial de regressão linear generalizada sobre CAC ajustada por sexo, idade e log de RBP urinária. Neste modelo log de RBPu relaciona-se independentemente à CAC.

Na Tabela 25, o modelo inicial foi ajustado por depuração de creatinina, albuminúria e diabetes, notando-se então que a relação de RBPu com CAC não mais se mantém. A Tabela 26 mostra o modelo final (*stepwise*) que melhor explica relação de CAC com as variáveis.

Tabela 24. Regressão linear generalizada gama sobre escore de cálcio

	Estimate	Std. Error	p
Idade (anos)	0,063	0,091	<0,0001
Sexo (masculino)	0,862	0,191	<0,0001
log RBP urinária/creatinina (mg/g)	0,352	0,109	0,001

Tabela 25. Regressão linear generalizada gama sobre escore de cálcio

	Estimate	Std. Error	p
Idade (anos)	7,41E+01	8,78E+00	<0,0001
Sexo (masculino)	6,77E+02	1,84E+02	0,0003
log RBP urinária/creatinina (mg/g)	1,63E+02	1,17E+02	0,17
Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m²)	1,69E+01	6,87E+00	0,001
Albuminúria (mg/g)	1,40E-01	5,20E-04	<0,0001
DM	6,89E+02	1,91E+02	0,0003

Tabela 26. Regressão linear generalizada gama *stepwise* sobre escore de cálcio

	Estimate	Std. Error	p
Idade (anos)	7,30E+01	8,72E+00	<0,0001
Sexo (masculino)	6,88E+02	1,84E+02	0,0002
Cl.cr-MDRD (mL/min/1.73 m²)	1,36E+01	6,22E+00	0,03
Albuminúria (mg/g)	1,81E-01	5,31E-04	<0,0001
DM	7,59E+02	1,78E+02	<0,0001

Modelo ajustado para idade, sexo, log RBP urinária/creatinina, Cl.cr-MDRD, albuminúria e DM.

4.4.2 Efeito de log de RBP sérica sobre o escore de calcificação coronariana

Para avaliar a relação de log de RBP sérica com CAC, foi seguido o mesmo processo realizado com o log de RBP urinária. Porém já no primeiro modelo de ajuste com idade e sexo não houve relação de entre as variáveis (Tabela 27)

Tabela 27. Regressão linear generalizada gama sobre escore de cálcio

	Estimate	Std. Error	p
Idade (anos)	0,056	0,009	<0,0001
Sexo (masculino)	0,830	0,190	<0,0001
log RBP sérica (mg/L)	-0,501	0,664	0,45

5 . Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1 RBP urinária

Nossos resultados sugerem que RBPu associe-se independentemente à função renal, à pressão arterial sistólica, à albuminúria, à acidose e à medida do AE em população portadora de DRC. Diversos outros parâmetros associados à DRC e aterosclerose, como anemia, metabolismo mineral, VOP, entre outros, mostraram-se inicialmente associados à RBPu, mas essas relações não se sustentaram após ajustes para variáveis de confusão.

A relação entre RBPu e função renal no contexto de doenças que não são essencialmente doenças tubulares ou glomerulares merece atenção. A presença excessiva de RBP na urina pode decorrer em função dois mecanismos essenciais: alteração na permeabilidade da barreira capilar glomerular, resultando em passagem excessiva de proteínas de diversos pesos moleculares, como a albumina, globulinas e holo-RBP, com sobrecarga do sistema de recaptção tubular (mecanismo em síndromes nefróticas, por exemplo); ou pela alteração funcional ou estrutural do túbulo proximal, com perda da capacidade de reabsorção mesmo frente a uma função de filtração glomerular normal, como ocorre em tubulopatias proximais primárias, como Doença de Dent, cistinose ou Fanconi, ou secundárias, como o rim do mieloma. A combinação desses mecanismos também é possível. Em estudos anteriores, o aumento da excreção urinária de RBP mostrou-se fator preditor de desfechos renais (66-71) no âmbito de

glomerulopatias, tubulopatias e transplantes. Nossa coorte, entretanto, tem um perfil distinto desse, uma vez que excluimos sistematicamente pacientes portadores de glomerulonefrites e doenças auto-imunes. Compreende assim uma mistura de etiologias de DRC, mas com maior representação de mecanismos relacionados a hipertensão arterial, diabetes mellitus, idade, cardiopatia e aterosclerose. Apesar de nela haver 30% de pacientes macroalbuminúricos, nos quais imaginamos que o acometimento glomerular seja mais importante, temos ainda 60% dos participantes que são ou normo ou microalbuminúricos. Interessante notar que mesmo nesses sub-grupos de portadores de DRC, a RBPu tenha apresentado um bom desempenho como marcador de função renal. Esse dado sugere que a RBP urinária possa ser explorada como biomarcador independente da albuminúria em pacientes com DRC.

A albuminúria é comprovadamente um excelente preditor de perda de função renal em diversas doenças renais, como nefropatia diabética (139), GESF (140), nefropatia de IgA (141), glomerulonefrite membranosa (142), entre outras. No entanto, estudos recentes sugeriram que há um subgrupo de pacientes que tem DRC normoalbuminúrica, no qual o desempenho desse marcador é limitado; mesmo em pacientes microalbuminúricos, não é obrigatória a progressão da albuminúria, podendo haver um desacoplamento ao longo do tempo entre a evolução da albuminúria e da perda de função renal, (50-52, 143,144) estudos clínicos deveriam voltar a utilizar desfechos renais sólidos como marcadores de progressão e não mais albuminúria

como marcador intermediário, para contemplarmos melhor o espectro de pacientes com DRC.

Assim, marcadores novos, que adicionem desempenho diagnóstico e preditivo aos atualmente utilizados são de grande interesse. Particularmente no contexto de pacientes normoalbuminúricos, que sabemos corresponder a uma parcela significativa dos portadores de DRC, há falta de marcadores de progressão de DRC, que nos permitam identificar aqueles de alto risco para TRS ou, talvez até mais importantemente, de eventos cardiovasculares. Em nosso estudo, de característica transversal, não pudemos ainda avaliar a associação entre RBPu e eventos de mortalidade, doença cardiovascular e necessidade de TRS, mas com o envelhecimento da coorte, poderemos realizar essas análises.

