

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós- Graduação em Saúde

Jessica do Amaral Bastos

**HIPOVITAMINOSE D, CATELICIDINA E DOENÇA
PERIODONTAL: ASSOCIAÇÕES NA DOENÇA
RENAL CRÔNICA**

**JUIZ DE FORA
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BASTOS, JESSICA .
HIPOVITAMINOSE D, CATELICIDINA E DOENÇA PERIODONTAL:
ASSOCIAÇÕES NA DOENÇA RENAL CRÔNICA / JESSICA BASTOS. -- 2013.
110 p. : il.

Orientador: LUIZ CARLOS ANDRADE
Coorientadora: ANA PAULA FERREIRA
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora,
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde
Brasileira, 2013.

1. PERIODONTITE CRÔNICA. 2. DOENÇA PERIODONTAL. 3. DOENÇA RENAL CRÔNICA. 4. VITAMINA D. 5. CATELICIDINA. I. ANDRADE, LUIZ CARLOS, orient. II. FERREIRA, ANA PAULA, coorient. III. Título.

Jessica do Amaral Bastos

**HIPOVITAMINOSE D, CATELICIDINA E DOENÇA
PERIODONTAL: ASSOCIAÇÕES NA DOENÇA
RENAL CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Área de Concentração em Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira de Andrade

Coorientadores: Prof. Dra. Ana Paula Ferreira

Prof. Dr. Marcus Gomes Bastos

JUIZ DE FORA

2013

Jessica do Amaral Bastos

**HIPOVITAMINOSE D, CATELICIDINA E DOENÇA PERIODONTAL:
ASSOCIAÇÕES NA DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Área de Concentração em Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Saúde.

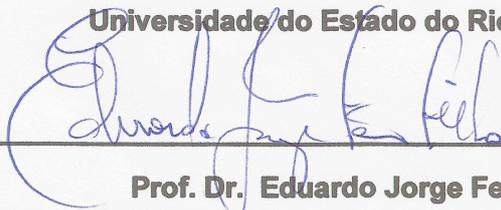
Aprovada em 01 de agosto de 2013.

BANCA EXAMINADORA



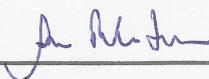
Prof. Dr. Edison Souza

Universidade do Estado do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Eduardo Jorge Feres Filho

Universidade Federal do Rio de Janeiro



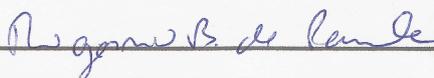
Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Maria das Graças Afonso Miranda Chaves

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Rogério Baumgratz de Paula

Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado uma família maravilhosa que esteve ao meu lado em todas as etapas da minha vida. Obrigada, Eduardo Salgado, por sua compreensão ao longo desse percurso, por ter abdicado de feriados e fins de semana para estar ao meu lado. Agradeço também a meu filho, que, apesar de ter apenas 6 aninhos, foi capaz de ter atitudes tão maduras, compreendendo a minha ausência durante as brincadeiras. Ao meu pai, Marcus, que sempre acreditou em mim e no meu potencial. Sempre foi meu exemplo de pessoa humana, dedicação e competência na profissão. Minha mãe, Regina, tão guerreira, que passou por muitos momentos difíceis este ano e que, aos poucos, está superando todas as perdas. Amo muito todos vocês. À minha irmã, Josie Bastos, que mesmo longe, me apoiou, torceu por mim em todos os momentos e proporcionou momentos de alegria em suas vindas a Juiz de Fora! Obrigada! Te amo!!!!

À minha avó Olga Salomão, que está no céu, exemplo de sabedoria e dedicação ao próximo. Aprendi muito com ela durante todos esses anos. Ao meu tio Thadeu Salomão, que está ao lado dela. Meus eternos anjinhos...

À minha avó Nonoca e ao meu avô Noel, exemplos de dedicação à vida e superação. Amo vocês!!!

