

**Antonio Carlos Cordeiro Silva Júnior**

**Influência do transplante renal e de polimorfismos  
genéticos nos níveis de proteína C reativa em  
pacientes com doença renal crônica**

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

Área de concentração: Nefrologia  
Orientador: Prof. Dr. Hugo Abensur

**São Paulo**

**2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva Júnior, Antonio Carlos Cordeiro

Influência do transplante renal e de polimorfismos genéticos nos níveis de proteína C reativa em pacientes com doença renal crônica / Antonio Carlos Cordeiro Silva Júnior. -- São Paulo, 2007.

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

Área de concentração: Nefrologia.

Orientador: Hugo Abensur.

Descritores: 1.Falência renal crônica 2.Transplante de rim 3.Inflamação  
4.Proteína C-reativa 5.Polimorfismo de um único nucleotídeo

USP/FM/SBD-391/07

## DEDICATÓRIA

Aos meus avós (*in memorian*), Pedro e Graciete Fontes, Mário e Jandyra Cordeiro; de onde tudo começou...

Aos meus pais, Antonio e Antoniêta, grandes incentivadores; que por fazer da vida um exemplo de dedicação e amor aos filhos, são os principais responsáveis por esta conquista...

À minha esposa Fabiane, companheira de todos os momentos; cujo amor e a compreensão têm proporcionado o equilíbrio necessário às minhas realizações...

À minha filha Juliana, por hora no ventre materno; que antes mesmo de nascer já é a razão maior da minha existência...

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Hugo Abensur, meu orientador - pessoa ímpar - exemplo de sabedoria e humildade; por me abrir as portas da pós-graduação, confiar e incentivar em todos os momentos.

Ao Dr. Rui Toledo Barros, o maior responsável pela alta qualidade da pós-graduação em nefrologia da Universidade de São Paulo.

Aos meus sogros, Ironoides e Maria Guimarães, pelo carinho com que me acolheram em sua família e por todo apoio que têm me dado.

Aos meus amigos Verônica Torres, Carolina Neves, Ana Carla Falcão, Aureliano Bezerra e Felipe Monte; pela participação decisiva na minha adaptação à cidade e no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Isac de Castro, que com muita paciência e boa vontade realizou a análise estatística do presente estudo e me transmitiu noções fundamentais de estatística.

A Hélcio Rodrigues, Susan Caroline P. Borba, Rajendranath Ramasawmy, Nicolas Panajatopoulos, Carlos Sergio Viggiani e Germano Preuhs; do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração, pelo imensurável apoio à realização do presente estudo.

Aos Drs. Luiz Estevam Ianhez, Elias David-Neto e Lilian Monteiro Pereira; por me abrir as portas da Unidade de Transplante Renal.

À Dra. Sandra Neiva Coelho, pelo incentivo à realização da pós-graduação.

A todos os profissionais que compõem o serviço de Nefrologia e Transplante Renal, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco; cujo apoio foi fundamental para os meus primeiros passos no fascinante campo da Nefrologia.

À enfermeira Fabiana Agena, pela coordenação do processo de coleta das amostras e recrutamento dos pacientes.

A Margarete Soares e Maria Cristina M. Coutinho, pela coleta das amostras sanguíneas.

A Mirela Aparecida R. Santinho e Márcia Ribalta pela preparação das amostras.

Ao Laboratório Central do HCFMUSP pela realização dos exames laboratoriais.

Às secretárias Maria Cristina A.de Assumpção, Célia Aparecida Celan, Eliana Maria Gonçalves e Nilze Aparecida Ortega, pela presteza e boa vontade com que sempre me atenderam.

A todos os pacientes que concordaram em participar do estudo, sem os quais nada teria sido possível.

À CAPES, agência fomentadora de pesquisa, pelo suporte financeiro fornecido durante a realização do presente estudo.

## SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Má Nutrição.....	4
1.2 Stress Oxidativo.....	6
1.3 Inflamação.....	8
1.3.1 Fatores Diretamente Relacionados à DRC .....	11
1.3.1.2 Produtos Avançados da Glicosilação (AGEs).....	12
1.3.1.3 Terapia Dialítica .....	12
1.3.2 Fatores Não Relacionados Diretamente à DRC .....	13
1.3.2.1 Infecções.....	13
1.4 Aterosclerose.....	14
1.5 Predisposição Genética.....	17
1.6 Abordagem Terapêutica .....	21
1.7 Inflamação e Transplante Renal:.....	24
2. OBJETIVOS .....	27
3. MÉTODOS .....	29
3.1 Protocolo de Estudo (Figura 2).....	30
3.2 Exames Laboratoriais.....	33
3.3 Polimorfismos Genéticos .....	33
3.4 Análise Estatística.....	36

4. RESULTADOS.....	38
4.1 Dados Clínicos.....	39
4.2 Evolução da Proteína “C” Reativa.....	42
4.3 Análise Genética.....	45
4.3.1 Divisão dos Grupos .....	45
4.3.1.1 Divisão Pelo Genótipo .....	45
4.3.1.2 Divisão Pela Presença ou Ausência do Alelo “T” ...	50
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÕES.....	66
7. REFERÊNCIAS .....	68

## RESUMO

Silva Júnior ACC. *Influência do transplante renal e de polimorfismos genéticos nos níveis de proteína C reativa em pacientes com doença renal crônica* [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 86p.

Avaliamos a influência do transplante renal (Tx) e de “polimorfismos de nucleotídeos isolados” (SNPs), na região promotora do gen codificador da proteína C reativa, sob os níveis de PCR, em 50 pacientes com doença renal crônica em terapia dialítica. Os níveis de PCR foram avaliados no período pré-Tx, no primeiro e segundo anos pós-Tx. Inicialmente, os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com os percentis (25, 50 e 75) dos níveis de PCR no período pré-Tx. Em seguida, avaliamos os genótipos para 2 SNPs, um bi-alélico na posição -409 (G→A) e um tri-alélico (C→T→A) na posição -390. Na análise geral os níveis de PCR decresceram significativamente no primeiro ano pós-Tx e tiveram uma elevação, não significativa, no segundo ano após o transplante. Após a divisão por percentis, observamos que nos pacientes cujos níveis de PCR se situavam dentro da normalidade (percentis 25 e 50), este marcador se manteve estável ao longo do estudo, enquanto houve uma significativa e progressiva redução dos níveis de PCR, pós-Tx, nos pacientes do percentil 75 ( $p=0,002$ ). Todos os pacientes apresentaram o genótipo -409GG, quando avaliados para o SNP nesta posição. Quando avaliados para a posição -390, não foram encontrados pacientes com o alelo “A”, havendo 15 pacientes com o genótipo “CC”, 11 “TT” e 24 “CT”. A média geral dos níveis de PCR diferiu significativamente entre os indivíduos de diferentes genótipos ( $p=0,019$ ). A presença do alelo “T” associou-se a níveis mais elevados de PCR no pré-transplante ( $p=0,007$ ) e no primeiro ano pós ( $p=0,001$ ), fato não observado no segundo ano ( $p=0,146$ ). Concluímos que o Tx reduz os níveis de PCR em pacientes com PCR previamente elevada. SNPs na posição -390 da região promotora do gen codificador da PCR influenciam os níveis basais desta proteína, de tal forma que o alelo “C” se associa com os menores níveis de PCR e o alelo “T” com os maiores. Em nossos pacientes, esta influência deixou de ser observada no segundo ano pós-Tx.

Descritores: 1.Falência renal crônica 2.Transplante de rim 3.Inflamação 4.Proteína C reativa 5.polimorfismo de um único nucleotídeo.



## SUMMARY

Silva Júnior ACC. *Influence of Kidney Transplantation and Single-Nucleotide Polymorphisms on C - Reactive Protein Levels in Chronic Kidney Disease Patients* [thesis]. São Paulo. “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 86p.

We evaluated the influence of kidney transplantation (Tx), as well as single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the “C” reactive protein (CRP) gene promoter region on CRP levels in 50 patients with chronic kidney disease under dialysis. CRP levels were evaluated at pre-Tx, as well as during the first and second years post-Tx. Initially, patients were divided into three groups according to pre-Tx CRP percentiles (25, 50 and 75). At the same time, we evaluated the genotypes for 2 SNPs, a bi-allelic (G→A) at the -409 position and a tri-allelic (C→T→A) at the -390 position. In general analysis, CRP levels were significantly reduced in the first year and increased, not significantly, in the second year post Tx. Upon dividing the groups, the patients with CRP levels under the normal range (25<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> percentiles) presented stable, whereas there was a progressive and significant reduction in the post Tx CRP levels in patients in the 75<sup>th</sup> percentile (p=0.002). All patients presented the -409GG genotype. When evaluated for the -390 position, the “A” allele was not found and there were 15 “CC” pts, 11 “TT” and 24 “CT”. CRP general means were different among patients with different genotypes (p=0.019). Also, allele “T” presence was associated with higher CRP levels in the pre-Tx (p=0.007) and first year post (p=0.001), but not at the second year post-Tx (p=0.146). We concluded that Tx reduces CRP levels in patients with previously high CRP. SNPs at the -390 position of the CRP gene promoter region influence CRP’s basal levels in such a way that the “C” allele correlates with the lowest and the “T” with the highest. We did not observe this influence in our patients at the second year post-Tx.

Descriptors: 1.Kidney failure, chronic 2.Kidney transplantation  
3.Inflammation 4.C-reactive protein 5.Polymorphism, single nucleotide

---

# **1. INTRODUÇÃO**

---

A despeito dos notáveis avanços tecnológicos na terapia dialítica desde sua introdução na década de 50 até os dias atuais, a taxa de mortalidade dos pacientes em diálise permanece extremamente elevada, estimando-se ser aproximadamente 30 vezes maior que a do restante da população. Mesmo após a estratificação para fatores de risco conhecidos como idade, sexo, tabagismo, sedentarismo, hipertensão e presença de diabetes mellitus (DM), a mortalidade ainda se encontra em média 10 a 20 vezes superior à da população geral <sup>1</sup>.

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte em pacientes com doença renal crônica (DRC), o que chega a ser de certo modo surpreendente, quando se considera que as alterações lipídicas não chegam a ser tão severas nestes pacientes, pois as mesmas são primariamente caracterizadas pela redução nos níveis do colesterol HDL (HDL) e um pequeno aumento nos níveis do colesterol LDL (LDL). Contudo, tem-se demonstrado que o comprometimento apenas moderado da função renal está relacionado à disfunção endotelial e já é um preditor independente de risco de mortalidade cardiovascular <sup>1-3</sup>.

Novos fatores de risco, denominados não tradicionais, vêm sendo estudados ultimamente, buscando-se entender a marcada prevalência de doença vascular em DRC. Entre os fatores não tradicionais, podemos destacar a presença de alterações no metabolismo de cálcio e fósforo, anemia, stress oxidativo e inflamação. A inflamação tem sido cada vez mais reconhecida como um importante fator de risco epidemiológico para o desenvolvimento DCV na população em geral <sup>2-4</sup>.

No final da década de 90, Stenvinkel e cols. <sup>5</sup> descreveram a elevada prevalência de má nutrição, inflamação e aterosclerose de carótidas em pacientes com doença renal crônica no período pré-dialítico. O termo MIA síndrome passou a ser usado para descrever a associação destes fatores, sugerindo-se que o sinergismo entre diferentes mecanismos, tais como a má-nutrição, o estresse oxidativo e a ativação da resposta inflamatória, associados à predisposição genética, seria um dos principais determinantes do rápido desenvolvimento da doença aterosclerótica em pacientes urêmicos.

## 1.1 Má Nutrição

Sinais de deterioração nutricional começam a se tornar evidentes na DRC à medida que a taxa de filtração glomerular chega aos 20 ml/min. Nesta fase, observa-se, laboratorialmente, o decréscimo das concentrações séricas de albumina, pré-albumina e transferrina, bem como, clinicamente, a redução da circunferência braquial. Baixo peso corporal, desnutrição energético-protéica, além de níveis séricos reduzidos de albumina, pré-albumina e transferrina são alterações relativamente comuns em pacientes com DRC em terapia dialítica, oscilando em torno de 23-76% na hemodiálise (HD) e 18-50% na diálise peritoneal (DP), de acordo com diferentes estudos<sup>2,6-9</sup>.

A redução espontânea na ingestão calórico-protéica resultante da DRC avançada contribui para decréscimo dos marcadores nutricionais, porém não é capaz de explicar a presença de níveis elevados de marcadores positivos de fase aguda como a Proteína C Reativa (PCR), dentre outros, em pacientes com sinais de má nutrição. São descritos dois tipos de desnutrição em pacientes com doença renal crônica: o primeiro (tipo 1) é associado à síndrome urêmica per se ou fatores a ela relacionados, sendo a redução da ingestão protéica com uma conseqüente redução no catabolismo protéico o achado principal,

havendo apenas uma modesta redução nos níveis séricos de albumina, e o segundo tipo (tipo 2) caracteriza-se por marcada hipoalbuminemia, metabolismo energético e catabolismo protéico aumentados, além de um incremento no stress oxidativo. Pacientes com desnutrição tipo 2 têm, freqüentemente, algum tipo de resposta inflamatória, evidenciada por níveis séricos elevados de PCR e citocinas pró-inflamatórias. O mais comum, contudo, parece ser a presença de um “over-lap” contínuo de ambos os tipos na maior parte dos pacientes <sup>10</sup>.

É difícil estabelecer o verdadeiro papel do estado nutricional no desenvolvimento da síndrome bem como enquadrá-lo como causa ou conseqüência da mesma. Podemos inferir, no entanto, que a má-nutrição possa implicar no decréscimo da ingestão de substâncias antioxidantes e, conseqüentemente aumentar o ambiente de stress oxidativo. Por outro lado, em pacientes desnutridos, a alteração na composição de proteínas plasmáticas, pode favorecer o aumento na biodisponibilidade de substâncias pro-aterogênicas, como a homocisteína <sup>11</sup>.

Na prática clínica, níveis reduzidos de albumina são capazes de predizer a mortalidade geral em pacientes com DRC nos estágios 3 e 4, de forma independente aos níveis plasmáticos de PCR <sup>12</sup>.

## 1.2 Stress Oxidativo

Um perfeito equilíbrio entre substâncias oxidantes e anti-oxidantes representa condição “*sine qua non*” para a homeostase.

O stress oxidativo passa a existir quando esta relação se altera por uma produção excessiva de radicais livres e/ou depleção de antioxidantes. Dentre estes últimos, podemos citar moléculas como selênio, zinco, tocoferol, ácido ascórbico e carotenóides entre outras, e enzimas como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Os radicais livres, por sua vez, derivam da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) originárias de ânions superóxido, formados a partir da cadeia respiratória mitocondrial <sup>11,13,14</sup>.

Outros processos enzimáticos, como a ativação da NADPH oxidase que ocorre quando há estimulação de polimorfonucleares e monócitos, da xantina-oxidase nas lesões isquêmicas e da ciclo-oxigenase, quando da síntese de prostaglandinas, aumentam a produção de ânions superóxido. A presença simultânea de outros radicais livres, como óxido nítrico ou metais de transição, resulta na produção de radicais hidroxil ou peroxil, os mais deletérios agentes peroxidantes <sup>13-15</sup>.

Pacientes com DRC- estágios 3 a 5- têm prevalência aumentada de marcadores de stress oxidativo, cujo motivo parece ser multifatorial.