E porque a RBPu teria um desempenho efetivo como marcador de função renal em nossa população? Apesar de não termos material de biópsia renal para comprovar essa hipótese, acreditamos que no contexto de DRC *lato senso*, a relação demonstrada seja decorrente da relação entre RBPu e acometimento túbulo-intersticial. Um estudo recente demonstrou haver relação significativa entre RBPu e grau de fibrose em histologia renal (ref). A associação de RBPu com a acidose metabólica, mesmo após ajuste para função renal, também corrobora essa idéia. Na literatura, fibrose túbulo-intersticial é um dado consistente e repetidamente associado à progressão de DRC e desfechos renais sólidos.(145)

O achado de uma relação inversa entre RBPu e AE também poderia ser explicado pela hipótese de que RBPu reflita acometimento túbulo-

intersticial na DRC. Essa relação inicialmente nos pareceu ao contrário do esperado, levando-se em consideração a relação evidente em nossas análises, entre RBPu e HAS ou VOP. Se há uma associação entre marcadores clássicos de aterosclerose e RBPu, porque encontrar uma relação inversa entre medidas de dilatação cardíaca (sendo AE a de melhor desempenho entre elas) e RBPu? Porque a frequência de pacientes infartados mostrou-se maior em pacientes com RBPu pouco alterada ou dentro da normalidade? Novamente, nossa hipótese foi que a RBPu permita identificar pacientes com mecanismos distintos de lesão renal. Inicialmente, acreditamos que a RBPu estivesse funcionando simplesmente como um marcador de síndrome cárdio-renal, ou seja, aqueles pacientes com miocardiopatia dilatada teriam maior tendência a apresentar DRC com valores menores de RBP do que aqueles sem disfunção miocárdica. Entretanto, mesmo estratificando-se as análises pelo grau de disfunção miocárdica, notamos que a relação entre AE e RBPu persistia inversa mesmo naqueles com função cardíaca normal. Outra possibilidade seria que em pacientes cardiopatas, nos quais a lesão aterosclerótica é a predominante, os mecanismos relacionados à perda e piora de função renal são provavelmente mais indolentes do que em pacientes nos quais o mecanismo de DRC seja uma doença renal primária. O acometimento túbulo-intersticial e a fibrose túbulo-intersticial poderiam ser, portanto, distintos nesses dois grupos de pacientes, justificando as diferenças observadas em relação à RBPu. Novamente, não temos à disposição material de histologia renal para testar essa hipótese, o que limita nossas

conclusões. É importante notar também que, possivelmente, a relação inversa entre RBPu e AE tenha aparecido em nossa amostra em função das características de seleção da própria coorte (viés de seleção), caracterizada por participantes com DRC já mais avançada e com uma frequência elevada de pacientes cardiopatas. Numa população com perfil mais geral, é possível supor que a relação entre RBP e AE não aparecesse. A possibilidade da RBPu identificar mecanismos distintos de lesão renal em pacientes já portadores de DRC (e não fora dessa circunstância) nos pareceu bastante interessante, particularmente no contexto de síndrome cárdio-renal. Evidentemente, essa hipótese precisa ser melhor testada. Correlações com dados histológicos e eventos prospectivos são necessários.

Em relação aos parâmetros do metabolismo de carboidratos, apesar de termos encontrado inicialmente uma associação entre RBP urinária e DM, glicemia de jejum e Hbglicada, houve perda de significância após ajustes. É possível que esse resultado decorra da variedade de espectro clínico que entendemos atualmente ser a doença renal diabética, que varia desde formas normoalbuminúricas, com lesões vasculares predominantes, até as formas clássicas de glomerulopatia diabética, com proteinúrias nefróticas francas e lesão podocitária intensa. Nesse contexto, os parâmetros de glicemia não resistiram aos ajustes para função renal e albuminúria.

Não houve também relação consistente e independente da RBP urinária com medidas de calcificação (CAC) ou placa aterosclerótica (EMIC). Os fatores de risco cardiovasculares mais relacionados a esses riscos, como diabetes mellitus, sexo, idade, tabagismo, HAS e função renal “carregaram”

o efeito inicial visualizado entre RBP e CAC ou EMIC. Interessante salientar como os ajustes são importantes na exploração das relações entre as variáveis, dado a extensa covariância que existe entre os fatores de risco cardiovascular e renal. Isso justifica a lista extensa de achados de associação entre RBPu e as variáveis nas análises univariadas, reduzidas entretanto à cinco associações finais significativas e independentes.

Existem poucos dados na literatura correlacionando RBP urinária com fatores de risco cardiovascular ou medidas de aterosclerose. Um único estudo, recentemente publicado pelo grupo de Park e cols, encontrou relação da RBP urinária com VOP, mesmo após ajuste para diversas variáveis clínicas e metabólicas.(146) Nosso estudo é o primeiro a fazer uma análise mais pormenorizada entre RBPu e fatores de risco cardiovascular em DRC.

5.2 RBP sérica

Nossos resultados mostraram que a RBP sérica relaciona-se de forma independente e inversa à função renal. Esse resultado vem ao encontro de dados anteriores.(147) As hipóteses para justificar tal achado são várias. Uma possibilidade seria que o aumento da RBPs, proposto como marcador de resistência periférica à insulina, acompanhasse a disfunção renal, que sabidamente interfere em metabolismo de carboidratos. No entanto, algumas observações não sustentam essa hipótese.

Primeiramente, o desempenho da RBPs em relação aos parâmetros de metabolismo de carboidratos, como glicemia, Hb glicada, HOMA, antropometria e, sobretudo, o próprio TTOG em pacientes não-diabéticos, foi fraco e insignificante após os ajustes, divergindo daqueles relatados na literatura.(148,149) Mesmo em relação aos lípides, a RBP sérica permaneceu significativamente associada apenas ao triglicérides. Nossos dados demonstraram correlação da RBP sérica com o diâmetro ântero-posterior do lobo hepático direito (medida por USG), mas que também não resistiu aos ajustes nos modelos de regressão linear. A medida do diâmetro ântero-posterior do lobo hepático direito é um método que possui 85% de sensibilidade e 73% de especificidade para detectar esteatose hepática e apresenta associação significativa com medidas clássicas de risco cardiovascular: diabetes, obesidade, hipertrigliceridemia e aumento da circunferência abdominal.(150) Outros grupos também não conseguiram encontrar relação de níveis séricos de RBP4 com esteatose ou medidas de resistência insulínica.(151,152)

Segundo, apesar de ser descrita a relação entre uremia e aumento de resistência periférica à insulina, sabemos que o espectro de manifestações vai além desse modelo. Muitos pacientes tendem a tornar-se desnutridos e sarcopênicos com o avançar da uremia. Mesmo pacientes diabéticos de longa data, ao tornarem-se urêmicos, podem apresentar o chamado *burn-out syndrome*, na qual há uma mudança metabólica tão extensa que a insulinoterapia deixa de ser necessária ou é reduzida a mínimas doses. Assim, apesar do tema precisar ser melhor estudado e replicado, não nos

parece verdadeira a afirmação de que RBPs seja um bom marcador de resistência periférica a insulina em DRC, diante de nossos resultados.