A toda a minha família, que, direta ou indiretamente, estiveram presente na minha vida ao longo de mais uma trajetória. À minha tia Rita Bastos por ter participado de todo o percurso, desde o Mestrado... Obrigada pela ajuda e conselhos!!!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira de Andrade, por ter me direcionado e acreditado em mim ao longo de todos esses anos, desde o Mestrado. Obrigada por toda a confiança, puxões de orelha e por ter sido sempre solícito quando mais precisei!!!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Marcus Gomes Bastos, por ter disponibilizado uma parte de seu precioso tempo com ensinamentos, propostas e

ideias durante esse Projeto de Doutorado, que, finalmente, tornou-se um sonho realizado!!! Obrigada por tudo!!!

Ao Prof. Rogério Baumgratz de Paula, por participar deste Projeto e acreditar nele desde o Mestrado. Obrigada por todo o apoio.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, por ter viabilizado a minha participação no curso de Atualização em Imunologia da UFJF. Aprendi muito! Obrigada por possibilitar toda a logística para realização da técnica do ELISA.

À Sandra Bertelli por ter me ensinado sobre a técnica do ELISA e por ter disponibilizado todo o material de consumo necessário para realização da técnica.

À Profa Dra. Maria das Graças Afonso Miranda Chaves por ter acreditado neste Projeto, investido em aparelhos modernos, contribuindo assim para diversas publicações e melhorando a qualidade das pesquisas na área de Periodontia.

Ao Reitor, Prof. Dr. Henrique Duque de Miranda Chaves Filho e ao Diretor da Faculdade de Odontologia, Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo, por disponibilizarem seu precioso tempo para conseguir os aparelhos que foram essenciais para viabilizar o Projeto.

Ao Prof. Dr. Eduardo Machado Vilela por estar sempre ao meu lado, acreditando e apoiando o nosso Projeto. Desde o Mestrado, tive a oportunidade de trabalhar com você, segui seu exemplo e fiz a Especialização de Implantodontia sob sua coordenação. Sempre te admirei e espero que trabalheemos juntos por muito tempo...

Ao Prof. Dr. Fernando Antonio Basile Colugnati pelas orientações na parte estatística.

Ao Prof. Dr. Eduardo Jorge Feres Filho por ser tão solícito no momento das análises dos resultados do fluido gengival. Obrigada!

À Dra. Andrea Marcaccini, que, mesmo distante nesse final, ajudou-me nas análises do ELISA.

Ao Márcio, bioquímico do NIEPEN, por estar sempre tão disponível nos

momentos das coletas de sangue dos pacientes.

À querida Lucilene Santos Lima Vieira, sempre tão solícita (mesmo que em cima da hora) nas correções gramaticais da Tese. Tem acompanhado toda a minha trajetória desde o Mestrado, os artigos e capítulos de livro gerados ao longo tempo. Muito obrigada mesmo!!!

Às amigas Patrícia Daibert e Patrícia Lima por terem acreditado nesse Projeto que acabou se tornando uma linha de Pesquisa. Obrigada por tudo!

Aos alunos da Pós-graduação em Saúde Brasileira do NIEPEN por toda ajuda e pelas ideias que sempre acrescentam.

Aos alunos do Projeto de Extensão Atenção à Saúde Bucal de Pacientes Hipertensos, Diabéticos e com DRC da FO/UFJF por terem ajudado no tratamento dos pacientes da pesquisa que tanto precisam. À aluna Érica pela ajuda durante a pesquisa. À Dra. Mirelle Henrique por sempre haver se colocado disponível às segundas-feiras para concretizar o sonho de vários pacientes, proporcionando a confecção das próteses. Obrigada mesmo!!!

À Fundação IMEPEN da Universidade Federal de Juiz de Fora por terem disponibilizado os materiais solicitados ao longo da pesquisa.