Anemia, anormalidades metabólicas associadas à uremia, depleção de antioxidantes (por remoção no procedimento dialítico e/ou ingestão insuficiente), bioincompatibilidade de membranas de hemodiálise e uso de drogas como o ferro endovenoso, eritropoetina e heparina são os fatores mais comumente relacionados ao desequilíbrio redox na população com doença renal <sup>11,16-18</sup>.

Os radicais livres em excesso, de forma crônica ou aguda, induzem a peroxidação de membranas celulares e lipídios, promovem danos a proteínas e ácidos nucleicos bem como atuam na ativação de eventos que terminam por mediar a expressão de genes ligados à produção de citocinas inflamatórias e divisão, diferenciação e apoptose celular <sup>13,17</sup>. O desequilíbrio entre radicais livres e antioxidantes, por predispor à peroxidação lipídica e oxidação de lipoproteínas gerando, assim, o substrato para a formação das placas ateroscleróticas, é também um importante fator no desenvolvimento de aterosclerose em pacientes com DRC <sup>14,15</sup>. Heitzer e cols. <sup>20</sup> demonstraram que o incremento do stress oxidativo prediz o risco de eventos cardiovasculares em pacientes com doença coronariana.

Ainda não é clara a participação da inflamação na gênese e perpetuação do stress oxidativo. Contudo, em um estudo recente envolvendo pacientes com doença vascular periférica foi encontrada uma



relação inversa entre a concentração sérica de vitamina C e os níveis de PCR <sup>21</sup>. A albumina é considerada o mais importante antioxidante plasmático, de forma que, conhecendo-se seu comportamento frente à inflamação, é possível inferir que pacientes com o estado micro-inflamatório cronicamente ativado, seriam mais sensíveis ao excesso de radicais livres <sup>17, 18, 22</sup>.

### **1.3 Inflamação**

O estado inflamatório crônico tem sido apontado como o principal determinante da MIA síndrome. Estima-se que entre 30-50% dos pacientes no período pré-dialítico, bem como em HD e DP, tenham evidência sorológica de ativação da resposta inflamatória caracterizada pela elevação nos níveis séricos de PCR <sup>23</sup>.

A proteína C reativa humana foi inicialmente descrita como uma proteína sérica que se ligava ao polissacarídeo “C” do *Streptococcus pneumoniae*. É um marcador inflamatório de fase aguda muito sensível e não específico, produzido pelos hepatócitos sob a influência de citocinas inflamatórias, notadamente a interleucina 6 (IL-6). Constitui-se de cinco sub-unidades idênticas, covalentemente ligadas, não glicosiladas, não

fosforiladas, codificadas por um gen localizado no cromossomo 1. Cada sub-unidade consiste de 206 polipeptídios interligados por pontes dissulfeto. A PCR é uma proteína multifuncional e, por ser um fator de defesa não específico, age como opsonina para bactérias, parasitas e imunocomplexos assim como tem a capacidade de ativar a via clássica do complemento <sup>13</sup>.

Uma recente análise fundamentada em dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), a partir da avaliação de 8874 adultos ( $\geq 20$  anos) nos Estados Unidos da América, revelou que os níveis de PCR na população geral variavam de 0,1 a 296 mg/l, (média 4,3; mediana 2,1). Os níveis de proteína C reativa tenderam a ser mais elevados nas mulheres (mediana 2,7 mg/l vs 1,6 mg/l) e revelaram uma tendência de aumento de acordo com a idade (mediana 1,4 mg/l entre aqueles com 20-29 anos vs 2,7 mg/l entre os com 80 anos ou mais). A variação não foi tão importante quando analisada entre os diferentes grupos étnicos <sup>24</sup>.

A relação entre inflamação (mensurada pelos níveis de PCR) e DRC é estabelecida já em estágios iniciais da doença renal <sup>25</sup>. Romão Jr. e cols. <sup>4</sup> demonstraram uma associação entre os níveis séricos de PCR e os diferentes estágios da doença renal crônica.

O papel do estado inflamatório como fator de risco no desenvolvimento e aceleração da doença aterosclerótica nos pacientes com DRC é bem descrito <sup>26</sup>. Pecoits e cols. <sup>27</sup> reportaram a elevação da IL-6 como fator preditor de mortalidade em pacientes iniciando HD e DP. Zocalli e cols. <sup>28</sup> descreveram a PCR como fator preditor independente do número de placas ateroscleróticas em carótidas de pacientes em terapia dialítica. Estudos epidemiológicos prospectivos têm mostrado que o nível plasmático de PCR, avaliado por meio de um ensaio de alta sensibilidade (hs-PCR), é um importante fator preditor independente de risco para o desenvolvimento futuro de infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular cerebral (AVC) e doença vascular periférica em indivíduos sem doença cardiovascular documentada previamente <sup>29</sup>.

Além de maior risco de mortalidade cardiovascular, a inflamação tem sido imputada também como fator de risco para mortalidade geral em pacientes com DRC <sup>12,30-33</sup>. Ressalte-se que o estado inflamatório pode ter oscilações ao longo do tempo, observando-se, entretanto, que a elevação persistente dos níveis de proteína “C” reativa também é um importante fator preditor de mortalidade nos pacientes em hemodiálise <sup>34</sup>.

O estado micro-inflamatório crônico em portadores de DRC pode estar relacionado a processos decorrentes da doença renal per si e terapia dialítica ou de processos não relacionados propriamente à doença ou ao seu tratamento.

### 1.3.1 Fatores Diretamente Relacionados à DRC

#### 1.3.1.1 Alterações Imunológicas

As células do sistema imunológico têm sua atividade alterada na uremia. Nos pacientes com DRC são descritas a diminuição da função fagocítica de granulócitos e monócitos / macrófagos, alterações no mecanismo de apresentação de antígenos pelos monócitos / macrófagos e produção diminuída de anticorpos pelos linfócitos B. A imunidade celular também se encontra comprometida em pacientes urêmicos, observando-se significativa redução de células “T” CD4 e CD8 tanto nativas quanto do subtipo de memória central. Há um claro déficit de proliferação linfocitária *in vitro* além de uma grande redução na síntese de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2). O mecanismo exato responsável por estas alterações ainda não é completamente entendido, porém, seu resultado final já bem conhecido, é o alto risco de complicações infecciosas nesta população<sup>13, 35</sup>.

Além disso, há um estado de pré-ativação monocitária, ou seja, a produção de citocinas pelos monócitos é normal nos períodos inter-dialíticos, contudo sob estimulação, existe uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias<sup>13</sup>.

### **1.3.1.2 Produtos Avançados da Glicosilação (AGEs)**

O déficit de função renal, por si, pode contribuir com a inflamação pelo acúmulo de substâncias ou produtos do metabolismo com atividade pró-inflamatória <sup>2,13</sup>.

O acúmulo de AGEs, como a pentosidina, normalmente associado com o diabetes mellitus (DM), bem como de produtos avançados da oxidação lipídica, é observado no plasma de pacientes com DRC a despeito de seus níveis glicêmicos <sup>36</sup>.

O rim normalmente desempenha um papel importante no metabolismo dos AGEs, entretanto, como a maior parte destes elementos encontra-se ligada a proteínas de alto peso molecular como a albumina, a diálise tem pouco efeito sobre suas concentrações. Níveis elevados destas substâncias acabam por ativar a resposta inflamatória através de estímulos à ativação de monocitárias e à secreção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos <sup>2,13,36</sup>.

### **1.3.1.3 Terapia Dialítica**

Os principais fatores envolvidos na estimulação imunológica durante a hemodiálise são a bioincompatibilidade das membranas e a qualidade das soluções de diálise. A exposição de células mononucleares

circulantes a membranas de diálise bioincompatíveis, assim como a soluções de diálise contaminadas, leva à ativação das células mononucleares e conseqüente produção de citocinas inflamatórias que terminam por desencadear uma resposta inflamatória, caracterizada pela elevação dos níveis séricos dos reagentes positivos de fase aguda (PCR, alfa-1 glicoproteína ácida, haptoglobina, amilóide A, fibrinogênio), bem como pelo decréscimo dos negativos (albumina e transferrina)<sup>9, 13, 37-40</sup>.

Na diálise peritoneal, a bioincompatibilidade das soluções, tendo como fator preponderante a elevada concentração de glicose que leva à toxicidade da membrana peritoneal, é o principal determinante da ativação da resposta inflamatória. Há relação direta entre inflamação e a situação de alto transporte em DP<sup>41</sup>.

### **1.3.2 Fatores Não Relacionados Diretamente à DRC**

#### **1.3.2.1 Infecções**

As infecções constituem a segunda causa mais comum de morte nos portadores de doença renal crônica. Pacientes com DRC estão mais propensos a internações por bacteremia e/ou septicemia que o restante da população. Doentes renais crônicos, quando internados por bacteremia,

têm uma mortalidade, em seis meses, até 10 vezes maior que os internados por outras causas, incluindo síndromes coronarianas agudas e insuficiência cardíaca congestiva<sup>35, 42, 43</sup>.

Dois fatores principais estão envolvidos na alta incidência de eventos infecciosos nesta população: o déficit imunológico, próprio da uremia e os acessos, tanto os vasculares quanto os peritoneais, utilizados para a terapia dialítica. Infecções subclínicas, como as causadas por próteses vasculares trombosadas ou doenças periodontais, dentre outras, muitas vezes passam despercebidas e adquirem um curso crônico<sup>35, 43-45</sup>.

O paciente infectado tem, como mecanismo de defesa, a ativação da resposta inflamatória. Deste modo quadros infecciosos de curso crônico terminam por perpetuar um estado inflamatório cronicamente ativado<sup>13</sup>.

## **1.4 Aterosclerose**

A observação de indivíduos nos quais a doença aterosclerótica se manifestava em uma proporção maior do que a esperada para fatores de risco tradicionais - idade, sexo, raça, história familiar, diabetes mellitus (DM), dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade e

tabagismo - levou ao estudo dos chamados fatores de risco não tradicionais<sup>46</sup>. A partir de então, muito se evoluiu no estudo do papel do estado inflamatório e na implicação direta de citocinas inflamatórias no desenvolvimento da aterosclerose.

O estado inflamatório leva à produção hepática de proteínas de fase aguda que têm papel aterogênico direto como o fibrinogênio e a lipoproteína “a”. A ativação neutrofílica leva ao incremento dos níveis da enzima mieloperoxidase, a qual, por sua vez, termina por promover a oxidação do LDL, levando à formação do LDL-oxidado. Além disso, a estrutura do HDL é alterada quando da presença de inflamação, caracterizando-se esta alteração pela redução nos seus níveis de apolipoproteína “A-1” e também por incremento de triglicerídeos em sua estrutura. Estas alterações levam ao comprometimento de suas funções, como o papel antioxidante de reduzir as partículas de LDL-oxidado<sup>2, 47</sup>.

O perfil de dislipidemia mais comum nos pacientes dialíticos consiste em níveis elevados de triglicerídeos, associados à modesta elevação do LDL bem como a baixos níveis de HDL. São fatores preditores de mortalidade cardiovascular, nesta população, o baixo nível de colesterol HDL e a relação triglicerídeos/HDL alta. Além disso, os pacientes com menores níveis de colesterol total têm maior mortalidade por DCV que aqueles com altos níveis de LDL. As alterações estruturais



e funcionais nas lipoproteínas, resultantes da inflamação e do stress oxidativo, podem estar relacionadas, em parte, com esta aparente contradição<sup>2, 48</sup>.

A aterosclerose não é uma simples “doença”, mas um processo contínuo de resposta a numerosos insultos ao endotélio e às células musculares da parede vascular. Assim, todo processo de desenvolvimento da placa aterosclerótica, desde a lesão mais inicial à mais avançada, está diretamente relacionado à ativação da resposta inflamatória<sup>49</sup>.

O processo inicial ocorre com a adesão e subsequente penetração de leucócitos circulantes no endotélio vascular, notadamente nas artérias de grande e médio porte. Esta etapa é proporcionada pela expressão na superfície endotelial, em resposta a citocinas inflamatórias, de moléculas de adesão de células vasculares (VCAM-1), moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e seletinas. Subseqüentemente, na camada íntima do endotélio lesado, passa a haver o acúmulo de partículas de lipoproteínas de baixa densidade. Uma vez na região subendotelial, sob alterações oxidativas que aumentam sua antigenicidade, as partículas de LDL-oxidado passam a estimular as células endoteliais a produzirem citocinas pró-inflamatórias e estimulam a ativação *in situ* de monócitos/macrófagos, levando à formação das “foam cells”. Com a

continuidade do processo inflamatório, linfócitos, macrófagos, “foam cells” e células endoteliais passam a secretar citocinas e fatores de crescimento que vão promover a migração e proliferação de células musculares lisas na íntima<sup>26, 47, 50</sup>.

A inflamação tem papel determinante também na instabilidade da placa aterosclerótica, uma vez que a vulnerabilidade da mesma está diretamente relacionada ao número de elementos inflamatórios em seu interior. Macrófagos ativados, linfócitos “T” e mastócitos nos sítios de ruptura da placa produzem vários tipos de moléculas (citocinas inflamatórias, proteases, fatores de coagulação) que desestabilizam a lesão<sup>47, 51</sup>.

Numerosas evidências têm sido levantadas apontando o papel pró-aterogênico direto da PCR e de citocinas inflamatórias como a IL-6 entre outras, inferindo-se que podem ser mais que apenas marcadores de doença aterosclerótica<sup>52,53</sup>.

## **1.5 Predisposição Genética**

Na vigência de episódios de infecção e/ou inflamação aguda, os níveis de PCR chegam a estar 100 a 1000 vezes acima do basal<sup>54</sup>; na ausência destas circunstâncias, a concentração sérica desta proteína é

estável, com seus níveis absolutos sendo influenciados por fatores como idade, sexo, tabagismo e índice de massa corporal (IMC) <sup>24</sup>. Nos últimos anos, tem-se apontado a importância de fatores genéticos que chegam a responder por até 40% da variação inter-individual dos níveis de PCR <sup>55</sup>.

Diferentes tipos de variações genéticas são encontrados no genoma humano. De longe, o mais comum tipo de variação, respondendo por aproximadamente 90% do total, é o polimorfismo de nucleotídeos isolados (SNP, de single nucleotide polymorphisms). A seqüência genômica do DNA é uma combinação linear de quatro nucleotídeos. Denomina-se SNP a troca de um nucleotídeo por outro em uma determinada seqüência. Existem entre dois e três milhões de SNPs documentados, sendo encontrados em praticamente todos os genes, contudo apenas uma minoria resulta em variações de aminoácidos e proteínas <sup>56, 57</sup>.