Por outro lado, as variáveis significativas nos modelos finais envolvendo RBP sérica apontam todas para uma via final comum, relacionada à nutrição: persistiram no modelo a relação entre RBPs e albumina, idade (inversa) e potássio. A relação com albumina e idade apontam mais diretamente para o papel dessa adipocina em sinalizar estado nutricional na DRC. Outros estudos já demonstraram que tanto a TTR quanto a RBP4 estão diminuídas em estados de desnutrição proteico-calórica e idade avançada.(153,154) A sarcopenia é uma condição muito frequente em pacientes com DRC e influenciada pelo envelhecimento, pela condição sócio-econômico, sedentarismo, baixa ingestão calórica, deficiência de vitamina D e hipertensão arterial.(155) Sua presença está diretamente relacionada a menor sobrevida de pacientes com DRC.(155) Ainda nesse contexto, considerando que desnutrição e inflamação são aspectos relacionados, principalmente em uremia, alguns achados reforçam essa ideia. Barazzoni e cols demonstraram a relação entre RBPs e TNF α , TNF α /IL10 e PCR em pacientes não obesos com DRC, independente da sua expressão de RNAm no tecido adiposo.(115) Em nosso estudo, houve associação dos diferentes tercís de RBP sérica com PCR e correlação positiva de RBP sérica com ferritina. Estes achados, entretanto, não resistiram aos ajustes nos modelos de regressão linear.

Já a relação observada com potássio, que é independente da função renal, precisa ser mais bem esclarecida. Poderia advir de maior aporte

nutricional (ingestão) e/ou nível sócio-econômico melhor naqueles participantes que tem calemia mais elevada, ou eventualmente de modulação com aldosterona. Futuramente, poderemos explorar melhorar essas hipóteses de posse dos dados de questionário de frequência alimentar realizado na coorte. De qualquer forma, nossos resultados apontam a necessidade de estudos futuros voltarem a avaliar o papel de RBPs como marcador de nutrição (e não propriamente resistência insulínica) em DRC.

Outra hipótese para a relação verificada entre RBPs e função renal seria que o acúmulo de RBPs na DRC resultasse simplesmente da queda na função de filtração glomerular. Sabemos que pacientes com DRC possuem níveis mais elevados de TTR (153), o que potencializa a diminuição da filtração e degradação tubular da RBP, através da estabilização do complexo RBP-TTR. A dosagem de TTR não foi contemplada nas análises do presente estudo, mas análises anteriores já mostraram que tanto a forma complexada quanto a livre encontram-se aumentadas na DRC.(147) Nesse sentido, seria viável especular se a RBPs teria algum papel como toxina urêmica, uma vez que estando aumentada na DRC, a RBP poderia exercer seus papéis biológicos num contexto fisiopatológico. Mais estudos são necessários para entendermos melhor as causas e implicações do aumento da RBPs observado na DRC.

Não foi possível achar associação significativa da RBP sérica com nenhuma das medidas de aterosclerose (VOP, EMIC ou CAC) após ajustes. Na literatura, apesar de a associação da RBP sérica com medidas de aterosclerose e eventos cardiovasculares ser mais bem explorada, os

resultados também são bastante conflitantes, tanto na população geral como em DRC. (120-137,156)

6. CONCLUSÕES

6.1 RBP urinária

1. RBP urinária relaciona-se independentemente à função renal, à hipertensão, à acidose metabólica, à albuminúria e à dimensão de AE em população com DRC
2. Sua relação com função renal nos sugere que a RBPu deva ser mais explorada como biomarcador de DRC, principalmente em estudos prospectivos
3. Mesmo em populações normoalbuminúricas, RBPu associa-se significativamente às medidas de função renal
4. Sua relação com AE sugere que a RBPu possa ser explorada como marcador de síndrome cárdio-renal na população de DRC.

6.2 RBP sérica

1. Em nosso estudo, a RBP sérica mostrou-se independentemente associada à função renal, idade, triglicérides, albumina e ao potássio.
2. A RBP sérica não teve um bom desempenho como marcador de resistência insulínica em nossa população com DRC, sugerindo que função renal seja uma importante variável de confusão nessa relação
3. A relação positiva entre RBPs e albumina e idade sugere que a RBPs deva ser mais explorada como marcador de sarcopenia na população de DRC.

7 . Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function *Biochem J*. 1996 Aug 15; 318 (Pt 1):1-14
2. Blaner WS. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev*. 1989;10:308–16.
3. Wolf G. Multiple functions of vitamin A. *Physiol Rev*. 1984 Jul; 64 (3):873-937
4. Ong DE, Page DL. Cellular retinol-binding protein (type two) is abundant in human small intestine. *J Lipid Res*. 1987 Jun; 28(6):739-45.
5. Yost RW1, Harrison EH, Ross AC. Esterification by rat liver microsomes of retinol bound to cellular retinol-binding protein. *J Biol Chem*. 1988 Dec 15; 263(35):18693-701.
6. Blomhoff R. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr rev*. 1994; 52: S13-S23
7. Goodman DW, Huang HS, Shiratori T. Tissue distribution and metabolism of newly absorbed vitamin a in the rat. *J lipid res*. 1965 Jul; 6:390-6.
8. Blomhoff R, Helgerud P, Rasmussen M, Berg T, Norum KR. In vivo uptake of chylomicron retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982 Dec; 79(23):7326-30.
9. Gronowska-Senger A, Wolf G. Effect of dietary protein on the enzyme from rat and human intestine which converts b-carotene to retinal. *J Nutr*. 1970; 100:300-8.
10. Kiefer C, Hessel S, Lampert JM, Vogt K, Lederer MO, Breithaupt DE, et al. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem*. 2001; 276 (27): 14110-16.
11. Tanumihardjo SA. Factors influencing the conversion of carotenoids to retinol: bioavailability to bioconversion to bioefficacy. *Int J Vitam Nutr Res*. 2002 Jan; 72 (1):40-5.
12. Biesalski HK, Frank J, Beck SC, Heinrich F, Illek B, Reifen R, Gollnick H, Seeliger MW, Wissinger B, Zrenner E. Biochemical but not clinical