RESUMO

Introdução: A prevalência de periodontite crônica (PC), na sua forma mais grave, em pacientes com doença renal crônica (DRC) tem sido reportada ao longo desses anos. A deficiência de vitamina D (25(OH)D) e de catelicidina (LL-37) parece desempenhar papel importante na patogênese da PC, e níveis inadequados de vitamina D e LL-37 têm sido observados em pacientes com DRC. **Objetivo:** Examinar a associação entre níveis séricos de 25 (OH) D, LL-37 e IL-6 no plasma e no fluido gengival de pacientes com PC e DRC. **Método:** Trata-se de um estudo transversal, em que foram constituídos quatro grupos: Grupo 1, 15 indivíduos sistemicamente saudáveis (SS) e sem PC (SS/PC-); Grupo 2, 15 pacientes SS e com PC (SS/PC+); Grupo 3, 15 pacientes com DRC e sem PC (DRC/PC-) comparado a um grupo de 15 pacientes com DRC e PC (DRC/PC+). Os dados demográficos, de exame físico e laboratoriais foram obtidos no dia da consulta. A DRC foi definida e estagiada segundo a NKF QDOKI™. Os níveis séricos de 25(OH)D foram dosados por quimioluminescência quando da avaliação da PC, que foi caracterizada segundo os critérios de Academia Americana de Periodontologia (1999). A LL-37 e IL-6 no plasma e no fluido gengival foram dosados através do ELISA. Os resultados de 25(OH)D foram estratificados em deficiência (≤ 14 ng/mL), insuficiência (15-29 ng/mL) e suficiência (≥ 30 ng/mL). **Resultados:** os pacientes com DRC e PC apresentaram PC mais grave, e menores níveis de 25(OH)D e de LL-37 plasmáticas. Observou-se associação entre níveis reduzidos de 25(OH)D e de LL-37 no plasma. Por outro lado, níveis elevados de LL-37 e IL-6 foram observados no fluido gengival dos pacientes com PC (SS/PC+ e DRC/PC+) comparativamente àqueles sem a doença periodontal (SS/PC- e DRC/PC). **Conclusão:** Em pacientes com DRC, níveis inadequados de vitamina D e de LL-37, possivelmente, afetam a resposta imune inata, predispondo o indivíduo à infecção. Níveis aumentados de IL-6 e da LL-37 no fluido gengival caracterizam um aumento da resposta inflamatória local, o que poderia explicar PC mais grave nesses pacientes.

Palavras-chave: Insuficiência renal crônica; falência renal crônica; periodontite crônica; vitamina D.

ABSTRACT

Introduction: The prevalence of chronic periodontitis (CP), in its severe form, in patients with chronic kidney disease (CKD) has been reported over the years. Deficiency of vitamin D (25 (OH) D) and cathelicidin (LL-37) appears to play an important role in the pathogenesis of CP, and inadequate levels of vitamin D and LL-37 have been observed in patients with CKD. **Aim:** to examine the association between serum 25 (OH) D, LL-37 and IL-6 in plasma and gingival crevicular fluid in patients with CKD and CP. **Method:** This was a cross-sectional study where four groups were formed: Group 1, 15 systemically healthy individuals (SS) and without CP (SS/CP-), Group 2, 15 patients with CP and SS (SS / CP +) and Group 3, 15 patients with CKD and without PC (DRC/CP-), and 15 patients with CKD and CP (DRC / CP +). Demographic data, physical examination and laboratory data were obtained on the day of the exam. CKD was defined and staged according to the NKF QDOKI™. Serum 25 (OH) D levels were measured by chemiluminescence. CP was characterized according to the American Academy of Periodontology (1999). LL-37 and IL-6 in plasma and gingival crevicular fluid were measured by ELISA. **Results:** the results of 25 (OH) D were stratified deficient (≤ 14 ng / mL), insufficient (15-29 ng / mL) and sufficiency (≥ 30 ng / ml). Patients with CKD and CP had a more severe CP and lower levels of 25(OH)D and LL-37 in plasma. It has been observed an association between lower levels of 25(OH)D and LL-37 in plasma. Moreover, statistically higher levels of LL-37 and IL-6 were found in gingival fluid of patients with CP (SS / CP + and CKD / CP +) compared to those without periodontal disease (CKD /CP- and SS/CP-) . **Conclusion:** In patients with CKD, inadequate levels of 25(OH)D and LL-37 can possibly affect the innate immune response, predisposing individuals to infection. Increased levels of IL-6 and the LL-37 in the gingival crevicular fluid featuring an increase of inflammatory responses, which could explain a worse CP in these patients.