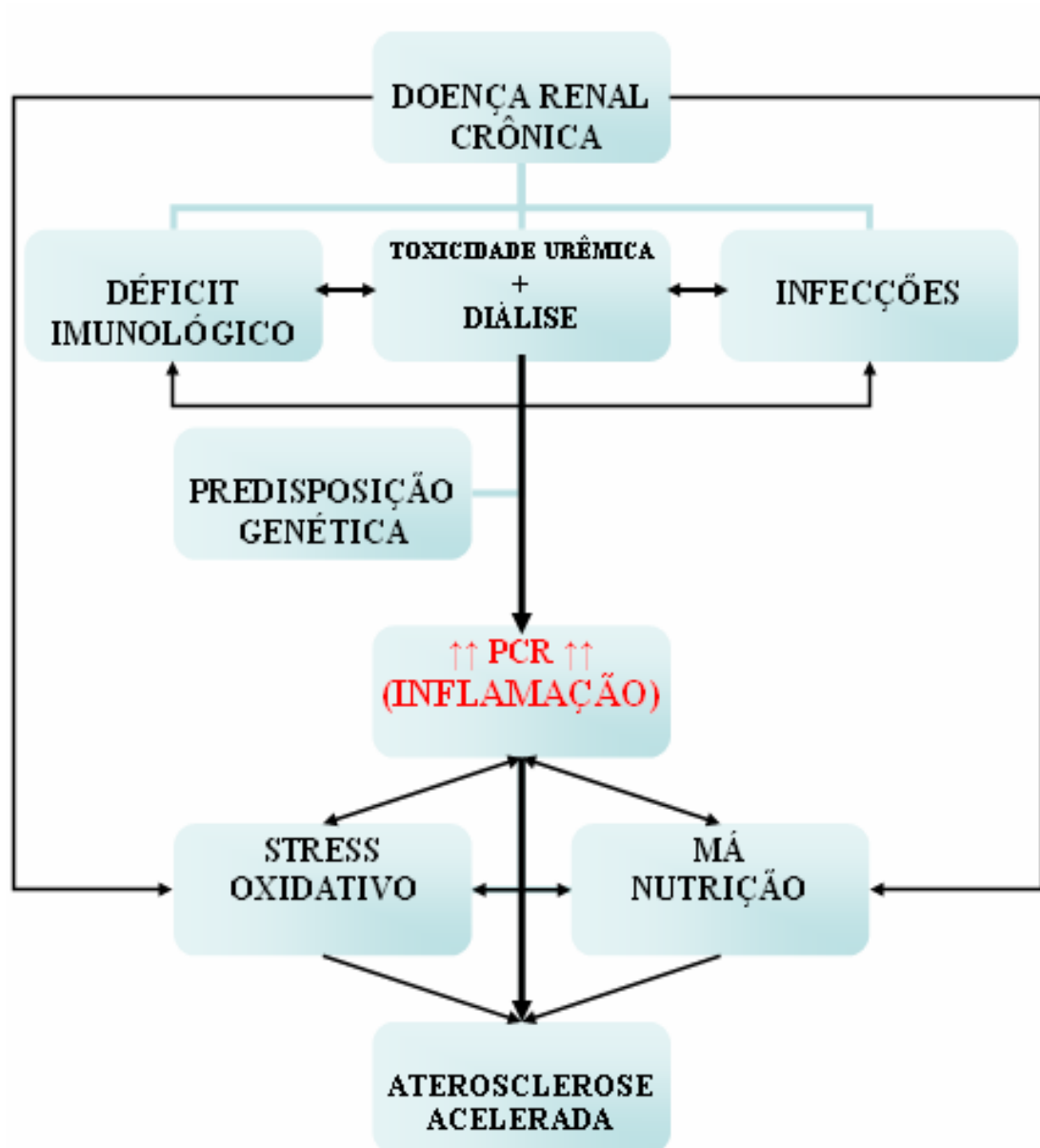
Estudos epidemiológicos têm apontado para um determinismo genético, pelo menos em parte, na iniciação, progressão e desenvolvimento de complicações de doenças renais. Todavia, em contraste com doenças de distribuição mendeliana, resultantes de mutações em um único gene, como no caso da doença renal policística, a doença renal crônica e suas complicações têm fatores determinantes mais complexos. Assim, as diferenças individuais nas complicações da

DRC, como a MIA síndrome, parecem resultar dos efeitos combinados de uma série de genes, cada um contribuindo com uma pequena parte para o todo <sup>56,58</sup>.

A identificação de uma série de SNPs que se correlacionam com os níveis plasmáticos de PCR mostra que essa é uma área promissora na identificação de fatores de risco para a inflamação e seu corolário, a doença aterosclerótica <sup>54, 56, 59, 60</sup>. Szalai e cols. <sup>61</sup> e Carlson e cols. <sup>55</sup>, recentemente, descreveram dois polimorfismos funcionais nas posições -409 e -390 da região promotora do gen codificador da PCR que influenciam a atividade transcripcional desta região *in vitro* e se associam com as diferenças nos níveis basais desta proteína em indivíduos saudáveis.

Com base no exposto, podemos inferir que pacientes com DRC e predisposição genética à maior produção de PCR estariam sob maior risco de desenvolvimento de um estado microinflamatório sistêmico cronicamente ativado e por conseguinte, sob maior risco cardiovascular (Figura 1).

## Inter-relações entre Doença Renal Crônica, Inflamação e Aterosclerose



**Figura 1.** Pacientes com predisposição genética, ao desenvolverem DRC, evoluiriam com maior ativação do estado microinflamatório sistêmico e, conseqüentemente, maior risco cardiovascular

## 1.6 Abordagem Terapêutica

A despeito de todo o conhecimento agregado em torno da MIA síndrome e suas repercussões na morbi-mortalidade dos pacientes com DRC, pouco se avançou até o momento na busca de uma terapia apropriada para o estado inflamatório crônico.

Em linhas gerais, recomenda-se a otimização da terapia dialítica com o uso de membranas biocompatíveis e a utilização de solução de diálise ultra-pura<sup>62-64</sup>. Infecções crônicas devem ser rastreadas e tratadas adequadamente, assim como se deve tentar tratar de forma adequada comorbidades como a insuficiência cardíaca e a doença arterial coronária, condições que, aparentemente, estão relacionadas à perpetuação do estado inflamatório<sup>65</sup>.

O ácido acetil salicílico (AAS) e os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA's) têm mostrado ação redutora sobre os níveis de PCR e de algumas citocinas (dentre as quais IL-6 e fator de necrose tumoral alfa), cabendo sua indicação de acordo com a situação clínica de cada paciente<sup>66-68</sup>.

A vitamina E tem mostrado diminuir a suscetibilidade das lipoproteínas de baixa densidade à oxidação e ter boa ação na prevenção secundária de doença cardiovascular em pacientes com

DRC. Além disso, estudos com pacientes sem insuficiência renal mostraram que a suplementação com esta vitamina reduz os níveis séricos de PCR e IL-6<sup>69-72</sup>. Evidências indiretas de uma ação antiinflamatória da vitamina E, assim como de outros antioxidantes como vitamina C, melatonina e glutathione, têm surgido a partir de estudos mostrando que estas substâncias promovem melhora na resposta terapêutica à eritropoetina em pacientes em diálise<sup>73-77</sup>.

O tratamento com anti-citocinas, tendo em vista a forte relação entre os níveis elevados destas e a mortalidade nos pacientes com MIA síndrome, pode ter um papel importante no futuro. A talidomida, que inibe seletivamente a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), já se mostrou eficaz em reverter a síndrome consumptiva associada ao HIV e à tuberculose, podendo vir a ter algum emprego no tratamento da inflamação em diálise. São necessários, contudo, estudos avaliando seu resultado nos pacientes com MIA síndrome<sup>65,78,79</sup>.

Os inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima “A” redutase (estatinas) têm exercido papel de destaque no tratamento da doença aterosclerótica, papel este que não está relacionado apenas ao controle dos níveis de colesterol. As estatinas aumentam o número e a funcionalidade das células progenitoras endoteliais (EPC) em pacientes com doença arterial coronariana e aceleram a reendotelização após os

traumas por balão de angioplastia<sup>80</sup>. Diversos estudos vêm demonstrando que as estatinas promovem benefício clínico aos pacientes com PCR elevada e reduzem, de forma dose dependente, os níveis desta proteína. Este efeito antiinflamatório correlaciona-se com a redução na velocidade de progressão da doença aterosclerótica assim como com uma menor recidiva de eventos coronarianos agudos, de forma independente da redução dos níveis de colesterol LDL. Diante de tantas evidências acerca da importância da ação antiinflamatória das estatinas no controle da doença aterosclerótica, discute-se a monitorização dos níveis da proteína C reativa, tanto quanto do colesterol, no ajuste da terapia com estas drogas<sup>81-83</sup>.

Wanner e cols.<sup>84</sup> não encontraram efeito significativo com o uso de artovastatina no que se refere à redução da mortalidade por causas cardíacas e nem da incidência de infarto agudo do miocárdio (IAM), não fatal, em pacientes com DM tipo 2 em hemodiálise. De forma surpreendente, houve maior número de episódios fatais de acidente vascular cerebral (AVC), e de eventos cardíacos combinados no grupo que usou a estatina. Nissen e cols.<sup>85</sup>, em estudo recente envolvendo a população geral, demonstraram haver redução no volume da placa aterosclerótica coronariana (via ultra-sonografia intracoronária) em pacientes submetidos a terapia com 40mg/dia de rosuvastatina. Este



achado foi correlacionado com a redução do LDL a níveis abaixo dos atualmente preconizados, bem como com um significativo incremento do HDL.

## **1.7 Inflamação e Transplante Renal:**

O transplante renal (Tx) é considerado o tratamento de escolha para a DRC, pois, em comparação com a terapia dialítica, apresenta resultados superiores, no que tange à morbidade, mortalidade, custos e qualidade de vida<sup>86</sup>. Contudo, quando comparados com a população em geral, os transplantados exibem taxa desproporcionalmente alta de doença aterosclerótica. Além disso, as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte com o enxerto funcionante em transplantados renais. A elevada prevalência dos fatores de risco cardiovascular tradicionais não é capaz de explicar plenamente a incidência de DCV nesta população e os fatores não tradicionais, como a inflamação, têm sua importância cada vez mais enfatizada<sup>1,87-89</sup>.

Varagunam e cols.<sup>88</sup> evidenciaram que o nível de PCR pré-transplante é um importante preditor de mortalidade cardiovascular e geral. Ducloux e cols.<sup>89</sup>, em um estudo prospectivo, envolvendo

pacientes com transplantes renais bem sucedidos, demonstraram que naqueles com maiores níveis de PCR havia risco significativamente maior de desenvolvimento de eventos cardiovasculares.

Os determinantes das concentrações plasmáticas de PCR no pós Tx ainda não são completamente conhecidos. Em comparação com a população geral, existem alguns fatores de potencial importância como a presença de uma resposta imunológica crônica ao enxerto, os efeitos pró-inflamatórios dos diferentes graus de uremia e o efeito antiinflamatório da terapia imunossupressora. Ree e cols.<sup>90</sup> reportaram a importância do tabagismo e da obesidade, quando avaliada pela circunferência abdominal, como fatores de risco para níveis elevados de PCR no pós Tx. Outro fator relacionado à elevação da PCR na população transplantada é desenvolvimento de diabetes mellitus pós-Tx; que também determina, em conjunto com esta elevação, maior risco de doenças cardiovasculares neste grupo de pacientes<sup>91</sup>.

Existem poucos estudos avaliando a evolução dos níveis de PCR após o transplante renal e os existentes têm casuísticas e períodos de avaliação pequenos<sup>92, 93, 94</sup>. Além disso, até o presente momento não conhecemos nenhum estudo que tenha avaliado a influência de determinantes genéticos na variação dos níveis da proteína C reativa antes e após a realização de um transplante renal bem sucedido.

Teoricamente, o transplante renal, por corrigir a uremia e afastar o paciente da terapia dialítica bem como pelo efeito antiinflamatório dos imunossuppressores, deveria levar à redução dos níveis plasmáticos de PCR. Porém, pode haver grupos de pacientes com maior predisposição genética à elevação da proteína C reativa que necessitem de uma abordagem diferenciada, buscando-se a redução da morbimortalidade geral e cardiovascular decorrente do estado inflamatório cronicamente ativado.

Foi no sentido de buscar respostas para estas questões que nos propusemos a realizar o presente estudo.

---

**2. OBJETIVOS**

---

- I. Descrever a evolução dos níveis de proteína C reativa de pacientes com DRC em terapia dialítica, um e dois anos após a realização de um transplante renal bem sucedido.
  
- II. Determinar o genótipo da população estudada para dois polimorfismos de nucleotídeos isolados nas posições -409 e -390 do gen codificador da PCR.
  
- III. Avaliar a associação entre os genótipos e os níveis de proteína C reativa pré e pós-transplante renal.

---

### **3. MÉTODOS**

---

### **3.1 Protocolo de Estudo (Figura 2)**

Realizamos um estudo de corte transversal com pacientes que se encontravam entre o sexto e o décimo - quinto mês pós-transplante renal ou rim pâncreas, doador vivo ou doador falecido, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e tinham o enxerto funcionante. Todos concordaram com o estudo, fornecendo seu consentimento por escrito após leitura do termo de consentimento livre esclarecido.

Critérios de Exclusão:

- Recusa em participação no estudo;
- Rejeição celular aguda até 30 dias antes da inclusão;
- Infecção ativa no momento da entrada no estudo;
- Ausência de amostras de soro pré-transplante.

Todos os pacientes selecionados, segundo os critérios descritos, eram convocados para se submeter à coleta de sangue, em jejum, para dosagem de proteína C reativa e creatinina. O clearance de creatinina foi

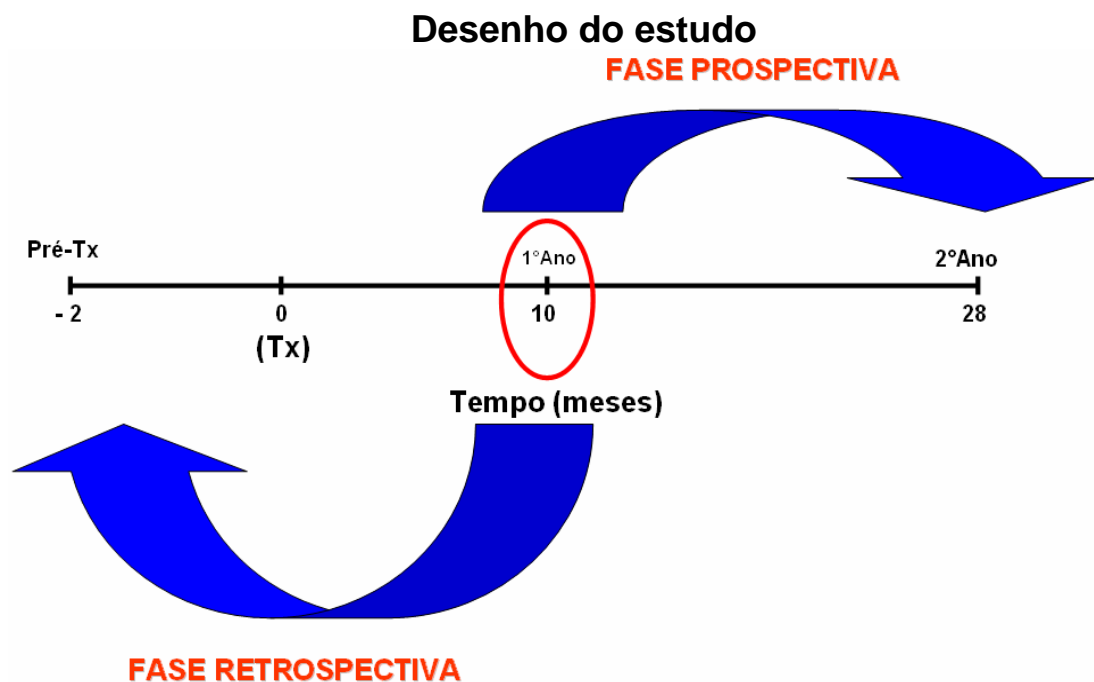
avaliado pela equação de Cockcroft-Gault. A dosagem de PCR também foi realizada nas amostras de soro pré-transplante, armazenadas na soroteca do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo. Quando existia mais de uma amostra colhida no pré-transplante, utilizávamos a mais recente. Amostras de DNA armazenadas naquele laboratório eram utilizadas para pesquisa dos polimorfismos genéticos, conforme descrito adiante.