- vitamin A deficiency results from mutations in the gene for retinol binding protein. *Am J Clin Nutr.* 1999 May; 69(5):931-6.
13. Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantedosi R, Gouras P, Freeman S, Cosma MP, Colantuoni V, Gottesman ME. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* 1999 Sep 1; 18(17):4633-44.
 14. Vogel S, Piantedosi R, O'Byrne SM, Kako Y, Quadro L, Gottesman ME, Goldberg IJ, Blaner WS. Retinol-binding protein-deficient mice: biochemical basis for impaired vision. *Biochemistry.* 2002 Dec 24; 41(51):15360-8.
 15. Flajollet S, Staels B, Lefebvre P. Retinoids and nuclear retinoid receptors in white and brown adipose tissues: physiopathologic aspects. *Horm Mol Biol Clin Invest.* 2013;14(3): 75–86
 16. Shulman AI, Mangelsdorf DJ. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med.* 2005 Aug 11; 353(6):604-15.
 17. Blaner WS. STRA6, a cell-surface receptor for retinol-binding protein: the plot thickens. *Cell Metab.* 2007;5:164–6.
 18. Kelly M, von Lintig J. STRA6: role in cellular retinol uptake and efflux. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2015 Aug; 4(4):229-42.
 19. Kawaguchi R, Zhong M, Kassai M, Ter-Stepanian M, Sun H. Vitamin A Transport Mechanism of the Multitransmembrane Cell-Surface Receptor STRA6. *Membranes (Basel).* 2015 Aug 28; 5(3):425-53.
 20. Pasutto, F, Sticht H, Hammersen G, Gillesen-Kaesbach G, Fitzpatrick DR, Nurnberg G, Brasch F, Schirmer-Zimmermann H, Tolmie JL, Chitayat D, et al. Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2007; Mar 80(3):550-60.
 21. Golzio C, Martinovic-Bouriel J, Thomas S, Mougou-Zrelli S, Grattagliano-Bessieres B, Bonniere M, Delahaye S, Munnich A, Encha-Razavi F, Lyonnet S, et al. Matthew-wood syndrome is caused by truncating mutations in the retinol-binding protein receptor gene STRA6. *Am. J Hum Genet.* 2007 Jun; 80(6):1179-87
 22. White T, Lu T, Metlapally R, Katowitz J, Kherani F, Wang TY, Tran-Viet KN, Young TL. Identification of STRA6 and SKI sequence variants in patients with anophthalmia/ microphthalmia. *Mol. Vis.* 2008, 14, 2458-65.

23. Chassaing N, Golzio C, Odent S, Lequeux L, Vigouroux A, Martinovic-Bouriel J, Tiziano FD, Masini L, Piro F, Maragliano G. et al. Phenotypic spectrum of STRA6 mutations: From matthew-wood syndrome to non-lethal anophthalmia. *Hum. Mutat.* 2009 May; 30(5): E673-81.
24. Gavrilova R, Babovic N, Lteif A, Eidem B, Kirmani S, Olson T, Babovic-Vuksanovic D. Vitamin A deficiency in an infant with pagod syndrome. *Am J Med Genet A.* 2009 Oct; 149A(10):2241-7.
25. Segel R, Levy-Lahad E, Pasutto F, Picard E, Rauch A, Alterescu G, Schimmel MS. Pulmonary hypoplasia-diaphragmatic hernia-anophthalmia-cardiac defect (PDAC) syndrome due to STRA6 mutations- what are the minimal criteria? *Am J Med Genet. A* 2009 Nov; 149A(11):2457-63.
26. West B, Bove KE, Slavotinek AM. Two novel STRA6 mutations in a patient with anophthalmia and diaphragmatic eventration. *Am J Med Genet A* 2009 Mar; 149A(3):539-42.
27. Casey J, Kawaguchi R, McGettigan P, Sun H, Morrissey M, Nielsen J, Conroy J, Regan R, Tormey P, Ni Chroinin M, et al. First implication of STRA6 mutations in isolated anophthalmia, microphthalmia and coloboma: Adding a new dimension to the STRA6 phenotype. *Hum Mutat.* 2011Dec; 32(12):1417-26.
28. Berry DC, Jacobs H, Marwarha G, Gely-Pernot A, O'Byrne SM, DeSantis D, Klopfenstein M, Feret B, Dennefeld C, Blaner WS, Croniger CM, Mark M, Noy N, Ghyselinck NB. The STRA6 receptor is essential for retinol-binding protein-induced insulin resistance but not for maintaining vitamin A homeostasis in tissues other than the eye. *J Biol Chem* 2013 Aug 23; 288(34):24528–39.
29. Terra R, Wang X, Hu Y, Charpentier T, Lamarre A, Zhong M, Sun H, Mao J, Qi S, Luo H, Wu J. To investigate the necessity of STRA6 upregulation in T cells during T cell immune responses. *PLoS One.* 2013 Dec 31; 8(12):e82808.
30. Amengual J, Zhang N, Kemmerer M, Maeda T, Palczewski K, Von Lintig J. STRA6 is critical for cellular vitamin A uptake and homeostasis. *Hum Mol Genet.* 2014Oct 15; 23(20):5402-17.
31. Ruiz A, Mark M, Jacobs H, Klopfenstein M, Hu J, Lloyd M, Habib S, Tosha C, Radu RA, Ghyselinck NB, Nusinowitz S, Bok D. Retinoid content, visual responses, and ocular morphology are compromised in the retinas of mice lacking the retinol-binding protein receptor, STRA6. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 May; 17;53(6):3027-39.