Key words: Renal insufficiency chronic; Chronic periodontitis; Vitamin D.

Lista de Tabelas e Figuras

Figura 1: Classificação e estagiamento da DRC de acordo com a taxa de filtração glomerular	16
Figura 2: Fotos da cavidade bucal dos pacientes incluídos da pesquisa.....	20
Figura 3: Ilustração da associação entre 25 (OH) D, CYP27B1 (1- α -hidroxilase), Toll-like receptors e LL-37.....	24
Figura 4: Ilustração da distribuição de LL-37 no periodonto.....	28
Figura 5: Representação da interação entre LPS de bactérias periodontopatogênicas,LL-37 e TLR 2 e 4.....	32
Figura 6: Triagem dos indivíduos da pesquisa.....	37

Lista de abreviaturas

1- α hidroxilase	enzima responsável por converter a 25 (OH) D em 1,25 (OH) ₂ D ₃
1,25 (OH) ₂ D ₃	forma ativa da vitamina D (calcitriol)
25 (OH) D	vitamina D (calcidiol)
AAP	Academia Americana de Periodontologia
<i>CAMP</i>	gene da catelicidina
CYP27B1	enzima denominada 1-alfa hidroxilase
DP	doença periodontal
DRC	doença renal crônica
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCG	fluido gengival
FG	filtração glomerular
hCAP18	proteína antimicrobiana catiônica humana. Forma inativa da LL-37.
HIPERDIA	Centro Hiperdia de Atenção Secundária em Hipertensão Arterial Diabetes e Doença renal crônica
IL-1 β	interleucina 1 β
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
IP	índice de placa
K/DOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative

LL-37	catelicidina
LPS	lipopolissacarídeos
MDRD	equação matemática para cálculo da taxa de filtração glomerular
NHANES V	estudo complexo, multifásico, estratificado de indivíduos que representam a população americana
NCI	nível clínico de inserção
NIEPEN	Núcleo Interdisciplinar de Estudos, Pesquisas e Tratamento em Nefrologia
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	periodontite agressiva
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PC	periodontite crônica
PCR	proteína C-reativa
PS	profundidade de sondagem
SCHIDO	Serviço de Controle de Hipertensos, Diabéticos e Obesos
SS	sangramento à sondagem
TLR	Toll-like receptors. Receptor de superfície celular
TLR2	Toll-like receptor 2. Receptor de superfície celular
TLR4	Toll-like receptor 4. Receptor de superfície celular
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
TRS	terapia renal substitutiva
VDR	receptor de vitamina D
Vit. D	vitamina D

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO.....	14
2) DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	16
3) PERIODONTITE.....	19
4) VITAMINA D.....	23
5) CATELICIDINAS.....	28
6) OBJETIVO.....	35
7) MATERIAL E MÉTODOS.....	36
7.1 Pacientes.....	36
7.2 Exame médico e odontológico.....	38
7.3 Avaliação laboratorial.....	40
8) ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
9) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
10) COMENTÁRIOS FINAIS.....	88
11) CONCLUSÃO.....	89
12) REFERÊNCIAS.....	90
 APÊNDICES.....	97

1) INTRODUÇÃO

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 60% dos óbitos mundiais se devem às doenças crônicas não transmissíveis. O termo doença renal crônica (DRC) engloba uma variedade de nefropatias que resulta no comprometimento morfofuncional do rim. A DRC é hoje considerada um dos mais importantes problemas de Saúde Pública no mundo, e, no Brasil, não é diferente. No censo sobre diálise realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, constatou-se a existência de aproximadamente 87 mil brasileiros em hemodiálise ou diálise peritoneal. Estima-se que exista cerca de 1,960 milhão (ou 1,87%) de brasileiros adultos com filtração glomerular (FG) $<60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$, ou seja, estágios 3, 4 e 5 da DRC.

As principais causas de DRC em nosso meio são a hipertensão arterial, a doença renal diabética e as glomerulopatias. Pacientes com DRC apresentam inúmeras complicações sistêmicas em consequência do acúmulo de metabólitos urêmicos, desequilíbrios imunológicos e endócrinos, que podem contribuir para o surgimento de diversas doenças bucais.