Os dados clínicos da fase pré-transplante até a entrada no estudo foram obtidos por revisão de prontuário e entrevistas pessoais ou por telefone (fase retrospectiva). Casos de rejeição celular aguda (RCA) e nefropatia crônica do enxerto (NCE) só eram registrados quando documentados por biópsia renal. Registrávamos como “infecções” aquelas provenientes de agentes bacterianos, virais ou fúngicos, quando os pacientes necessitavam de internação. Os eventos cardiovasculares eram registrados de acordo com o diagnóstico clínico e/ou a partir de exames complementares realizados pela equipe médica acompanhante.

A partir da primeira convocação, os pacientes foram seguidos até o final do segundo ano de transplante, quando eram novamente convocados para nova coleta sanguínea, repetindo-se os exames previamente descritos (fase prospectiva do estudo).



Para fins de análise, vamos chamar as amostras pré-transplante de: Pré-Tx (àquelas obtidas em média 2 meses antes do transplante). As amostras obtidas no pós-transplante serão denominadas 1° ano (àquelas obtidas no primeiro ano pós-transplante, em média 10 meses) e 2° ano (àquelas realizadas após o segundo ano após o procedimento, em média 28 meses).



**Figura 2.** Os exames iniciais foram colhidos em média aos 10 meses pós-Tx. Retrospectivamente, obtivemos amostras de sangue pré-Tx (-2 meses, em média) bem como os dados clínicos do período pré-transplante até o início do estudo. A partir do início da primeira coleta, acompanhamos prospectivamente os pacientes até o término do segundo ano pós-Tx (em média 28 meses), quando repetimos a coleta de sangue.

### 3.2 Exames Laboratoriais

Todos os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas. A dosagem de PCR de alta sensibilidade (hs-PCR) foi realizada por método imunonefelométrico (Dade Behring, limite inferior de detecção 0,175 mg/l, valor de referência < 3,0 mg/l); e creatinina, método cinético automatizado valor de referência 0,70-1,20 mg/dl).

### 3.3 Polimorfismos Genéticos

A análise genética de nossa população foi realizada no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração da FMUSP. Foram pesquisados dois SNPs, um bi-alélico no nucleotídeo -409 (Guanina→Adenina) e outro tri-alélico (Citosina→Timina→Adenina) no nucleotídeo -390, ambos na região promotora do gen codificador da proteína C reativa.

A detecção dos alelos na posição -409G→A e -390C→T→A foi realizada pela técnica de PCR-RFLP (do inglês, “Polymerase Chain Reaction” e “Restriction Fragment Length Polymorphism”).

Realizamos, inicialmente, a amplificação da seqüência genômica que incorpora a região do polimorfismo, utilizando o método de reação de polimerização em cadeia (RPC). Para tanto, a região reguladora do gene da PCR (-390C→T→A e -409G→A) foi amplificada utilizando os seguintes “primers”, perfazendo-se um fragmento com 141 pares de base (141bp):

“Primer Forward”      5’ AAGGGGTTAGTGATAATGTCC 3’

“Primer Reverse”      5’ GGGAAATGGTAACATATTAATC 3’

O nucleotídeo sublinhado no “Primer Reverse” do alelo -390 denota a localização de Mismatch (T→A) o qual introduz um sitio de restrição para enzima *Taq I* na presença do alelo -390C. Na realização da RPC, foram utilizados 50ng de DNA genômico, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25pM de cada primer, 40μM de dNTP e 2U da enzima *Taq polymerase*, resultando em uma solução com volume total de 50μl. A solução foi, então, submetida a uma temperatura de 95°C por 5 minutos para desnaturação prévia, seguida de 35 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e por fim, 72°C por 7 minutos. Após esta fase, 5μl do produto obtido foram submetidos

à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, em tampão TEA 1X, para confirmação da amplificação (banda de 141bp).

Confirmada a polimerização, foram utilizadas três enzimas de restrição capazes de reconhecer e clivar sítios polimórficos específicos. Para discriminação do alelo -409A/G utilizamos a enzima *Nla III* (New England Biolabs), submetendo 10µl do produto amplificado à digestão com 5U desta enzima X 3ul de tampão 10X , obtendo um volume final de 30µl, que foi incubado a 37°C por 3h. Similarmente, para discriminação do alelo -309A, o mesmo volume do produto amplificado foi submetido à digestão com 2U da enzima *Bfa I* e também incubados a 37°C por 3h. Por fim, para discriminação do alelo -309C, submetemos 10µl do produto amplificado à digestão com 12U da enzima *Taq I* e incubamos a 65°C por 3h.

Após a digestão enzimática, os fragmentos resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio. O gel contendo as amostras foi, então, exposto à luz UV e depois fotografado para identificação dos alelos.

A detecção da variante alélica foi realizada comparando-se a banda específica a um padrão de peso molecular de 100pb. Na presença do alelo -409A, dois fragmentos de 100bp e 41bp foram gerados, enquanto na presença do alelo -409G o produto não foi clivado. Na

presença do alelo -390 A, o fragmento de 141pb foi clivado em 119bp pela enzima *Bfa I*, e na presença do -390C em 22bp pela enzima *Taq I*. Entretanto, na presença do alelo -390T, o fragmento não foi clivado por essas enzimas.

### **3.4 Análise Estatística**

A análise Receiver-Operating Characteristic (ROC) foi utilizada para determinar os pontos de corte dos níveis de PCR nos diferentes períodos do estudo entre pacientes com características genéticas distintas.

Nas comparações de proporções entre dois grupos independentes utilizou-se o teste Qui-quadrado de Pearson para dados categóricos.

Utilizamos o Teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar as variáveis contínuas, quanto à normalidade da distribuição.

As variáveis com distribuição normal foram representadas por média e desvio padrão e, quando comparadas entre dois grupos independentes, utilizou-se o Teste t de Student. As variáveis não paramétricas foram representadas por mediana e percentis e, para compará-las entre dois grupos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

Para as variáveis de distribuição normal, ao se comparar mais de dois tempos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, com pós-teste de Student-Newman e Keuls. Na comparação entre mais dois grupos utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para medidas não repetidas, com pós-teste de Student-Newman e Keuls.

Quando das variáveis de distribuição não paramétrica, na comparação de mais de dois grupos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn e, na comparação de mais de dois tempos utilizou-se o teste de Friedman com pós-teste de Müller-Dunn.

Nas análises de correlação linear, utilizamos o coeficiente de correlação de Pearson para as variáveis paramétricas e de Spearman para as não paramétricas.

Todas as probabilidades de significância (valores de  $p$ ) apresentadas são do tipo bi-caudal e valores menores ou iguais a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Para a análise estatística, foram utilizados os softwares *SPSS 13.0* (SPSS Inc., Chicago IL, 2004) e *Prism 4* (GraphPad Software Inc., San Diego CA, 2003).

---

**4. RESULTADOS**

---

## 4.1 Dados Clínicos

Foram estudados 50 pacientes, 24 do sexo masculino e 26 do sexo feminino, com idade média de 41,4 anos ( $\pm 12,4$  anos), transplantados entre setembro de 2002 e março de 2004. Destes, 47 foram submetidos ao transplante renal isolado e 3 ao transplante pâncreas-rim. Quarenta e um pacientes estavam no primeiro transplante e 34 tiveram um doador falecido.

As principais causas de DRC em nossa população foram HAS (n=10; 20%), glomerulonefrite crônica (n=9; 18%) e DM (n=8; 16%). Completando a lista das doenças de base tivemos: lúpus eritematoso sistêmico (n=4; 8%), glomeruloesclerose segmentar e focal (n=3; 6%), pielonefrite crônica (n=3; 6%), doença renal policística (n=2; 4%), síndrome de Alport (n=2; 4%), glomerulonefrite membranosa (n=1; 2%), nefropatia da IgA (n=1; 2%), litíase renal (n=1; 2%). Seis pacientes (12%) tinham DRC de causa indeterminada. Para efeito de análise, dividimos os pacientes em portadores de DM/HAS e outras patologias. Antes da realização do transplante, os pacientes estavam há 42,3 ( $\pm 27,7$ ) meses, em média, sob terapia dialítica.



Todos os pacientes utilizaram prednisona (PRED) no esquema imunossupressor, 47 fizeram uso de micofenolato mofetil (MMF), 34 de tacrolimus (TAC), 16 de ciclosporina microemulsão (CsA) e 3 de azatioprina (AZA). Houve 12 episódios de RCA em 10 transplantados. Doze pacientes desenvolveram nefropatia crônica do enxerto (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características do Transplante Renal

<i>Variável</i>	<i>n (%)</i>
<b>Tipo de Doador</b>	
Vivo / Falecido	16 (32%) / 34 (68%)
<b>Compatibilidades HLA (Matches)</b>	
0-2	23 (46%)
3-6	27 (54%)
<b>Imunossupressão Inicial</b>	
CsA + MMF + PRED	14 (28%)
TAC + MMF + PRED	33 (66%)
CsA + AZA + PRED	02 (4%)
TAC + AZA + PRED	01(2%)
<b>Indução</b>	46 (92%)
<b>Rejeição Celular Aguda</b>	12 (24%)
<b>Nefropatia Crônica do Enxerto</b>	12 (24%)

Ao término do segundo ano, permaneciam em seguimento 49 dos 50 pacientes inicialmente incluídos. Houve um óbito causado por septicemia no pós-operatório de um tumor pancreático, encontrando-se o

paciente no segundo ano de transplante. Obtivemos amostras dos 50 pacientes no pré-Tx e no primeiro ano após o transplante. Em consequência do óbito supracitado, no segundo ano pós-Tx obtivemos amostras sanguíneas de 49 pacientes.

Foram registradas 54 ocorrências infecciosas em 30 pacientes. Como eventos cardiovasculares, registramos três episódios classificados como *angina pectoris* em três diferentes pacientes. Vinte pacientes tinham antecedentes de tabagismo, documentamos o uso de estatinas em 24 transplantados.

O índice de massa corporal e os níveis de hemoglobina tiveram um significativo aumento após o transplante renal. No final do estudo, todos os pacientes se encontravam fora de terapia dialítica (Tabela 2).

**Tabela 2.** Dados Clínicos e bioquímicos antes e após o Transplante Renal

<i>Variável</i>	<i>Pré-Tx</i>	<i>1º Ano</i>	<i>2º Ano</i>	<i>P</i>
<b>Índice de Massa Corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	23,1 (±4,2)	24,4 (±4,7)*	25,1 (±4,9)*	<b>&lt;0,001</b>
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	11,1 (±2,3)	13,6 (±1,9)*	13,3 (±2,2)*	<b>&lt;0,001</b>
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	--	1,3 (1,1; 1,5)	1,3 (1,0; 1,6)	0,623
<b>Clearance de creatinina (ml/min)</b>	--	63,1 (±23,0)	64,9 (±25,4)	0,618

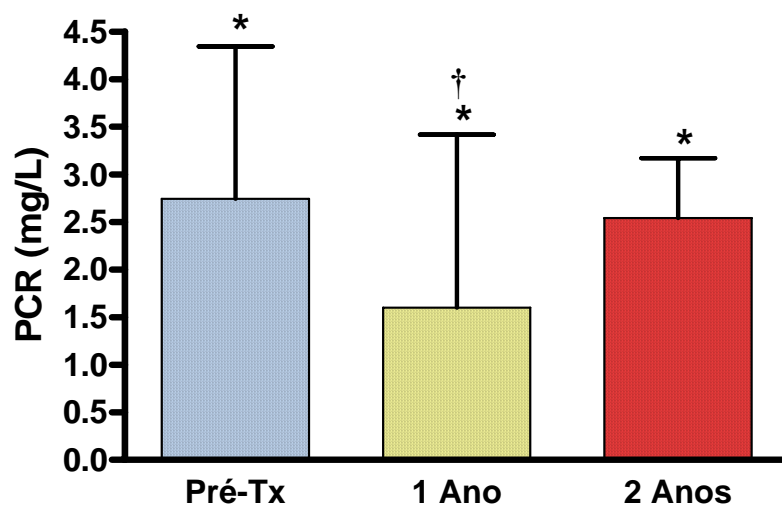
Dados expressos em Média (± Desvio Padrão) / Mediana (P25; P75).

\* P < 0,05 vs Pré-Tx.

## 4.2 Evolução da Proteína “C” Reativa

Quando analisados os 50 pacientes, em conjunto, observamos que os níveis de PCR decresceram significativamente no primeiro ano pós-transplante renal, apresentando um novo incremento no segundo ano; que não foi significativo, porém suficiente para eliminar a diferença com relação à PCR pré-Tx (Gráfico 1; Tabela 3).

Gráfico 1. Níveis de PCR antes e após o transplante renal

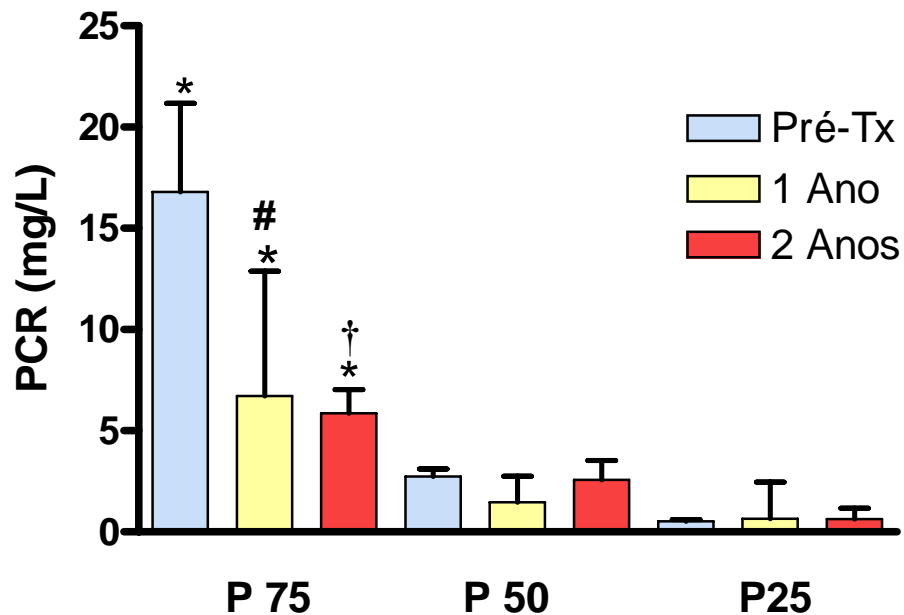


\*  $P=0,033$  ; †  $P < 0,05$  vs Pré-Tx.

No período pré-Tx, havia 23 indivíduos (46%) com níveis de PCR iguais ou superiores a 3,0mg/L. Após a divisão dos pacientes de acordo com os percentis 25 (P25), 50 (P50) e 75 (P75) dos níveis de proteína C

reativa, observamos que naqueles cuja PCR se situava no maior percentil, houve uma significativa redução deste marcador no primeiro ano pós-transplante, que se intensificou ainda mais após o segundo ano. Por outro lado, nos demais pacientes, os níveis de PCR se mantiveram estáveis. Apesar da evidente redução, os pacientes do Percentil 75 permaneceram com a PCR ainda acima dos limites de normalidade do teste (Gráfico 2; Tabela 3).