32. Alapatt P, Guo F, Komanetsky SM, Wang S, Cai J, Sargsyan A, Rodriguez Diaz E, Bacon BT, Aryal P, Graham TE. Liver retinol transporter and receptor for serum retinol binding protein (RBP4). *J Biol Chem*. 2013 Jan 11;288(2):1250-65.
33. Blaner WS. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocrin Rev*. 1989 Aug;10(3): 308-16.
34. Lewis KC, Green MH, Underwood BA. Vitamin A turnover in rats as influenced by vitamin A status. *J Nutr*. 1981 Jul; 111(7):1135-44.
35. Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport and storage. *Physiol Rev*. 1991 Oct; 71(4):951 -990.
36. Soprano DR, Smith JE, Goodman DS. Effect of retinol status on retinol-binding protein biosynthesis rate and translatable messenger RNA levels in rat liver. *J Biol Chem*. 1982 Jul 10; 257(13): 7693-7.
37. Muto Y, Smith JE, Milch PO, Goodman DS. Regulation of retinol-binding protein metabolism by vitamin A status in the rat. *J Biol Chem*. 1972 Apr 25; 247(8):2542-50.
38. Peterson PA. Studies on the interaction between prealbumin, retinol-binding protein, and vitamin A. *Biol Chem*. 1971 Jan 10; 246(1):44-9
39. Kanai M, Raz A, Goodman DS. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest*. 1968 Sep; 47(9):2025-44.
40. Birn H, Christensen EI. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int*. 2006 Feb; 69(3):440-9.
41. Christensen EI, Moskaug JO, Jacobsen C, Gundersen TE, Nykjaer A, Blomhoff R, Willnow TE, Moestrup SK. Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Apr; 10(4):685-95.
42. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Apr; 280(4):F562-73
43. Moestrup SK, Kozyraki R, Kristiansen M, Kaysen JH, Rasmussen HH, Braut D, Pontillon F, Goda FO, Christensen EI, Hammond TG, Verroust PJ. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *J Biol Chem*. 1998 Feb 27; 273(9):5235-42.

44. Soprano DR, Soprano KJ, Goodman DS. Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J Lipid Res.* 1986 Feb;27(2):166-71.
45. Donadio C, Lucchesi A, Ardini M, Giordani R. Cystatin C, beta 2-microglobulin, and retinol-binding protein as indicators of glomerular filtration rate: comparison with plasma creatinine. *J Pharm Biomed Anal.* 2001 Mar; 24(5-6):835-42.
46. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function--measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med.* 2006 Jun 8;354(23):2473-83.
47. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, Wilkie M, White T, Grubb AO, Price CP. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int.* 1995 Jan; 47(1):312-8.
48. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, Wilkie M, White T, Grubb AO, Price CP. Serum cystatin C: a replacement for creatinine as a biochemical marker of GFR. *Kidney Int Suppl.* 1994 Nov; 47:S20-1.
49. Keevil BG¹, Kilpatrick ES, Nichols SP, Maylor PW. Biological variation of cystatin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate. *Clin Chem.* 1998 Jul; 44(7):1535-9.
50. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, et al. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet.* 2008; 372(9638):547-53.
51. Mann JF, Schmeider RE, McQueen M, et al. TRANSCEND study-Effect of telmisartan on renal outcomes: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2009 Jul 7; 151(1):1-10, W1-2.
52. Perkins BA, Ficociello LH, Roshan B, Warram JH, Krolewski AS. In patients with type 1 diabetes and new onset microalbuminuria the development of advanced chronic kidney disease may not require progression to proteinuria. *Kidney Int* 2010 Jan; 77(1):57-64.
53. Holm J, Hemmingsen L, Nielsen NV. Low-molecular-mass proteinuria as a marker of proximal renal tubular dysfunction in normo- and microalbuminuric non-insulin-dependent diabetic subjects. *Clin Chem.* 1993 Mar; 39(3):517-9.
54. Gibb DM, Tomilson PA, Dalton NR, Turner C, Shah V, Barratt TM. Renal tubular proteinuria and microalbuminuria in diabetic patients. *Arch Dis Child* 1989 Jan; 64(1): 129-34.

55. Watts GF, Powell M, Rowe DJ, Shaw KM. Low-molecular-weight proteinuria in insulin-dependent diabetes mellitus: a study of the urinary excretion of beta 2-microglobulin and retinol-binding protein in alkalinized patients with and without microalbuminuria. *Diabetes Res.* 1989 Sep; 12(1):31-36.
56. Bernard AM, Vyskoil AA, Mahieu P, Lauwerys R. Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. *Clin Chem.* 1987 Jun; 33(6):775-9.
57. Bernard AM, Moreau D, Lauwerys R. Comparison of retinol-binding protein and beta 2-microglobulin determination in urine for the early detection of tubular proteinuria. *Clin Chim Acta.* 1982 Nov 24;126(1):1-7.
58. Salem MA, el-Habashy SA, Saeid OM, el-Tawil MM, Tawfik PH. Urinary excretion of n-acetyl-beta-D-glucosaminidase and retinol binding protein as alternative indicators of nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 2002 Mar; 3(1):37-41.
59. Schultz CJ, Dalton RN, Neil HA, Konopelska-Bahu T, Dunger DB; Oxford Regional Prospective Study Group. Markers of renal tubular dysfunction measured annually do not predict risk of microalbuminuria in the first few years after diagnosis of Type I diabetes. *Diabetologia.* 2001 Feb; 44(2):224-9.
60. Holm J, Hemmingsen L, Nielsen NV, Thomsen N. Increased urinary excretion of the retinol-binding protein in insulin-dependent diabetes mellitus in the absence of microalbuminuria. *Clin Chim Acta.* 1987 Dec; 170(2-3):345-49.
61. Holm J, Nielsen NV, Hemmingsen L. Retinopathy in type II diabetes mellitus associated with above-normal urinary excretion of RBP. *Kidney Int Suppl.* 1994 Nov; 47:S105-8.
62. Nielsen NV, Holm J, Hemmingsen L. Diabetic retinopathy related to degree of albuminuria and tubular (low molecular weight) proteinuria in insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1990 Jun; 68(3):270-4.
63. Vaidya VS, Niewczas MA, Ficociello LH, et al. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with lower levels of urinary tubular injury biomarkers. Kidney injury molecule-1, and N-acetyl B-D glucosaminidase. *Kidney Int.* 2011 Feb; 79(4): 464-70
64. Kern EF, Erhard P, Sun W, Genuth S, Weiss MF. Early urinary markers of diabetic kidney disease: a nested case control study from