Diversas mudanças que ocorrem na cavidade bucal estão associadas diretamente à DRC ou à terapia medicamentosa dos pacientes renais crônicos, entre elas: xerostomia; distúrbios do paladar; candidíase oral; estomatite urêmica e hálito urêmico, hiperplasia gengival, periodontite.

Observa-se um número crescente de pesquisas que apontam que a periodontite contribui para uma variedade de doenças sistêmicas agudas e crônicas, entre elas, a aterosclerose, doença cardíaca e acidente vascular cerebral, diabetes mellitus, complicações obstétricas, doenças respiratórias, e, mais recentemente, a DRC. A explicação para a associação entre a periodontite e as doenças sistêmicas parece estar relacionada à infecção e à inflamação. Recentemente, a periodontite tem sido considerada um fator de risco não tradicional para a DRC. Infelizmente, não dispomos de dados na literatura contendo uma explicação biológica para a alta prevalência e gravidade da periodontite em pacientes com DRC.

Atualmente, alguns estudos apontam para a associação entre DRC e níveis mais baixos de vitamina D (25(OH)D) e do peptídeo antimicrobiano catelicidina (LL-37), tornando o paciente mais susceptível a infecções, o que poderia explicar a maior frequência e gravidade da PC em pacientes com DRC . Nenhum estudo, até o momento, associou dados sobre níveis séricos de 25(OH)D, LL-37 e IL-6 no plasma e no fluido gengival (FCG) de pacientes com DRC e PC.

Com isso, a hipótese deste estudo é de que pacientes com DRC apresentam níveis inadequados de 25(OH)D, o que levaria à diminuição dos níveis de LL-37 e, conseqüentemente, a maior susceptibilidade a infecções, inclusive periodontal.

2) DOENÇA RENAL CRÔNICA

Doença renal crônica (DRC) é um termo amplo que engloba uma variedade de nefropatias que resultam no comprometimento morfofuncional do rim (K/DOQI, 2002). A DRC acomete qualquer indivíduo que, independente da causa, e por um período superior a 3 meses, apresentar taxa de filtração glomerular (TFG) <60 mL/min/1,73m² ou ≥ 60 mL/min/1,73m², associada a pelo menos um marcador de lesão do parênquima renal (p. ex., micro ou macroalbuminúria e/ou hematúria e/ou alteração de imagem renal) (K/DOQI, 2002).

A DRC é, atualmente, estratificada em estágios de um a cinco, subdividindo o estágio 3 em 3A e 3B (ECKARDT *et al.*, 2009) de acordo com a TFG do paciente (KDIGO, 2009). No estágio cinco, o paciente entra em falência funcional renal, com TFG <15 mL/min/1,73m², e terá que optar pela terapia renal substitutiva (TRS) (hemodiálise ou diálise peritoneal) ou o transplante renal. (Figura 1).