**Gráfico 2.** Evolução dos níveis de PCR entre os diferentes percentis, antes e após o transplante renal



\* P=0,002; # P<0,05 vs Pré-Tx; † P<0,01 vs Pré-Tx.

**Tabela 3.** Níveis de Proteína C Reativa, geral e entre os diferentes percentis, antes e após o Transplante Renal.

	<i>PCR Pré-Tx</i> (mg/L)	<i>PCR 1º Ano</i> (mg/L)	<i>PCR 2º Ano</i> (mg/L)	<i>P</i>
<b>Geral</b> (n=50)	2,8 (1,2 ; 7,4)	1,6 (0,8 ; 6,4)*	2,5 (0,8 ; 6,7)	<b>0,033</b>
<b>Percentil 25</b> (n=12)	0,5 (0,4 ; 0,7)	0,7 (0,3 ; 1,2)	0,7 (0,3 ; 1,0)	0,920
<b>Percentil 50</b> (n=26)	2,8 (2,1 ; 5,1)	1,5 (0,8 ; 4,9)	2,6 (0,9 ; 6,4)	0,304
<b>Percentil 75</b> (n=12)	16,8 (8,8 ; 36,4)	6,7 (4,5 ; 17,0) *	5,9 (4,4 ; 8,8)†	<b>0,002</b>

Dados expressos em mediana (P25; P75)

\* P < 0,05 vs Pré-Tx; † P < 0,01 vs Pré-Tx.

Não houve correlação entre os níveis de PCR e o índice de massa corporal no pré-transplante e no primeiro ano após o mesmo ( $r=0,069$ ,  $p=0,636$ ;  $r=0,123$ ,  $p=0,397$ ; respectivamente), observando-se uma correlação positiva no segundo ano ( $r=0,298$ ,  $p=0,038$ ). No primeiro ano pós-transplante renal, os níveis de PCR correlacionaram-se negativamente com a creatinina plasmática ( $r=-0,422$ ,  $p=0,002$ ) e positivamente com o clearance de creatinina ( $r=0,283$ ,  $p=0,047$ ). Esta correlação não foi observada, contudo, no segundo ano pós Tx ( $r=-0,179$   $p=0,217$  e  $r=0,100$ ,  $p=0,496$ ; respectivamente creatinina e clearance de creatinina).

### **4.3 Análise Genética**

A determinação dos SNPs foi realizada segundo os procedimentos descritos. Quando avaliados os genótipos para a posição -490 do gen codificador da PCR, todos os pacientes foram homozigotos para o alelo “G”, ou seja, 50 pacientes com genótipo -490GG.

Na posição -390 não foram encontrados pacientes que possuíssem o alelo “A”. Encontramos 11 homozigotos para o alelo “T”(-390TT), 15 homozigotos para o alelo “C” (-390CC) e 24 heterozigotos (-390CT).

#### **4.3.1 Divisão dos Grupos**

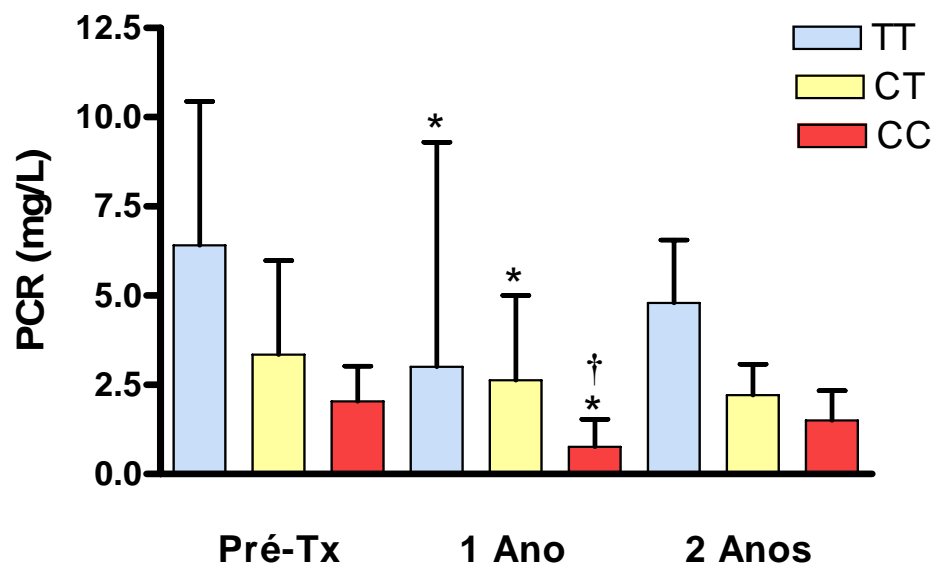
##### **4.3.1.1 Divisão Pelo Genótipo**

Inicialmente, dividimos os pacientes de acordo com o genótipo para a posição -390 do gen codificador da PCR.

Observamos que os pacientes homozigotos para o alelo “T” apresentaram níveis de PCR mais elevados que os demais em todos os momentos do estudo, ao passo que os heterozigotos se mantiveram com níveis intermediários e os homozigotos, para o alelo “C”, os menores

níveis. A diferença entre os grupos, no entanto, só foi estatisticamente significativa no primeiro ano pós-transplante (Gráfico 3; Tabela 4).

**Gráfico 3.** Níveis de PCR entre os diferentes genótipos em cada momento do estudo.\* P=0,032; † P<0,05 vs TT no 1º ano



**Tabela 4.** Níveis de Proteína C Reativa, entre os diferentes genótipos, antes e após o Transplante Renal

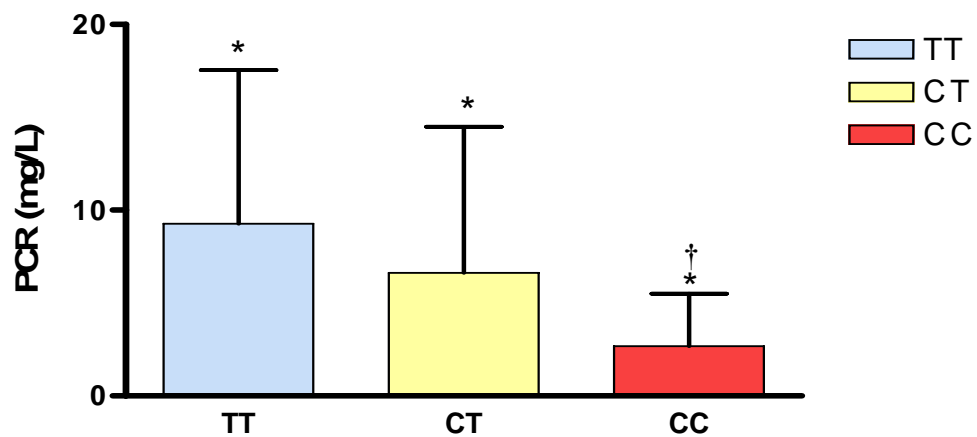
	<i>Pré-Tx</i> <i>PCR (mg/L)</i>	<i>1º Ano</i> <i>PCR (mg/L)</i>	<i>2º Ano</i> <i>PCR (mg/L)</i>	<i>P</i> <i>(pré x pós Tx)</i>
TT (n= 11)	6,4 (1,8 ; 15,5)	3,0 (1,5 ; 6,4)	4,8 (1,4 ; 11,6)	0,512
CT (n=24)	3,4 (1,3 ; 7,4)	2,6 (1,1 ; 7,1)	2,2 (0,6 ; 6,0)	0,538
CC (n=15)	2,0 (0,7 ; 3,1)	0,8 (0,5 ; 1,7)*	1,5 (0,9 ; 4,6)	0,217
<i>P</i> <i>(inter-grupos)</i>	0,087	<b>0,032</b>	0,349	

Dados expressos em mediana (P25; P75).

\* P < 0,05 vs TT.

A média geral da PCR (média das médias da PCR de cada paciente), entretanto, foi significativamente diferente entre os pacientes homocigotos para os alelos “T” e “C” (Gráfico 4; Tabela 5).

**Gráfico 4.** Médias gerais da PCR entre os diferentes genótipos



**Gráfico – 4: Médias gerais da PCR entre os diferentes alelos.**  
\* P= 0,019; † P <0,05 vs TT.

**Tabela 5.** Médias gerais da PCR entre os diferentes genótipos

	<i>TT</i>	<i>CT</i>	<i>CC</i>	<i>P</i>
PCR (mg/L)	9,3 (± 8,3)	6,6 (±7,9)	2,7 (±2,8)*	<b>0,019</b>

Dados expressos em média (± desvio padrão)

\* P <0,05 vs TT.



Houve diferença na prevalência de indivíduos com antecedentes de tabagismo, que foi significativamente maior naqueles do genótipo - 390TT. Os três grupos não diferiam quanto à idade, sexo, doença de base e IMC. Também não houve diferença entre os grupos no que tange à incidência de RCA e infecções bem como ao desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto. Por fim os níveis de creatinina e o clearance de creatinina também não diferiram significativamente entre os grupos tanto no primeiro quanto no segundo ano após o transplante renal (Tabela – 6).

**Tabela 6.** Comparação dos dados clínicos e bioquímicos entre os diferentes genótipos

	<i>TT</i> ( <i>n</i> =11)	<i>CT</i> ( <i>n</i> =24)	<i>CC</i> ( <i>n</i> =15)	<b>P</b>
Sexo:				
1. Masc	3 (27,3%)	13 (54,2%)	8 (53,3%)	0,297
2. Fem	8 (72,7%)	11 (45,8%)	7 (46,7%)	
Idade (anos)	45,4 (±10,2)	39,6 (±14,8)	41,5 (±9,3)	0,451
Dça de Base (n° pctes):				
1. HAS/DM	7 (63,6%)	7 (29,2%)	4 (26,7%)	0,095
2. Outras	4 (36,4%)	17 (70,8%)	11 (73,3%)	
Tempo em Diálise (meses):	48,6 (±33,3)	45,0 (±27,1)	33,4 (±23,4)	0,314
Tabagismo:				
1. Sim	8 (72,7%)	7 (29,2%)	5 (33,3%)	<b>0,042</b>
2. Não	3 (27,3%)	17 (70,8%)	10 (66,7%)	
Tipo de Doador (n° pctes):				
1. Vivo	3 (27,3%)	9 (37,5%)	4 (26,7%)	0,725
2. Falecido	8 (72,7%)	15 (62,5%)	11 (73,3%)	
Segundo Transplante:				
1. Sim	2 (18,2%)	4 (16,7%)	3 (20%)	0,966
2. Não	9 (81,8%)	20 (83,3%)	12 (80%)	
Rejeição Celular Aguda (n° eventos/pcte):				
1. 0	8 (72,7%)	21 (87,5%)	11 (73,3%)	0,621
2. 1	2 (18,2%)	3 (12,5%)	3 (20%)	
3. 2	1 (9,1%)	0 (0)	1 (6,7%)	
Nefropatia Crônica do Enxerto				
1. Sim	1 (9,1%)	5 (20,8%)	6 (40%)	0,167
2. Não	10 (90,9%)	19 (79,2%)	9 (60%)	
Infecções (n° eventos/pcte):				
1. 0	6 (54,5%)	9 (37,5%)	5 (33,3%)	0,118
2. 1	1 (9,1%)	8 (33,3%)	6 (40%)	
3. ≥ 2	4 (36,4%)	7 (29,2%)	4 (26,7%)	
Uso de Estatinas:				
1. Sim	5 (45,5%)	13 (54,2%)	6 (40%)	0,677
2. Não	6 (54,5%)	11 (45,8%)	9 (60%)	
Índice de Massa Corporal <i>Pré-TX</i> (Kg/m <sup>2</sup> )	24,8 (± 4,8)	22,8 (± 4,0)	22,3 (± 4,1)	0,312
Índice de Massa Corporal <i>1º Ano</i> (Kg/m <sup>2</sup> )	25,9 (± 4,7)	24,2 (± 4,6)	23,6 (± 4,8)	0,465
Índice de Massa Corporal <i>2º Ano</i> (Kg/m <sup>2</sup> )	26,7 (± 5,6)	25,1 (± 4,4)	23,8 (± 5,1)	0,341
Creatinina <i>1º Ano</i> (mg/dl)	1,2 (0,9; 1,6)	1,3 (1,1; 1,4)	1,3 (1,1; 1,6)	0,591
Clearance de Creatinina <i>1º Ano</i> (ml/min)	64,2 (±29,4)	64,9 (±21,0)	59,4 (±18,2)	0,760
Creatinina <i>2º Ano</i> (mg/dl)	1,3 (1,0; 1,4)	1,3 (1,2; 1,5)	1,2 (1,1; 1,7)	0,541
Clearance de Creatinina <i>2º Ano</i> (ml/min)	70,3 (±25,2)	63,9 (±19,7)	62,5 (±33,5)	0,724

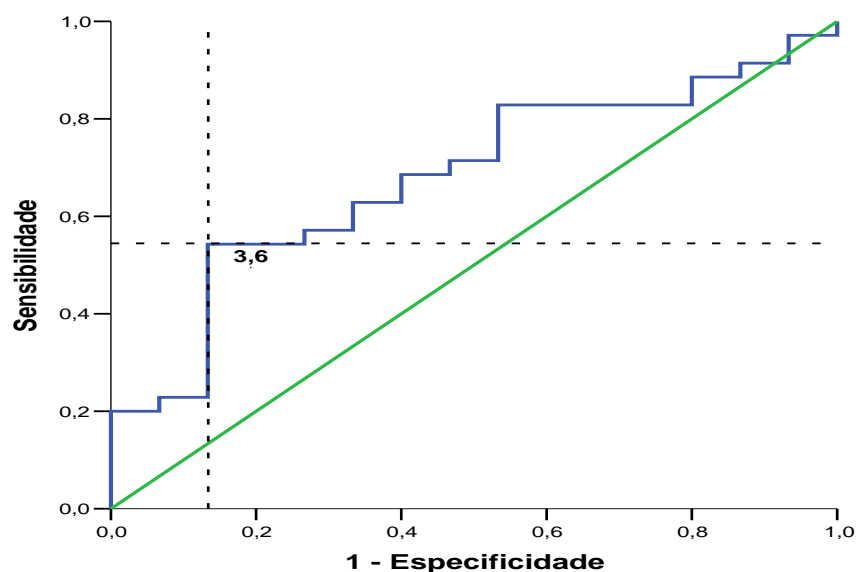
### 4.3.1.2 Divisão Pela Presença ou Ausência do Alelo “T”

Buscando avaliar a influência do alelo “T” na posição -390 do gen codificador da PCR sob os níveis desta proteína, categorizamos os pacientes quanto à sua presença ou ausência. Em seguida, desenvolvemos curvas ROC para estabelecer os “pontos de corte” para os níveis de PCR, em cada momento do estudo, nos pacientes com e sem este nucleotídeo (Gráficos 5 – 7; Tabelas 7 – 15).

#### 4.3.1.2.1 Pré-Transplante

No período pré-Tx, o nível de PCR estabelecido após o cálculo da curva ROC foi 3,6 mg/L (Gráfico 5; Tabela 7).