- the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *Am J Kidney Dis*. 2010 May; 55(5) ; 824-34.
65. Titan SM, Vieira JM Jr, Dominguez WV, Moreira SR, Pereira AB, Barros RT, Zatz R. Urinary MCP-1 and RBP: independent predictors of renal outcome in macroalbuminuric diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications*. 2012 Nov-Dec; 26(6): 546-53.
66. Sesso R, Rettori R, Nishida S, Sato E, Ajzen H, Pereira AAB. Assessment of lupus nephritis activity using urinary retinol-binding protein. *Nephrol Dial Transplant*. 1994;9(4):367-71
67. Kirztajn GM, Nishida SK, Silva MS, Ajzen H, Moura LA, Pereira AP. Urinary retinol-binding protein as a prognostic marker in glomerulopathies. *Nephron*. 2002 Apr; 90(4):424-31.
68. Sesso R, Santos AP, Nishida SK, et al. Prediction of steroid responsiveness in the idiopathic nephritic syndrome using urinary retinol-binding protein and beta-2-microglobulin. *Ann Intern Med*. 1992 Jun 1;116(11):905-9
69. Hosaka B, Park SI, Felipe CR, Garcia RG, Machado PG, Pereira AB, Tedesco HS, Medina JOP. Predictive value of urinary retinol binding protein for graft dysfunction after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2003 Jun;35(4):1341-3.
70. Camara NO, Silva MS, Nishida S, Pereira AB, Pacheco-Silva A. Proximal tubular dysfunction is associated with chronic allograft nephropathy and decreased long-term renal-graft survival. *Transplantation*. 2004 Jul 27;78(2):269-75.
71. Camara NO, Matos AC, Rodrigues DA, Pereira AB, Pacheco-Silva A. Urinary retinol binding protein is a good marker of progressive cyclosporine nephrotoxicity after heart transplant. *Transplant Proc*. 2001 May; 33(3):2129-31.
72. Pallet N, Chauvet S, Chassé JF, Vincent M, Avillach P, Levi C, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Nga-Matsogo Beaune P, Thervet E, Karras A. Urinary Retinol Binding Protein is a marker of the Extent of interstitial kidney fibrosis. *PLoS One*. 2014 Jan 8;9(1):e84708
73. Levey AS, Cattran D, Friedman A, et al. Proteinuria as a surrogate outcome in CKD: report of a scientific workshop sponsored by the National Kidney Foundation and the US Food and Drug Administration. *Am J Kidney Dis*. 2009 Aug; 54(2):205-26.
74. Donadio C. Serum and urinary markers of early impairment of GFR in chronic kidney disease patients: diagnostic accuracy of urinary β -trace protein. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Dec; 299(6):F1407-23.

75. Galanti LM, Jamart J, Dell'omo J, Donckier J. Comparison of urinary excretion of albumin, alpha 1-microglobulin and retinol-binding protein in diabetic patients. *Diabetes Metab.* 1996 Oct; 22(5):324-30.
76. Pontuch P, Jensen T, Deckert T, Ondrejka P, Mikulecky M. Urinary excretion of retinol-binding protein in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria and clinical diabetic nephropathy. *Acta Diabetol.* 1992; 28:206-10.
77. Sheperd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem.* 1993 Oct 25;268(30):22243-6.
78. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature.* 2001 Feb 8;409(6821):729-33.
79. Yang Q, Graham TE, Mody N, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature.* 2005 Jul 21;436(7049):356-62.
80. Graham TE, Yang Q, Büher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med.* 2006 Jun 15;354(24):2552-63.
81. Shin DJ, Odom DP, Scribner KB, Ghoshal S, McGrane MM. Retinoid regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in liver. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Sep 30;195(1-2):39-54.
82. Kiefer FW, Orasanu G, Nallamshetty S, Brown JD, Wang H, Luger P, Qi NR, Burant CF, Duester G, Plutzky J. Retinaldehyde dehydrogenase 1 coordinates hepatic gluconeogenesis and lipid metabolism. *Endocrinology.* 2012 Jul;153(7):3089-99.
83. Berry DC, Jin H, Majumdar A, Noy N. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein regulates gene expression to inhibit insulin responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 Mar 15;108(11):4340-5.
84. Zemany L, Kraus BJ, Norseen J, Saito T, Peroni OD, Johnson RL, Kahn BB. Downregulation of STRA6 in adipocytes and adipose stromovascular fraction in obesity and effects of adipocyte-specific STRA6 knockdown in vivo. *Mol Cell Biol.* 2014 Mar; 34(6): 1170-86.
85. Berry DC, O'Byrne SM, Vreeland AC, Blaner WS, Noy N. Cross talk between signaling and vitamin A transport by the retinol-binding

- protein receptor STRA6. *Mol Cell Biol*. 2012 Aug;32(15):3164–75.
86. Berry DC, Croniger CM, Ghyselinck NB, Noy N. Transthyretin blocks retinol uptake and cell signaling by the holo-retinol- binding protein receptor STRA6. *Mol Cell Biol*. 2012 Oct;32(19):3851–9.
87. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006 Dec 14;444(7121):860–867.
88. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Jul; 116(7), 1793-1801
89. Kim, J. Y. et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007 Sep; 117(9): 2621-37.
90. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb; 11(2):85-97.
91. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005 Nov; 46(11):2347-55
92. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, Cinti S. Dead adipocytes, detected as crown- like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res*. 2008 Jul;49(7):1562-8
93. Apovian C, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulloor J, Gagua M, McDonnell M, Hess D, Joseph L, Gokce N. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Sep; 28(9):1654-9.
94. Lumeng CN, Bodzin, JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):175-84.
95. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nature Med*. 2009 Aug;15(8):921-9.
96. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and

- adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Med.* 2009 Aug; 15(8): 914–920.
97. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Rev. Immunol.* 2003 Jan; 3(1):23–35.
98. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, Subramanian V, Mukundan L, Ferrante AW, Chawla A. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPAR δ ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* 2008 Jun; 7(6):496–507.
99. Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:275-97.
100. Norseen J, Hosooka T, Hammarstedt A, Yore MM, Kant S, Aryal P, Kiernan UA, Phillips DA, Maruyama H, Kraus BJ, Usheva A, Davis RJ, Smith U, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism. *Mol Cell Biol.* 2012 May; 32(10):2010–9.
101. Moraes-Vieira PM, Yore MM, Dwyer PM, Syed I, Aryal P, Kahn BB. RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell Metab.* 2014 Mar 4;19(3):512–26.
102. Klöting N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Wason CJ, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, Büher M, Kahn BB. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab.* 2007 Jul; 6(1):79-87.
103. Hermsdorff HH, Zulet MA, Puchau B, Martínez JA. Central adiposity rather than total adiposity measurements are specifically involved in the inflammatory status from healthy young adults. *Inflammation.* 2011 Jun; 34(3):161-70.
104. Vitkova M, Klimcakova E, Kovacikova M, Valle C, Moro C, Pollak J, Hanacek J, Capel J, Viguerie N, Richterova B, Bajzova M, Hejnova J, Stich V, Langin D. Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jun; 92(6):2330-5