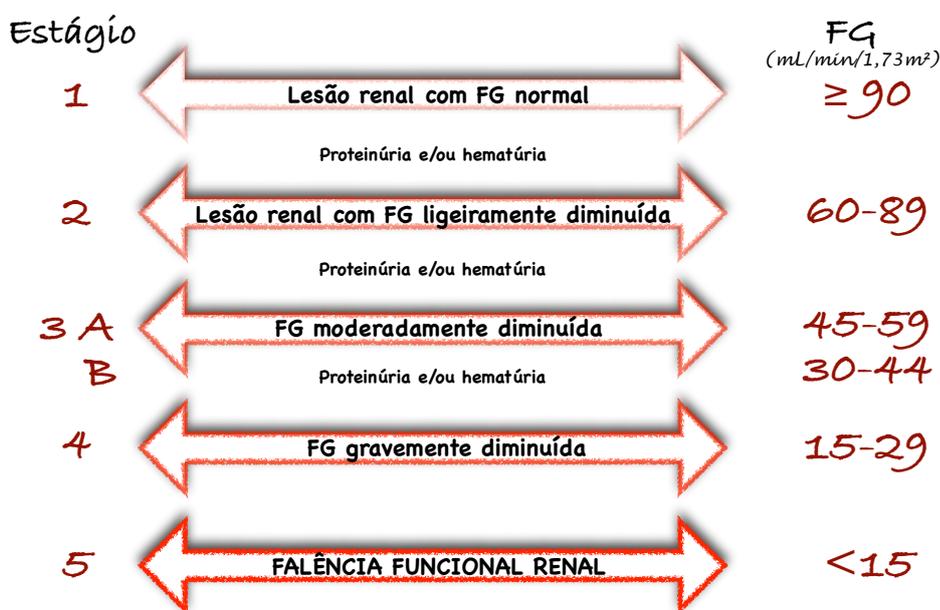


Figura 1: Classificação e estagiamento da DRC de acordo com a taxa de filtração glomerular.

O grupo Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) desenvolveu, uma nova equação que é uma variação da fórmula do MDRD. A equação, denominada de CKD-EPI, usa as mesmas quatro variáveis que a equação do MDRD, mas, comparativamente, apresenta melhor desempenho e previsão de risco. Foram observados menor viés e maior acurácia da equação CKD-EPI relativamente à equação do estudo MDRD, em particular nas faixas de TFG >60 mL/min/1,73 m² (LEVEY *et al.*, 2009).

DRC é hoje considerada um dos mais importantes problemas de Saúde Pública no mundo, e, no Brasil, não é diferente. O censo sobre diálise realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia em 2011 reporta a existência de aproximadamente 92.091 brasileiros em terapia renal substitutiva, além de cerca de 30.000 brasileiros com transplantes renais funcionantes.² Este grande número de pacientes em terapia renal substitutiva (TRS) deve-se, principalmente, ao número crescente de novos pacientes diagnosticados com DRC avançada e que necessitam de tratamento dialítico imediato (incidência), e, de forma menos impactante, ao aumento da sobrevida dos pacientes (prevalência). (SESSO *et al.*, 2011).

Infelizmente, até o momento, ainda não dispomos de dados sobre a prevalência da DRC em pacientes sem necessidade de diálise (DRC pré-dialítica), porém a semelhança da prevalência das principais causas de DRC dialítica (K/DOQI, 2002; FERNANDES *et al.*, 2008) e os fatores de risco para a sua ocorrência (ATLAS CORAÇÕES DO BRASIL, 2005) no nosso meio e nos Estados Unidos (NHANES V), nos faz acreditar ser a doença também prevalente no Brasil.

Sesso e outros (2008) estimaram que existe cerca de 1,960 milhão (ou 1,87%) de brasileiros adultos com filtração glomerular (FG) <60mL/min/1,73m², ou seja, estágios 3, 4 e 5 da DRC. Contudo os autores chamam a atenção para o fato de que, por ser a população brasileira em tratamento dialítico três vezes menor do que a existente nos Estados Unidos, é possível que essas estimativas possam ser até três vezes maiores, considerando que a incidência da DRC e a sobrevida dos nossos pacientes sejam semelhantes às dos americanos.

Em estudo realizado em um banco de dados laboratoriais, foi observado que 9,6% da população adulta ambulatorial de Juiz de Fora apresenta FG <60

mL/min/1,73 m², sendo que, em 0,8%, a FG encontrada foi inferior a 30 mL/min/1,73 m², ou seja, estágios 4 e 5 da DRC (BASTOS *et al.*, 2009). Este percentual corresponde, considerando-se somente a população adulta brasileira, a cerca de um milhão de pacientes com grandes possibilidades de evolução para TRS.

As principais causas de DRC no Brasil são a hipertensão arterial, a doença renal diabética e as glomerulopatias (K/DOQI, 2002; FERNANDES *et al.*, 2008). Existem evidências que embasam uma relação mecânica entre inflamação, aterosclerose e DRC. Biomarcadores inflamatórios elevados, tais como proteína C-reativa (PCR) e interleucina 6 (IL-6), têm sido documentados na DRC (SCHIFFRIN *et al.*, 2007; KOVESDY *et al.*, 2008). Doenças que evidenciam baixo nível de inflamação, como diabetes e hipertensão, associam-se comumente com a DRC. Além do mais, a dislipidemia, comum nestes pacientes, também contribui para a resposta inflamatória e está associada à aterosclerose e DRC. Baixo nível de inflamação aumenta a exposição ao estresse oxidativo via elevação de espécies reativas de oxigênio e reduz os níveis dos antioxidantes.