**Gráfico 5.** Curva ROC para Proteína C Reativa Pré-Transplante



**Tabela 7.** Análise ROC para a Proteína C Reativa Pré-Transplante

<i>Estatística</i>	<i>Valor</i>
Área sob a Curva	0,68
Significância (P)	<b>0,045</b>
Sensibilidade	0,54
Especificidade	0,87

Dos cinquenta pacientes, vinte e nove tinham PCR pré-Tx <3,6 mg/l. A prevalência de portadores do alelo “T” foi significativamente maior (p=0,007) entre aqueles com níveis de PCR iguais ou superiores ao estabelecido (Tabela 8).

**Tabela 8.** Níveis estabelecidos de Proteína C Reativa no Pré-Transplante e presença / ausência do alelo “T”

	<i>Ausência de “T”</i>	<i>Presença de “T”</i>	<i>OR</i>	<i>IC</i>	<i>P</i>
<b>PCR &lt; 3,6 mg/L (n=29)</b>	13 (45%)	16 (55%)	7,7	1,5 – 39,4	<b>0,007</b>
<b>PCR ≥ 3,6 mg/L (n=21)</b>	2 (10%)	19 (90%)			

Houve maior prevalência de pacientes com HAS/DM dentre aqueles com nível de PCR igual ou superior a 3,6mg/L. Não houve diferença quanto ao sexo, idade, tempo de diálise, tabagismo e índice de massa corporal entre os grupos (Tabela 9).

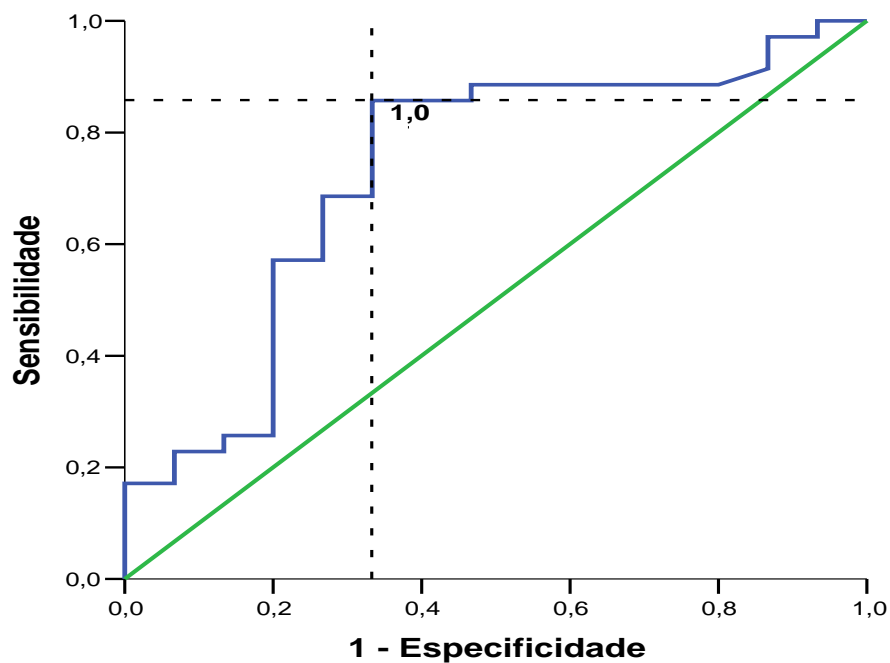
**Tabela 9.** Comparação dos dados clínicos entre pacientes com diferentes níveis de Proteína C reativa Pré-Transplante

	<i>PCR &lt; 3,6</i> (n=29)	<i>PCR ≥ 3,6</i> (n=21)	<i>P</i>
Sexo:			
1. Masc	17 (58,6%)	7 (33,3%)	0,077
2. Fem	12 (41,4%)	14 (66,7%)	
Idade (anos)	39,7 (± 11,1)	43,9 (±14,0)	0,242
Dça de Base (n° pctes):			
1. HAS/DM	5 (17,2%)	8 (38,1%)	<b>0,001</b>
2. Outras	24 (82,8%)	13 (61,9%)	
Tempo em Diálise (meses)	42,5 (±31,6)	42,1 (± 21,8)	0,962
Tabagismo			0,349
1. Sim	10 (34,5%)	10 (47,6%)	
2. Não	19 (65,5%)	11 (52,4%)	
Índice de Massa Corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	22,6 (± 3,4)	23,8 (± 5,1)	0,327

#### 4.3.1.2.2 Primeiro Ano Pós-Transplante

No período primeiro ano pós-Tx, estabelecemos o nível de 1,0 mg/L para a proteína C reativa (Gráfico 6; Tabela 10).

**Gráfico 6.** Curva ROC para Proteína C Reativa 1 ano Pós-Transplante



**Tabela 10.** Análise ROC para a Proteína C Reativa no 1º ano Pós-Transplante

<i>Estatística</i>	<i>Valor</i>
Área sob a Curva	0,73
Significância (P)	<b>0,011</b>
Sensibilidade	0,86
Especificidade	0,67

Do total de pacientes, dezesseis tinham a PCR inferior a 1 mg/L no primeiro ano após o transplante. A prevalência de portadores do alelo “T” foi significativamente maior ( $p=0,001$ ) entre aqueles com níveis de PCR iguais ou superiores a 1mg/L (Tabela 11).

**Tabela 11.** Níveis estabelecidos de Proteína C Reativa no 1º ano Pós-Transplante e presença / ausência do alelo “T”

	<i>Ausência de “T”</i>	<i>Presença de “T”</i>	<i>OR</i>	<i>IC</i>	<i>P</i>
<b>PCR &lt; 1,0 mg/L (n=16)</b>	10 (63%)	6 (37%)	9,7	2,4 – 38,7	<b>0,001</b>
<b>PCR ≥ 1,0 mg/L (n=34)</b>	5 (15%)	29 (85%)			

Havia mais mulheres entre os indivíduos com PCR maior ou igual ao limite estabelecido ( $p=0,009$ ). Os níveis de creatinina foram significativamente maiores nos pacientes com Proteína C Reativa menor que 1mg/L ( $p=0,013$ ). Não havia diferença quanto ao sexo, idade, doença de base, tempo em diálise, índice de massa corporal, tipo de doador, presença de transplante prévio ou uso de estatinas. Os pacientes não apresentaram diferenças no que tange à incidência de RCA e infecções, como também ao desenvolvimento de NCE (Tabela 12).

**Tabela 12.** Comparação dos dados clínicos e bioquímicos entre pacientes com diferentes níveis de Proteína C reativa no 1º ano Pós-Transplante

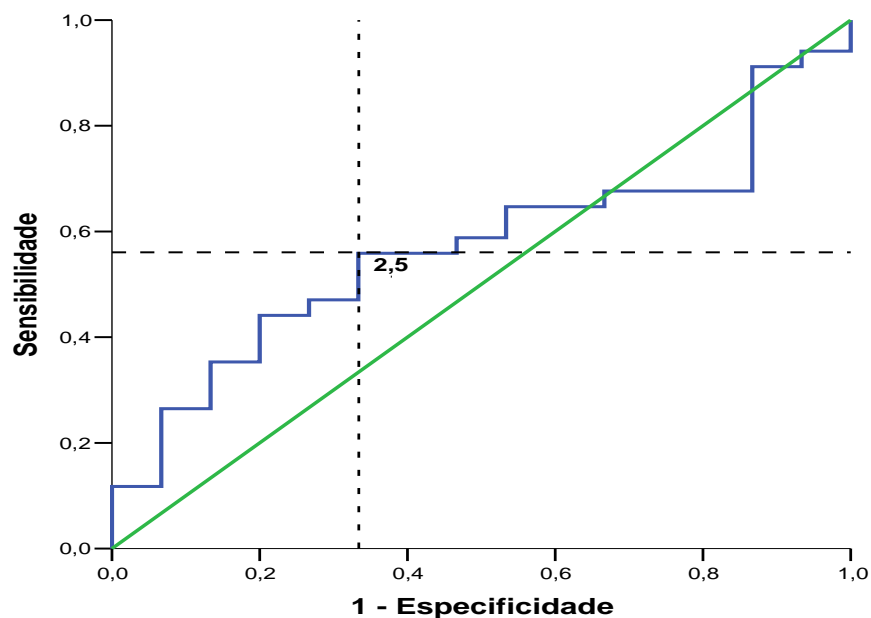
	<i>PCR &lt; 1,0</i> (n=16)	<i>PCR ≥ 1,0</i> (n=34)	<b>P</b>
Sexo:			
1. Masc	12 (75%)	12 (35,3%)	<b>0,009</b>
2. Fem	4 (25%)	22 (64,7%)	
Idade (anos)	42,7 (± 7,9)	40,8 (± 14,1)	0,626
Dça de Base (nº pctes):			
1. HAS/DM	3 (16,7%)	15 (83,3%)	0,081
2. Outras	13 (40,6 %)	19 (59,4%)	
Tempo em Diálise (meses):	42,4 (± 30,2)	42,3 (±26,9)	0,992
Tabagismo:			
1. Sim	6 (37,5%)	14 (41,2%)	0,804
2. Não	10 (62,5%)	20 (58,8%)	
Tipo de Doador (nº pctes):			
1. Vivo	4 (25%)	12 (35,3%)	0,467
2. Falecido	12 (75%)	22 (64,7%)	
Segundo Transplante:			
1. Sim	3 (18,8%)	6 (17,6%)	0,925
2. Não	13 (81,2%)	28 (82,4%)	
Rejeição Celular Aguda (nº eventos/pcte):			
1. 0	15 (93,4%)	25 (73,6%)	0,099
2. 1	0 (0)	8 (23,5%)	
3. 2	1 (6,6%)	1 (2,9%)	
Nefropatia Crônica do Enxerto			
1. Sim	4 (25%)	8 (23,5%)	0,910
2. Não	12 (75%)	26 (76,5%)	
Infecções (nº eventos/pcte):			
1. 0	8 (50%)	12 (35,3%)	0,537
2. 1	5 (31,3%)	10 (29,4%)	
3. ≥ 2	3 (18,7%)	12 (35,3%)	
Uso de Estatinas:			
1. Sim	6 (37,5%)	18 (52,9%)	0,308
2. Não	10 (62,5%)	16 (47,1%)	
Índice de Massa Corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	23,0 (± 3,5)	25,0 (± 5,0)	0,147
Creatinina (mg/dl)	1,5 (1,2; 1,9)	1,2 (1,1; 1,4)	<b>0,013</b>
Clearance de Creatinina (ml/min)	57,3 (± 27,0)	65,8 (± 20,7)	0,222



### 4.3.1.2.3 Segundo Ano Pós-Transplante

Por fim, realizamos nova análise ROC; desta vez para estabelecer o nível de PCR que utilizaríamos como “ponto de corte” para o segundo ano após o transplante renal. Desta vez, o nível obtido foi de 2,5mg/L (Gráfico – 7; Tabela – 13).

**Gráfico 7.** Curva ROC para Proteína C Reativa 2 anos Pós-Transplante



**Tabela 13.** Análise ROC para a Proteína C Reativa no 2º ano Pós-Transplante

<i>Estatística</i>	<i>Valor</i>
Área sob a Curva	0,57
Significância (P)	0,448
Sensibilidade	0,56
Especificidade	0,67

No segundo ano pós-Tx, a presença do alelo “T” não foi capaz de determinar diferenças nos níveis de PCR (Tabela 14).

**Tabela 14.** Níveis estabelecidos de Proteína C Reativa no 2º ano Pós-Transplante e presença / ausência do alelo “T”

	<i>Ausência de “T”</i>	<i>Presença de “T”</i>	<i>OR</i>	<i>IC</i>	<i>P</i>
<b>PCR &lt; 2,5mg/L (n=25)</b>	10 (40%)	15 (60%)	2,5	0,7 – 9,0	0,146
<b>PCR ≥ 2,5 mg/L (n=24)</b>	5 (21%)	19 (79%)			

Houve maior prevalência do sexo feminino ( $p=0,005$ ), assim como maior índice de massa corporal ( $p=0,039$ ) nos pacientes com níveis de PCR iguais ou superiores ao limite estabelecido para este período. Não havia diferença entre os dois grupos em quaisquer dos outros parâmetros analisados (Tabela 15).

**Tabela 15.** Comparação dos dados clínicos e bioquímicos entre pacientes com diferentes níveis de Proteína C reativa no 2ºano Pós-Transplante.

	<i>PCR &lt; 2,5</i> (n=25)	<i>PCR ≥ 2,5</i> (n=25)	<b>P</b>
Sexo:			
1. Masc	17 (68%)	7 (28%)	<b>0,005</b>
2. Fem	8 (32%)	18 (72%)	
Idade (anos)	43,2 (±12,7)	39,6 (±12,1)	0,305
Dça de Base (nº pctes):			
1. HAS/DM	7 (28%)	11 (44%)	0,239
2. Outras	18 (72%)	14 (56%)	
Tempo em Diálise (meses):	42,7 (±25,9)	41,9 (±29,8)	0,920
Tabagismo:			
1. Sim	10 (40%)	10 (40%)	1
2. Não	15 (60%)	15 (60%)	
Tipo de Doador (nº pctes):			
1. Vivo	7 (28%)	9 (36%)	0,544
2. Falecido	18 (72%)	16 (64%)	
Segundo Transplante:			
1. Sim	4 (16%)	5 (20%)	0,713
2. Não	21 (84%)	20 (80%)	
Rejeição Celular Aguda (nº eventos/pcte):	21 (84%)	19 (76%)	
1. 0	3 (12%)	5 (20%)	0,741
2. 1	1 (4%)	1 (4%)	
3. 2			
Nefropatia Crônica do Enxerto			
1. Sim	6 (24%)	6 (24%)	1
2. Não	19 (76%)	19 (76%)	
Infecções (nº eventos/pcte):			
1. 0	13 (52%)	7 (28%)	0,072
2. 1	8 (32%)	7 (28%)	
3. ≥ 2	4 (16%)	11 (44%)	
Uso de Estatinas:			
1. Sim	14 (56%)	12 (48%)	0,571
2. Não	11 (44%)	13 (52%)	
Índice de Massa Corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	23,6 (±3,5)	26,6 (±5,8)	<b>0,039</b>
Creatinina (mg/dl)	1,3 (1,2; 1,7)	1,2 (1,0; 1,4)	0,183
Clearance de Creatinina (ml/min)	62,5 (±24,6)	67,3 (26,6)	0,510

---

## **5. DISCUSSÃO**

---

Nosso estudo teve por objetivo avaliar se a restauração da função renal a longo prazo, através de um transplante renal bem sucedido, e a predisposição genética (avaliada pelo genótipo para 2 SNPs na região promotora do gen codificador da PCR) teriam influência sobre os níveis séricos de PCR nos pacientes com DRC em terapia dialítica. Dois estudos anteriores haviam demonstrado o efeito benéfico deste procedimento sobre os níveis desta proteína <sup>92,93</sup>, no entanto, a nosso ver, este foi o primeiro estudo a estender a análise por período mais longo de tempo, de forma prospectiva, correlacionando os achados a um background genético.