105. Haider DG, Schindler K, Prager G, Bohdjalian A, Iuger A, Woltz M, Ludvik B. Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2007 Mar; 92(3):1168-71.
106. Takashima N, Omoike H, Iwai N. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance. *N Engl J Med.* 2006 Sep 28;355(13):1392; author reply 1394-5.
107. Ulgen F, Herder C, Kuhn MC, Willenberg HS, Schott M, Scherbaum WA, Schinner S. Association of serum levels of retinol-binding protein 4 with male sex but not with insulin resistance in obese patients. *Arch Physiol Biochem.* 2010 May; 116(2):57-62.
108. Von Eynatten M, Lepper PM, Liu D, Lang K, Baumann M, Nawroth PP, Bierhaus A, Dugi KA, Heemann U, Allolio B, Humpert PM. Retinol-binding protein 4 is associated with components of the metabolic syndrome, but not with insulin resistance, in men with type 2 diabetes or coronary artery disease. *Diabetologia.* 2007 Sep; 50(9):1930-7.
109. Malpeli G, Folli C, Berni R. Retinoid binding to retinol-binding protein and the interference with the interaction with transthyretin. *Biochim Biophys Acta.* 1996 May 2;1294(1):48-54.
110. Mody N, Graham TE, Tsuji Y, Yang Q, Kahn BB. Decreased clearance of serum retinol-binding protein and elevated levels of transthyretin in insulin-resistant ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Apr; 294(4):E785-93.
111. Bernard A, Vyskocyl A, Mahhieu P, Lauwerys R. Effect of renal insufficiency on concentration of free retinol-binding protein in urine and serum. *Clin Chimica Acta.* 1988 Jan 15;171(1):85-94.
112. Burri BJ, Bankson DB, Neidlinger TR. Use of free and transthyretin bound retinol binding protein in serum as tests of vitamin A status in human: effect of high creatinine concentrations in serum. *Clin Chem.* 1990 Apr; 36(4):674-6.
113. Henze A, Frey SK, Raila J, Tepel M, Scholze A, Pfeiffer AF, Weickert MO, Spranger J, Schweigert FJ. Evidence that kidney function but not type 2 diabetes determines retinol-binding protein 4 serum levels. *Diabetes.* 2008 Dec; 57(12):3323-6.
114. Chang YH, Lin KD, Wang CL, Hsieh MC, Hsiao PJ, Shin SJ. Elevated serum retinol-binding protein 4 concentrations are associated with renal dysfunction and uric acid in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008 Nov-Dec; 24(8):629-34.

115. Barazzoni R, Zannetti M, Semolic A, Pirulli A, Cattin MR, Biolo G, Bosutti A, Panzetta A, Bernardi A, Guarnieri G. High plasma RBP4 is associated with systemic inflammation independently of low RBP 4 adipose expression and is normalized by transplantation in non obese, non diabetic patients with chronic kidney disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Jul; 75(1):56-63.
116. Henze A, Frey SK, Raila J, Scholze J, Weickert MO, Tepel M, Zidek W, Schweigert FJ. Alterations of retinol-binding protein 4 species in patients with different stages of chronic kidney disease and their relation to lipid parameters. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Feb 26; 393(1):79-83.
117. Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lossner U, Kratzsch J, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Serum levels of adipokine retinol-binding protein-4 in relation to renal function. *Diabetes Care*. 2007 Oct; 30(10):2588-92.
118. De Fronzo RA, Alvestrand A, Smith D, et al: Insulin resistance in uremia. *J Clin Invest*. 1981; 67:563-568.
119. Shinohara K, Shoji T, Emoto M, Tahara H, Koyama H, Ishimura E, Miki T, Tabata T, Nishizawa Y. Insulin resistance as an independent predictor of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Jul; 13(7):1894-900.
120. Siew ED, Pupim LB, Majchrzak KM, Shintani A, Flakoll PJ, Ikizler TA. Insulin resistance is associated with skeletal muscle protein breakdown in non-diabetic chronic hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2007 Jan; 71(2):146-52.
121. Wang X, Hu Z, Hu J, Du J, Mitch WE. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: activation of the ubiquitin proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology*. 2006 Sep; 147(9):4160-8.
122. Workeneh BT, Rondon-Berrios H, Zhang L, Hu Z, Ayehu G, Ferrando A, Kopple JD, Wang H, Storer T, Fournier M, Lee SW, Du J, Mitch WE. Development of a diagnostic method for detecting increased muscle protein degradation in patients with catabolic conditions. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov; 17(11):3233-9.
123. Akmal M, Massry SG, Goldstein DA, Fanti P, Weisz A, DeFronzo RA. Role of parathyroid hormone in the glucose intolerance of chronic renal failure. *J Clin Invest*. 1985 Mar; 75(3):1037-44.
124. Descamps-Latscha B, Jungers P, Witko-Sarsat V. Immune system dysregulation in uremia: role of oxidative stress. *Blood Purif*. 2002; 20(5):481-4.

- 125.Yoon JW, Pahl MV, Vaziri ND. Spontaneous leukocyte activation and oxygen-free radical generation in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2007 Jan; 71(2):167-72.
- 126.Chonchol M. Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage renal disease. *Semin Dial.* 2006 Jul- Aug; 19(4):291-6.
- 127.Barazzoni R, Bernardi A, Biasia F, Semolic A, Bosutti A, Mucci M, Dore F, Zanetti M, Guarnieri G. Low fat adiponectin expression is associated with oxidative stress in nondiabetic humans with chronic kidney disease- impact on plasma adiponectin concentration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Jul; 293(1):R47-54.
- 128.Alexander MP, Patel TV, Farag YM, Florez A, Rennke HG, Singh AK. Kidney pathological changes in metabolic syndrome: a cross-sectional study. *Am J Kidney Dis.* 2009 May; 53(5):751-9.
- 129.Ingelsson E, Sundström J, Melhus H, Michaëlsson K, Berne C, Vasan RS, Risérus U, Blomhoff R, Lind L, Arnlöv J. Circulating retinol-binding protein 4, cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease in elderly. *Atherosclerosis.* 2009 Sep; 206(1):239-44.
- 130.Bobbert T, Raila J, Schwarz F, Mai K, Henze A, Pfeiffer AF, Schweigert FJ, Spranger J. Relation between retinol, retinol-binding protein 4, transthyretin and carotid intima media thickness. *Atherosclerosis.* 2010 Dec; 213(2):549-51.
- 131.Ingelsson E, Lind L. Circulating retinol-binding protein 4 and subclinical cardiovascular disease in the elderly. *Diabetes Care.* 2009 Apr; 32(4):733-35.
- 132.Huang G, Wang D, Khan UI, Zeb I, Manson JE, Miller V, Hodis HN, Budoff MJ, Merriam GR, Harman MS, Brinton EA, Cedars MI, Su Y, Lobo RA, Naftolin F, Santoro N, Taylor HS, Wildman RP. Associations between retinol-binding protein 4 and cardiometabolic risk factors and subclinical atherosclerosis in recently postmenopausal women: cross-sectional analyses from the KEEPS study. *Cardiovasc Diabetol.* 2012 May 15;11:52.
- 133.Mallat Z, Simon T, Benessiano J, Cleement K, Taleb S, Wareham NJ, Luben R, Khaw KT, Tedgui A, Boekholdt SM. Retinol-binding protein 4 and prediction of incident coronary events in healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jan; 94(1):255-60.
- 134.Sun Q, Kiernan U A, Shi L, Phillips D A, Kahn BB, Hu FB, Manson JE, Albert MD, Rexrode MD. Plasma Retinol-Binding Protein 4 (RBP4) Levels and Risk of Coronary Heart Disease: A Prospective