Pacientes com DRC apresentam inúmeras complicações sistêmicas em consequência do acúmulo de metabólitos urêmicos, desequilíbrio imunológicos e endócrino, que podem contribuir para o surgimento de diversas doenças bucais. Várias mudanças que ocorrem na cavidade bucal estão associadas diretamente à DRC ou à terapia medicamentosa dos pacientes renais crônicos, entre elas: xerostomia; distúrbios do paladar; candidíase oral; estomatite urêmica e hálito urêmico, hiperplasia gengival e periodontite (AKAR *et al.*, 2011).

3) PERIODONTITE

A partir do final da década de 1980, observa-se um número crescente de pesquisas que apontam que a doença periodontal (DP) contribui para uma variedade de doenças sistêmicas agudas e crônicas. Na classificação da Academia Americana de Periodontologia (AAP), de 1999, a DP placa-dependente pode ser dividida em gengivite e periodontite. Esta é uma doença inflamatória que envolve placa bacteriana dentária e fatores genéticos e ambientais, comprometendo os tecidos de suporte dos dentes (SCANNAPIECO *et al.*, 2005). A associação da periodontite com aterosclerose, doença cardíaca e acidente vascular cerebral tem sido amplamente divulgada, contudo outras conexões potencialmente possíveis têm sido observadas, como com o diabetes, complicações obstétricas, doenças respiratórias, doença de Alzheimer, entre outras (SCANNAPIECO *et al.*, 2005). A explicação biologicamente plausível entre a periodontite e as doenças sistêmicas parece estar relacionada à infecção (BASTOS *et al.*, 2011) e à inflamação (VILELA *et al.*, 2011) (Figura 2).



Figura 2: fotos da cavidade bucal dos pacientes incluídos da pesquisa: grupo controle (indivíduo sistemicamente saudável com saúde periodontal); paciente com PC sistemicamente saudável; paciente com DRC no estágio 3B com PC do ambulatório de DRC do Centro HIPERDIA- NIEPEN.

A inflamação periodontal crônica também pode contribuir para a sobrecarga inflamatória sistêmica observada na DRC. É importante observar que níveis elevados de proteína C-reativa (PCR), um marcador de inflamação no sangue, têm sido documentados em pacientes com PC e DRC (STENVINKEL, 2006). Considerando o papel potencial da PC na etiologia da DRC, não é surpresa encontrarmos um número crescente de estudos que sugerem uma associação positiva do processo inflamatório periodontal com a DRC.

A doença infecciosa constitui a segunda principal causa de morte nos pacientes com falência funcional renal, sendo ultrapassada apenas pelas doenças cardiovasculares (US RENAL DATA SYSTEM, 2007). A maior susceptibilidade dos pacientes com DRC estágio 5 às infecções é bem documentada e, provavelmente, está relacionada a mecanismos que envolvem os sistemas de imunidade inata (reconhecimento, fagocitose e digestão de patógenos, indução de inflamação e

apresentação de antígenos) e adaptativa (produção de anticorpos e desenvolvimento de células de memória). (KATO *et al.*, 2008).

Um grande número de evidências científicas comprova a associação entre a PC na forma grave e a DRC (BASTOS *et al.*, 2009; KSHIRSAGAR *et al.*, 2005; FISHER *et al.*, 2008; FISHER *et al.*, 2009; BASTOS *et al.*, 2011; BRITO *et al.*, 2012). Em um estudo realizado utilizando a base de dados do NHANES III, foi avaliada a frequência de PC na forma moderada (profundidade de sondagem (PS >5 mm), nível clínico de inserção (NCI \geq 4mm)) de acordo com a classificação da Academia Americana de Periodontologia (AAP, 1999). Verificou-se uma prevalência de periodontite moderada em 35% dos pacientes com DRC comparados a 15% dos indivíduos sem DRC. Porém, neste estudo, o exame referente aos parâmetros clínicos periodontais foi realizado somente em dois dentes aleatórios representativos de toda a boca, o que poderia subestimar a gravidade da periodontite (IOANNIDOU *et al.*, 2011).