Na análise geral, observamos que, no período pré-Tx, 46% dos pacientes exibiam níveis de PCR acima do limite normal, denotando a ativação do estado microinflamatório sistêmico; prevalência semelhante à descrita em outros estudos <sup>23</sup>. Quando da análise geral, observamos significativo decréscimo nos níveis de PCR no primeiro ano pós-transplante renal com posterior incremento, fazendo com que a PCR, no segundo ano, não diferisse significativamente daquela pré-Tx. Atribuímos este achado à superposição de pacientes com perfis inflamatórios distintos, de tal forma

que, após a divisão dos pacientes de acordo com os percentis dos níveis de PCR, pudemos observar que o transplante renal teve efeito benéfico sobre o grupo de pacientes com os níveis mais elevados deste marcador. Nossos resultados estão de acordo com os descritos anteriormente por Simmons e cols.<sup>92</sup> e Cueto-Manzano e cols.<sup>93</sup>.

O impacto positivo do Tx renal sob o estado microinflamatório de pacientes com DRC pode ser atribuído a diversos fatores, dentre os quais: a cessação da terapia dialítica, que leva à estimulação imunológica por fatores inerentes a cada método (HD e DP), com conseqüente ativação da resposta imunológica de fase aguda<sup>13</sup>; o restabelecimento do importante papel do rim no metabolismo dos produtos avançados da glicosilação (AGE's), sob os quais a terapia dialítica tem pouco efeito e cujo acúmulo, nos pacientes em diálise, acaba por ativar a resposta inflamatória por estímulos à ativação monocitária bem como à secreção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos<sup>2, 13, 36, 95</sup>; a restauração da função renal trazendo consigo a correção, ao menos parcial, da uremia e a excreção de citocinas inflamatórias pelo rim<sup>96</sup>.

Entretanto, há de se observar que, apesar da redução, os níveis de PCR no grupo de maior percentil permaneceram ainda acima dos limites da normalidade após dois anos de transplante. De fato, mesmo nos resultados de Cueto-Manzano e cols.<sup>93</sup>, apesar da redução com relação ao

pré-Tx, os níveis PCR parecem ter se mantido acima de 3 mg/L dois anos pós-transplante, o que foi também observado por Cottone e cols.<sup>94</sup>, estudando pacientes com média de 5 anos pós-transplante. Achamos importante salientar este fato, pois níveis de proteína C reativa a partir de 3 mg/L estão relacionados à maior risco cardiovascular<sup>89,97</sup>.

Tendo em vista que, na população em geral, as variáveis clínicas respondem apenas por aproximadamente 26% da variação inter-individual da PCR<sup>60</sup>, decidimos avaliar a influência de fatores genéticos em nossa população. Até pouco tempo, não estava claro se as relações descritas entre SNPs e níveis de PCR representavam várias associações distintas e independentes ou múltiplas associações relacionadas ao “*linkage disequilibrium*”, no entanto, Carlson e cols.<sup>55</sup>, avaliando 7 SNPs situados na região de 6.8 Kb em volta do gen codificador da PCR, demonstraram que, em indivíduos com ancestralidade europeia, 2 haplótipos específicos eram responsáveis por altos níveis de PCR, dados confirmados em um estudo posterior realizado por Kathiresan e cols.<sup>60</sup>. Szalai e cols.<sup>61</sup> demonstraram a funcionalidade dos mesmos SNPs, *in vitro*, afetando a atividade transcripcional da região promotora do gen codificador da PCR e também *in vivo*, correlacionando-se com diferenças nos níveis basais de PCR em pessoas aparentemente saudáveis.

Utilizamos-nos destes SNPs para avaliar a influência genética sobre os níveis de PCR também nos indivíduos com doença renal crônica. A análise genética de nossa população foi prejudicada pelo “n” reduzido de pacientes, mas, ainda assim, conseguimos evidenciar uma significativa diferença nos níveis de PCR relacionada aos genótipos para o SNP na posição -390, de tal forma que os pacientes homocigotos para o alelo “C” tinham os menores níveis de PCR, os heterocigotos os níveis intermediários e os homocigotos, para o alelo “T”, os maiores níveis de proteína C reativa.

De fato, Szalai e cols.<sup>61</sup> reportaram que este SNP reside em um “consensus E-box element” (isto é, sequência de DNA que se liga ao fator básico de transcrição “helix-loop-helix” como o “upstream stimulatory factor-1”) e que a ligação ao fator de transcrição se faz quando o alelo “T” está presente. Há de se mencionar, porém, que a maior prevalência de indivíduos com antecedentes de tabagismo - um conhecido fator relacionado à elevação da PCR<sup>24</sup>, entre os pacientes com genótipo -390TT - pode ter influenciado nossos resultados.

Nosso estudo conseguiu demonstrar, também, que a presença do alelo “T”, não necessariamente em homocigose, é suficiente para influenciar a elevação dos níveis de proteína C reativa. Nossos dados



somam-se aos de Zhang e cols.<sup>98</sup> que, recentemente, estudando outros SNPs no gen da PCR, observaram de forma pioneira a influência de determinados haplótipos nos níveis desta proteína em pacientes com DRC em terapia dialítica.

Outro achado interessante do presente estudo foi a ausência de influência do fator genético na determinação dos níveis de PCR no segundo ano pós-transplante. Podemos inferir que a predisposição genética é um fator importante, porém incapaz de determinar isoladamente os níveis de proteína C reativa. Desta forma, mesmo nos indivíduos geneticamente predispostos, há a necessidade de interação com o ambiente (sexo, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes mellitus, uremia, disfunção endotelial) para a determinação do fenótipo “PCR elevado”<sup>99-101</sup>.

Especulamos que, a longo prazo, o transplante renal bem sucedido, por levar à correção de importantes determinantes dos níveis de PCR, como disfunção endotelial<sup>100, 101</sup> e uremia, e também por promover a interrupção da terapia dialítica, reduz a influência do componente genético na determinação de diferenças significativas entre os níveis de proteína C reativa de pacientes com doença renal crônica.

Serão necessários novos estudos, com número de pacientes e desenho adequados para confirmar nossos dados, no entanto é bem

interessante a idéia de se considerar a investigação genética quando da estratificação de risco para a ativação do estado microinflamatório crônico e seu principal corolário, a doença cardiovascular na população com doença renal.

---

## **6. CONCLUSÕES**

---

O transplante renal reduz, a longo prazo, a PCR em pacientes com DRC em diálise com níveis previamente elevados deste marcador. Entretanto, apesar da redução, os níveis de proteína C reativa persistem acima dos limites da normalidade nestes pacientes, sinalizando risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Em nossa população, polimorfismos genéticos na posição -390 da região promotora do gen codificador da PCR demonstraram influência nos níveis basais desta proteína no período dialítico e no primeiro ano após o transplante renal; demonstrada pelo fato de pacientes portadores do alelo “T” apresentarem níveis mais elevados de PCR. Esta influência não se repetiu, contudo, no segundo ano pós-transplante.

---

**7. REFERÊNCIAS**

---

1. Foley, R.S.; Parfrey, P.S.; Sarnak, M.J. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis*, v. 32 (suppl.3), 112-119, 1998.
2. Kaysen, G.A. The microinflammatory state in uremia: causes and potential consequences. *J Am Soc Nephrol*, v.12, 1549-1557, 2001.
3. Stam, F.; Guldener, C.; Becker, A.; Dekker, J.M.; Heine, R.J.; Bouter, L.M.; Stehower, C.D.A. Endothelial dysfunction contributes to renal function – associated cardiovascular mortality in a population with mild renal insufficiency: The Hoorn Study. *J Am Soc Nephrol*, v.17, 537-545, 2006
4. Romão Jr, J.E.; Haiashi, A.R.; Elias, R.M.; Luders, C.; Ferraboli, R.; Castro, M.C.M.; Abensur, H. Positive acute-phase inflammatory markers in different stages of chronic kidney disease. *Am J Nephrol*, v.26, 59-66, 2006.
5. Stenvinkel, P.; Heimbürger, O.; Paultre, F.; Diczfalusy, U.; Wang, T.; Berglund, L.; Jogestrand, T. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int*, v. 55, 1899-1911, 1999.

6. Marckmann, P. Nutritional status of patients on hemo and peritoneal dialysis. *Clin Nephrol*, v.29, 75-78, 1998.
7. Berström, J.; Lindholm, B. Nutrition and adequacy of dialysis. How do hemodialysis and CAPD compare? *Kidney Int*, v. 34 (suppl.39), 1993.
8. Cianciaruso, B.; Brunori, G.; Kopple, J.D. et al. Cross-sectional comparison of malnutrition in continuous ambulatory dialysis and hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, v.26, 475-483, 1995.
9. Qureshi, A.R.; Alvestrand, A.; Danielsson, A.; Divino-Filho, J.C.; Gutierrez, A.; Lindholm B. et al. Factors predicting malnutrition in hemodialysis patients: a cross sectional study. *Kidney Int*, v.53, 773-782, 1998.
10. Stenvinkel, P.; Heimbürger, O.; Lindholm, B.; Kaysen, G.A.; Bergström, J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant*, v.15, 953-960, 2000.
11. Yeun, J.Y.; Kaysen, G.A. C-Reactive protein, oxidative stress, homocysteine, and troponin as inflammatory and metabolic predictors of atherosclerosis in ESRD. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v.9, 621-630, 2000.

12. Menon, V.; Greene, T.; Wang, X.; Pereira, A.A.; Marcovina, S.M.; Beck, G.J.; Kusek, J.W.; Collins, A.J.; Levey, A.S.; Sarnak, M.J. C-reactive protein and albumin as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int*, v. 68, 766-772, 2005.
13. Amore, A.; Coppo, R. Immunological basis of inflammation in dialysis. *Nephrol Dial Transplant*, v.17 (suppl 8), 16-24, 2002.
14. Tetta, C.; Biasioli, S.; Schiavon, R.; Inguaggiato, S.; David, S.; Panichi, V.; Wratten, M.L. An overview of haemodialysis and oxidant stress. *Blood Purif*, v.17, 118-126, 1999.
15. Becker, B.N.; Himmelfarb, J.; Heinrich, W.L., Hakim, R.M. Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors. *J Am Soc Nephrol*, v.8, 475-486, 1997.
16. Oberg, B.P.; McMenamin, E.; Lucas, F.L.; McMonagle, E.; Morrow, J.; Ikizler, T.A.; Himmelfarb. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int*, v.65, 1009-1016, 2004.
17. Wratten, M.L.; Tetta, C.; Ursini, F.; Sevanian, A. Oxidant stress in hemodialysis: Prevention and treatment strategies. *Kidney Int*, v.58 (suppl.76), 126-132, 2002.



18. Stenvinkel, P.; Bárány, P. Anaemia, rHuEPO resistance, and cardiovascular disease in end-stage renal failure: links to inflammation and oxidative stress. *Nephrol Dial Transplant*, v.17 (suppl.5), 32-37, 2002.
19. Lim, P.S.; Wei, Y.H.; Yu, Y.L.; Kho, B. Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant*, v.14, 2680-2687, 1999.
20. Heitzer, T.; Schlinzig, T.; Krohn, K.; Meinertz, T.; Munzel, T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*, v. 104, 2673-2678, 2001.
21. Langlois, M.; Duprez, D.; Delanghe, J.; De Buyzere, M.; Clement D.L. Serum Vitamin C concentration is low in peripheral arterial disease and is associated with inflammation and severity of atherosclerosis. *Circulation*, v. 103, 1863-1868, 2001.
22. Himmelfarb, J.; McMonagle, E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int*, v.60, 358-363, 2001.
23. Stenvinkel, P. Inflammatory and atherosclerotic interaction in the depleted uremic patient. *Blood Purif*, v.19, 53-61, 2001.
24. Woloshin, S.; Schwartz. Distribution of C-reactive protein values in the United States. *N Engl J Med*, v. 353, 1611-1612, 2005.

25. Stuveling, E.M.; Hillege, H.L.; Bakker, S.J.L.; Gans, R.O.B.; Jong, P.E.; Zeeuw, D. C-reactive protein is associated with renal function abnormalities in a non-diabetic population. *Kidney Int*, v.63, 654-661, 2003.
26. Rattazzi, M.; Puato, M.; Faggini, E.; Bertipaglia, B.; Grego, F.; Pauletto, P. New markers of accelerated atherosclerosis in end-stage renal disease. *JN*, v. 16, 11-20, 2003.
27. Pecoits-Filho, R.; Bárány, P.; Lindholm, B.; Heimbürger, O.; Stenvinkel, P. Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*, v.17, 1684-1688, 2002.
28. Zoccali, C.; Benedetto, F.A.; Mallamaci, F.; Tripepi, G.; Fermo, I.; Foca, A.; Paroni, R.; Malatino, L.S. Inflammation is associated with carotid atherosclerosis in dialysis patients. Creed Investigators. Cardiovascular Risk Extended Evaluation in Dialysis Patients. *J Hypertens*, v.18, 1207-1213, 2000.
29. Ridker, P.M. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*, v. 103, 1813-1818, 2001.
30. Tripepi, G.; Mallamaci, F.; Zoccali, C. Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J Am Soc Nephrol*, v.16 (suppl.1), 83-88, 2005.

31. Zimmermann, J.; Herrlinger, S.; Pruy, A.; Metzger, T.; Wanner, C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int*, v.55, 648-658, 1999.
32. Iseki, K.; Tozawa, M.; Yoshi, S.; Fukiyama, K. Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, v.14, 1956-1960, 1999.
33. Yeun, J.Y.; Levine, R.A.; Mantadilok, V.; Kaysen G.A. C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, v.35, 469-476, 2000.
34. Nascimento, M.M.; Pecoits-Filho, R.; Qureshi, R.; Hayashi, S.Y.; Manfro, R.C.; Pachaly, M.A.; Renner, L.; Stenvinkel, P.; Lidholm, B.; Riella, M.C. The prognostic impact of fluctuating levels of C-reactive protein in Brazilian haemodialysis patients: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant*, v.19, 2803-2809, 2004.
35. Yoon, J-W.; Gollapudi, S.; Pahl, M.V.; Vaziri, N.D. Naïve and central memory T cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney Int*, v.70, 371-376, 2006.
36. Miyata, T.; Ueda, Y.; Horie, K.; Nangaku, M.; Tanaka S.; van Ypersele de Strihou, C.; Kurokawa, K. Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int*, v.53, 416-422, 1998.

37. Don, B.R.; Kaysen, G.A. Assessment of inflammation and nutrition in patients with end-stage renal disease. *JN*, v. 13, 249-259, 2000.
38. Memoli, B.; Minutolo, R.; Bisesti, V.; Postiglione, L.; Conti, A.; Marzano, L.; Capuano, A.; Andreucci, M.; Balletta, M.M.; Guida, B.; Tetta, C. Changes of serum albumin and C-reactive protein are related to changes of interleukin-6 release by peripheral blood mononuclear cells in hemodialysis patients treated with different membranes. *Am J Kidney Dis*, v.39, 266-273, 2002.
39. Panichi, V.; Migliori, M.; De Pietro, S.; Metelli, MR, Taccola, D.; Perez, R.; Palla, R.; Rindi, P.; Cristofani, R.; Tetta, C. Plasma C-reactive protein in hemodialysis patients: a cross-sectional, longitudinal clinical survey. *Blood Purif*, v.18, 30-36, 2000.
40. Lonnemann, G. The quality of dialysate: an integrated approach. *Kidney Int*, v.58 (suppl.76), 112-119, 2002.
41. Abensur, H. Compreendendo a cavidade peritoneal nos pacientes em diálise peritoneal. *Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Livre-Docência*, 2002.
42. Dinits-Pensy, M.; Forrest, G.N.; Cross, A.S.; Hise, M.K. The use of vaccines in adult patients with renal disease. *Am J Kidney Dis*, v.46, 997-1011, 2005.