- Analysis among Women in the Nurses' Health Study. *Circulation*. 2013 May 14;127(19):1938-47.
- 135.Pala L, Monami M, Ciani S, Dicembrini I, Pasqua A, Pezzatini A, Francesconi P, Cresci B, Manucci E, Rotella CM. Adipokines as possible new predictors of cardiovascular diseases: a case control study. *J Nutr Metab*. 2012; 2012:253428.
- 136.Cabr A, Lzaro I, Girona J, Manzanares J, Marimn F, Plana N, Heras M, Masana L. Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *J Intern Med*. 2007 Oct; 262(4):496-503.
- 137.Chu CH, lam HC, Lee JK, Lu CC, SUN CC, Ceng HJ, Wang MC, Chuang MJ. Elevated serum retinol-binding protein 4 concentrations are associated with chronic kidney disease but not with the higher carotid intima-media thickness in type 2 diabetic subjects. *Endocr J*. 2011 Oct 29; 58(10):841-7.
- 138.Pereira AB, Nishida SK, Vieira JG, Lombardi MT, Silva MS, Ajzen H, Ramos OL. Monoclonal antibody-based immunoenzymometric assays of retinol-binding protein. *Clin Chem*. 1993 Mar; 39(3):472-76.
- 139.Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR; UKPDS GROUP. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int*. 2003 Jan; 63(1):225-32;
- 140.Stirling CM1, Mathieson P, Boulton-Jones JM, Feehally J, Jayne D, Murray HM, Adu D.Treatment and outcome of adult patients with primary focal segmental glomerulosclerosis in five UK renal units. *QJM*. 2005 Jun;98(6):443-9. Epub 2005 May 6.
- 141.Edstrm Halling S, Sderberg MP, Berg UB. Predictors of outcome in paediatric IgA nephropathy with regard to clinical and histopathological variables (Oxford classification). *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Feb ;27(2):715-22.
- 142.Honkanen E1, Trnroth T, Grnhagen-Riska C, Sankila R. Long-term survival in idiopathic membranous glomerulonephritis: can the course be clinically predicted? *Clin Nephrol*. 1994 Mar; 41(3):127-34.
- 143.Krolewski AS1, Niewczas MA, Skupien J, Gohda T, Smiles A, Eckfeldt JH, Doria A, Warram JH. Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progression to macroalbuminuria. *Diabetes Care*. 2014; 37(1):226-34.
- 144.Skupien J1, Warram JH, Smiles AM, Niewczas MA, Gohda T, Pezzolesi MG, Cantarovich D, Stanton R, Krolewski AS. The early

- decline in renal function in patients with type 1 diabetes and proteinuria predicts the risk of end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2012 Sep;82(5):589-97.
- 145.Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis.* 1992 Jul; 20(1):1-17.
- 146.Park SE, Lee NS, Park JW, Rhee EJ, Lee WY, Oh KW, Park SW, Park CY, Youn BS. Association of urinary RBP4 with insulin resistance, inflammation, and microalbuminuria. *Eur J Endocrinol.* 2014 Oct; 171(4):443-9.
- 147.Silva MS. Níveis séricos da proteína transportadora de retinol (RBP) em pacientes com nefropatias crônicas [dissertação]. São Paulo: UNIFESP, 1998.
- 148.Cho YM, Youn BS, Lee H, et al. Plasma retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2006; 29(11):2457-61.
- 149.Wolf G. Serum retinol-binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutr Rev.* 2007 May; 65(5):251-6.
- 150.Goulart AC, Oliveira IR, Alencar AP, Santos MS, Santos IS, Martines BM4, Meireles DP, Martines JA, Misciagna G, Benseñor IM, Lotufo PA. Diagnostic accuracy of a noninvasive hepatic ultrasound score for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Sao Paulo Med J.* 2015 Mar-Apr; 133(2):115-24.
- 151.Alkhoury N, Lopez R, Berk M, Feldstein AE. Serum retinol-binding protein 4 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol.* 2009 Nov-Dec; 43(10):985-9.
- 152.Schina M, Koskinas J, Tiniakos D, Hadziyannis E, Savvas S, Karamanos B, Manesis E, Archimandritis A. Circulating and liver tissue levels of retinol-binding protein-4 in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2009 Oct; 39(10):972-8.
- 153.Cano, N.J.M. Metabolism and clinical interest of serum transthyretin (prealbumin) in dialysis patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2002; 40:1313-9.
- 154.Ingenbleek Y1, Bernstein LH2. Plasma Transthyretin as a Biomarker of Lean Body Mass and Catabolic States. *Adv Nutr.* 2015 Sep 15; 6(5):572-80.

- 155.Souza VA,, Oliveira DD, Mansur HN, Fernandes NM, Bastos MG. Sarcopenia in chronic kidney disease. *Bras Nefrol J.* 2015 Jan-Mar; 37(1):98-105.
- 156.Lambadiari V, Kadoglou NP, Stasinou V, Maratou E, Antoniadis A, Kolokathis F, Parissis J, Hatziagelaki E, Iliodromitis EK, Dimitriadis G. Serum levels of retinol-binding protein-4 are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Aug 21; 13:121.