43. Foley, R.N.; Guo, H.; Snyder, J.J.; Gilbertson, D.T.; Collins, A.J. Septicemia in the United States dialysis population, 1991 to 1999. *J Am Soc Nephrol*, v.15, 1038-1024, 2004.
44. Craig, R.G.; Spittle, M.A.; Levin, N.W. Importance of periodontal disease in the kidney patient. *Blood Purif*, v.20, 113-119, 2002.
45. Polkinghorne, K.R.; McDonald, S.P.; Atkins, R.C.; Kerr, P.G. Vascular access and all-cause mortality: A propensity score analysis. *J Am Soc Nephrol*, v.15, 477-486, 2004.
46. Spence, J.D.; Barnett, P.A.; Bulman, D.E.; Hegele, R.A. An approach to ascertain probands with a non-traditional risk factor for carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 144, 429-434, 1999.
47. Hansson, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, v. 352, 1685-1695, 2005.
48. McCullough, P.A. Evaluation and treatment of coronary artery disease in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*, v.67 (suppl.95), 51-58, 2005.
49. Ross, R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *N Engl J Med*, v. 340, 115-126, 1999.
50. Maggi, E.; Belazzi, R.; Falaschi, F.; Frattoni, A.; Perani, G.; Finardi, G.; Gazo, A.; Nai, M.; Romanini, D.; Bellomo, G. Enhanced LDL oxidation in uremic patients: an additional mechanism for accelerated atherosclerosis? *Kidney Int*, v.45, 876-893, 1994.

51. Pauletto, P.; Puato, M.; Faggin, E.; Santipolo, N.; Pagliara, V.; Zoleo, M.; Deriu, G.P.; Grego, F.; Plebani, M.; Sartore, S.; Bon, G.B.; Heymes, C.; Samuel, J.L.; Pessina, A.C. Specific cellular features of atheroma associated with development of neointima after carotid endarterectomy: the carotid atherosclerosis and restenosis study. *Circulation*, v.102, 771-778, 2000.
52. Arici, M.; Walls, J. End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: Is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int*, v.59, 407-414, 2001.
53. Stenvikel, P.; Heimbürger, O.; Jogestrand, T. Elevated Interleukin-6 Predicts Progressive Carotid Artery Atherosclerosis in Dialysis Patients: Association With Chlamydia pneumoniae Seropositivity. *Am J Kidney Dis*, v.39, 274-282, 2002.
54. Brull, D.J.; Serrano, N.; Zito, F.; Jones, L.; Montgomery, H.E.; Rumley, A.; Sharma, P.; Lowe, G.D.O.; World, M.J.; Humphries, S.E.; Hingorani, A.D. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels. Implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.23, 2063-2069, 2003.
55. Carlson, C.S.; Aldred, S.F.; Lee, P.K.; Tracy, R.P.; Schwartz, S.M.; Rieder, M.; Liu, K.; Williams, O.D.; Iribarren, C.; Lewis, E.C.; Fornage, M.; Boerwinkle, E.; Gross, M.; Jaquish, C.; Nickerson, D.A.; Myers, R.M.; Siscovick, D.S.; Reiner, A.P. Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels. *Am J Hum Genet*, v.77, 64-77, 2005.

- 
56. Pecoits-Filho, R.; Nordfors, L.; Lindholm, B.; Hoff, C.M.; Schalling, M.; Stenvinkel, P. Genetic approaches in the clinical investigation of complex disorders: Malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) as a prototype. *Kidney Int*, v.63 (suppl.84), 162-167, 2003.
  57. Peters, R.J.G.; Boekholdt, S.M. Gene polymorphisms and the risk of myocardial infarction – an emerging relation. *N Engl J Med*, v. 347, 1963-1965, 2006.
  58. Iyengar, S.K.; Schelling, J.R.; Sedor, J. Approaches to understanding susceptibility to nephropaty: fro genetics to genomics. *Kidney Int*, v.61 (suppl. 1), 61-67, 2002.
  59. Suk, H.J.; Ridker, P.M.; Cook, N.R.; Zee, R.Y.L. Relation of polymorphism within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis*, v.178, 139- 145, 2005.
  60. Kathiresan, S.; Larson, M.G.; Vasan, R.S.; Guo, C.; Gona, P.; Keaney J.F.; Wilson, P.W.F.; Newton-Cheh, C.; Musone, S.L.; Camargo, A.L.; Drake, J.A.; Levy, D.; O'Donnell, C.J.; Hirschhorn, J.N.; Benjamin, E.J. Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation*, v.113, 1415-1423, 2006.

61. Szalai, A.J.; Wu, J.; Lange, E.M.; McCrory, M.A.; Langefeld, C.D.; Williams, A.; Zakharkin, S.O.; George, V.; Allinson, D.B.; Cooper, G.S.; Xie, F.; Fan, Z.; Edberg, J.C.; Kimberly, R.P. Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level. *J Mol Med*, v.83, 440-447, 2005.
62. Schouten, W.E.M., Grooteman, M.P.C.; van Houte A-J.; Schoorl, M.; van Limbeek, J.; Nubé, M.J. Effects of dialyser and dialysate on the acute phase response in clinical bicarbonate dialysis. *Nephrol Dial Transplant*, v.15, 379-384, 2000.
63. Schindler, R.; Boenisch, O.; Fischer, C.; Frei, U. Effect of the haemodialysis membrane on the inflammatory reaction in vivo. *Clin Nephrol*, v.53, 452-459, 2000.
64. Sitter, T.; Bergner, A.; Schiffel, H. Dialysate related cytokine induction and response to recombinant human erythropoietin in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, v.15, 1207-1211, 2000.
65. Stenvinkel, P. Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated? *Nephrol Dial Transplant*, v.17, (suppl.8), 33-38, 2002.
66. Stenvinkel, P.; Andersson, A.; Wang, T.; Lindholm, B.; Bergstrom, J.; Palmblad, J.; Heimbürger, O.; Cederholm, T. Do ACE-inhibitors suppress tumor necrosis factor- $\alpha$  production in advanced chronic renal failure? *J Intern Med*, v.246, 503-507, 1999.



- 
67. Ikonomidis, I.; Andreotti, F.; Economou, E.; Stefanidis, C.; Toutouzas, P.; Nihoyannopoulos, P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation*, v. 100, 793-798, 1999.
  68. Ridker, P.M.; Cushman, M.; Stampfer, M.J.; Russel, P.T.; Hennekens, C.H. Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*, v. 336, 973-979, 1997.
  69. Islam, K.N.; O'Byrne, D.; Devaraj, S.; Palmer, B.; Grundy, S.M.; Jialal, I. Alpha-tocopherol supplementation devreases the oxidative susceptibility of LDL in renal failure patients on dialysis therapy. *Atherosclerosis*, v. 150, 217-224, 2000.
  70. Boaz, M.; Smetana, S.; Weinstein, T.; Matas, Z.; Gafter, U.; Iaina, A.; Knecht, A.; Weissgarten, Y.; Brunner, D.; Fainaru, M.; Green, M.S. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, v. 356, 1213-1218, 2000.
  71. Devaraj, S.; Jialal, I. Alpha tocopherol supplementation decreases serum C- reactive protein and monocyte interleukin-6 levels in normal volunteers and type-2 diabetic patients. *Free Radical Biol Med*, v.29, 790-792, 2000.

72. Uppritchard, J.E.; Sutherland, W.H.F., Mann, J.I. Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v. 23, 733-738, 2000.
73. Cristol, J.P.; Bosc, J.Y.; Badiou, S.; Leblanc, M.; Lorrho, R.; Descomps, B.; Canaud, B. Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrol Dial Transplant*, v.12, 2312-2317, 1997.
74. Nemeth, I; Turi, S.; Haszon, I.; Bereczki, C. Vitamin E alleviates the oxidative stress of erythropoietin in uremic children on hemodialysis. *Pediatr Nephrol*, v.14, 13-17, 2000.
75. Gastaldello, K.; Vereerstraeten, A.; Nzame-Nze, T.; Vanherweghem, J.L.; Tielemans, C. Resistance to erythropoietin in iron-overload haemodialysis patients can be overcome by ascorbic acid administration. *Nephrol Dial Transplant*, v.10, 44-47, 1995.
76. Zachee, P.; Ferrant, A.; Daelemans, R.; Goossens, W.; Boogaerts, M.A.; Lins, R.L. Reduced glutathione for the treatment of anemia during hemodialysis: a preliminary communication. *Nephron*, v.71, 343-349, 1995.
77. Herrera, J.; Nava, M.; Romero, F.; Rodrigues-Iturbe, B. Melatonin prevents oxidative stress resulting from iron and erythropoietin administration. *Am J Kidney Dis*, v.37, 750-757, 2001.

78. Reyes-Terán, G.; Sierra-Madero, J.G.; Martinez del Cerro, V.; Arroyo-Figueroa, H.; Pasquetti, A.; Calva, J.J.; Ruiz-Palacios, G.M. Effects of thalidomide on HIV-associated wasting syndrome: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical-study. *AIDS*, v. 10, 1501-1507, 1996.
79. Tramontana, J.M.; Utaipat, U.; Molloy, A.; Akarasewi, P.; Burroughs, M.; Makonkawkeyoon, S.; Johnson, B.; Klausner, J.D.; Rom, W.; Kaplan, G. Thalidomide treatment reduces tumour necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. *Mol Med*, v. 1, 384-397, 1995.
80. Urbich, C.; Dimmeler, S. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int*, v. 67, 1672-1676, 2005.
81. Ridker, P.M.; Rifai, N.; Lowenthal, S.P. Rapid reduction in C-reactive protein with cerivastatin among 785 patients with primary hypercholesterolemia. *Circulation*, v. 103, 1191-1193, 2001.
82. Ridker, P.M.; Cannon, C.P.; Morrow, D.; Rifai, N.; Rose, L.M.; McCabe, C.H.; Pfeffer, M.A.; Braunwald, E. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med*, v. 352, 20-28, 2005.
83. Nissen, S.E.; Tuzcu, E.M.; Schoenhagen, P.; Crowe, T.; Sasiela, W.J.; Tsai, J.; Orazem, J.; Magorien, R.D.; O'Shaughnessy, C.; Ganz, P. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, v. 352, 29-38, 2005.

84. Wanner, C.; Krane, V.; März, W.; Olschewski, M.; Mann, J.F.E.; Ruf, G.; Ritz, E. Atrovastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*, v. 353, 238-248, 2005.
85. Nissen, S.E.; Nicholls, S.J.; Sipahi, I.; Libby, P.; Raichlen, J.S.; Ballantyne, C.M.; Davignon, J.; Erbel, R.; Fruchart, J.C.; Tardif, J.C.; Schoenhagen, P.; Crowe, T.; Cain, V.; Wolski, K.; Goormastic, M.; Tuzcu, E.M. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA*, v.295, 1556-1565, 2006.
86. Rosenberger, J.; Dijk, J.P.; Nagyova, I.; Roland, R.; Geckova, A.M.; Heuvel, W.J.A.; Groothoff. Do dialysis- and transplantation-related medical factors affected perceived health status? *Nephrol Dial Transplant*, v.20, 2153-2158, 2005.
87. Kasiske, B.L.; Guijarro, C.; Massy, Z.A.; Wiederkehr, M.R.; Ma, J.Z. Cardiovascular disease after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*, v.7, 158 – 165, 1996.
88. Varaganam, M.; Finney, H.; Trevitt, R.; Sharples, E.; McCloskey, D.J.; Sinnott, P.J.; Raftery, M.J.; Yaqoob, M. Pretransplantation levels of C-reactive protein predict all-cause and cardiovascular mortality, but not graft outcome in kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis*, v.43, 502-507, 2004.

89. Ducloux, D.; Kazory, A.; Chalopin, J-M. Predicting coronary heart disease in renal transplant recipients: a prospective study. *Kidney Int*, v. 66, 441-447, 2004.
90. Ree, R.M.; Vries, A.P.J.; Oterdoom, L.H.; The, T.H.; Gansevoort, R.T.; Heide, J.J.H.; Son, W.J.; Ploeg, R.J.; Jong, P.E.; Gans, R.O.B.; Bakker, S.J.L. Abdominal obesity and smoking are important determinants of C-reactive protein in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*, v.20, 2524-2531, 2005.
91. Ducloux, D.; Kazory, A.; Chalopin, J-M. Posttransplant diabetes mellitus and atherosclerotic events in renal transplant recipients: a prospective study. *Transplantation*, v.79, 438-443, 2005.
92. Simmons, E.M.; Langone, A.; Sezer, M.T.; Vella, J.P.; Recupero, P.; Morrow, J.D.; Ikizler.; Himmelfarb. Effect of renal transplantation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients. *Transplantation*, v.79, 914- 919, 2005.
93. Cueto-Manzano, A.M.; Morales-Buenrostro, L.E.; González-Espinoza, L.; Gonzáles-Tableros, N.; Martín-del-Campo, F.; Correa-Rotter, R.; Valera, I.; Alberú, J. Markers of inflammation before and after renal transplantation. *Transplantation*, v.80, 47-51, 2005.
94. Cottone, S.; Palermo, A.; Vaccaro, F.; Raspanti, F.; Buscemi, B.; Incalcaterra, F.; Cerasola, G. In renal Transplanted patients inflammation and oxidative stress are interrelated. *Transplant Proc.* v.38, 1026-1030, 2006.

95. Miyata T; Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, Strihou CY, Kurokawa K. Renal Catabolism of advanced glycation end products: The fate of pentosidine. *Kidney Int* v. 53, 416-422, 1998.
96. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Bárány P.; Suliman, M.; Fehrman-Ekholm, I.; Lindholm, B.; Stenvinkel, P. Association between inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis*, v.41, 1212-1218, 2003.
97. Blake, J.G.; Rifai, N.; Buring, J.E.; Ridker, P.M. Blood pressure, C-reactive protein, and risk of future cardiovascular events. *Circulation*. V.108, 2993-2999, 2003.
98. Zhang, L.; Kao, L.; Berthier-Schaad, Y.; Plantinga, L.; Fink, N.; Smith, M.W.; Coresh, J. C-Reactive Protein Haplotype Predicts Serum C-Reactive Protein Levels But Not Cardiovascular Disease Risk in a Dialysis Cohort. *Am J Kidney Dis*, v.49, 118-126, 2007.
99. Mohan, V.; Deepa, R.; Velmurugan, K.; Premalatha, G. Association of C-reactive protein with body fat, diabetes and coronary artery disease in Asian Indians; The Chennai Urban Epidemiology Study. *Diabet Med*, v.22, 863-870, 2005.
100. Kocak, H.; Ceken K.; Yavuz, A.; Yucel, S.; Gurkan A.; Erdogan, O.; Ersoy, F.; Yakupoglu, G.; Demirbas, A.; Tuncer, M. Effect of renal transplantation on endothelial function in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, v.21, 203-207, 2006.

101. Oflaz, H.; Turkmen, A.; Turgut, F.; Pamukcu, B.; Umman, S.; Ucar, A.; Akyol, Y.; Uzun, S.; Kazancioglu, R.; Kurt, R.; Sever, M.S. Changes in endothelial function before and after renal transplantation. *Transplant International*, v.19, 333-337, 2006.