Um estudo brasileiro realizado por Brito e colaboradores (2012) avaliou a gravidade da periodontite, através de mensurações clínicas periodontais nos seis sítios de todos os elementos dentais, em pacientes com DRC pré-dialítica nos estágios 4 e 5 (51 pacientes); em hemodiálise (40 pacientes), diálise peritoneal (40 pacientes), comparados a 67 indivíduos sistemicamente saudáveis. A gravidade da periodontite foi definida pela presença de NCI > 4 mm em mais de 30% dos sítios da boca. A PC na forma mais grave (NCI \geq 6 mm em mais de quatro sítios da boca) foi encontrada em 15,9% dos pacientes na pré-diálise, 10,6% dos pacientes em hemodiálise, quando comparados a 5,8% dos indivíduos sistemicamente saudáveis (BRITO *et al.*, 2012).

Esses dados corroboram com o estudo realizado por Bastos e colaboradores (2011) em que foi observada uma frequência aumentada de periodontopatógenos do complexo vermelho de Socransky: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (analisados pela técnica reação em cadeia da polimerase) e *Candida albicans*, juntamente com a periodontite na forma mais grave da doença em pacientes com PC e DRC quando comparados a indivíduos com PC sistemicamente saudáveis.

Em outro estudo realizado por Artese e colaboradores (2012), foi avaliado o efeito do tratamento periodontal não cirúrgico na microbiota subgengival de pacientes com PC e DRC pré-dialítica (com FG entre 89 e 15 mL/min/1,73m²). A PC foi definida como a presença NCI \geq 4 mm em mais de quatro sítios da boca (sendo em três dentes diferentes). A análise dos patógenos periodontais foi através da técnica "checkerboard DNA-DNA hybridization". Após o tratamento periodontal, foi observado melhora dos parâmetros clínicos periodontais, porém sem redução das espécies bacterianas presentes na microbiota subgengival dos pacientes com DRC.

4) VITAMINA D

A vitamina D apresenta papel destacado no armamentário nefrológico, com os análogos da vitamina D ativada frequentemente empregados no tratamento do hiperparatireoidismo secundário. Dados de estudos realizados ao longo das últimas décadas descortinaram ações biológicas mais amplas da vitamina D, incluindo uma extensa faixa de efeitos em várias vias endócrinas, doenças cardiovasculares e mesmo na progressão da DRC (HOLICK, 2007). Com a introdução dos novos medicamentos para o controle da doença óssea metabólica, estas vias não tradicionais de ação da vitamina D tornar-se-ão cada vez mais importantes quando se considerar o plano de tratamento de certas doenças. Embora o hiperparatireoidismo secundário da DRC seja, no momento, a única indicação formal de tratamento com vitamina D, estudos clínicos bem conduzidos poderão, no futuro, ampliar a indicação do tratamento para outras complicações e ou comorbidades da doença (HOLICK, 2007).

Em condições normais, a vitamina D é produzida a partir do 7-deidrocolesterol na pele exposta à radiação ultravioleta ou absorvida de fontes dietéticas, após o que é convertido pelo fígado em 25-hidroxivitamina D (calcidiol). Esta forma circulante de vitamina D é transportada aos rins, onde é convertida a 1,25 dihidroxivitamina D ($1,25 (OH)_2D_3$) pela enzima 1 alfa-hidroxilase (HOLICK, 2007). A vitamina D ativada ou calcitriol apresenta papel fundamental na regulação do cálcio, atuando em vários sítios (figura 3). No trato gastrointestinal, o calcitriol é capaz de aumentar a absorção de cálcio e fósforo. No osso, a vitamina D ativa estimula a atividade osteoclástica, favorecendo a liberação de cálcio na circulação. No rim, a vitamina D, juntamente com o hormônio da paratireoide, estimula a reabsorção de cálcio no túbulo contornado distal (HOLICK, 2007).

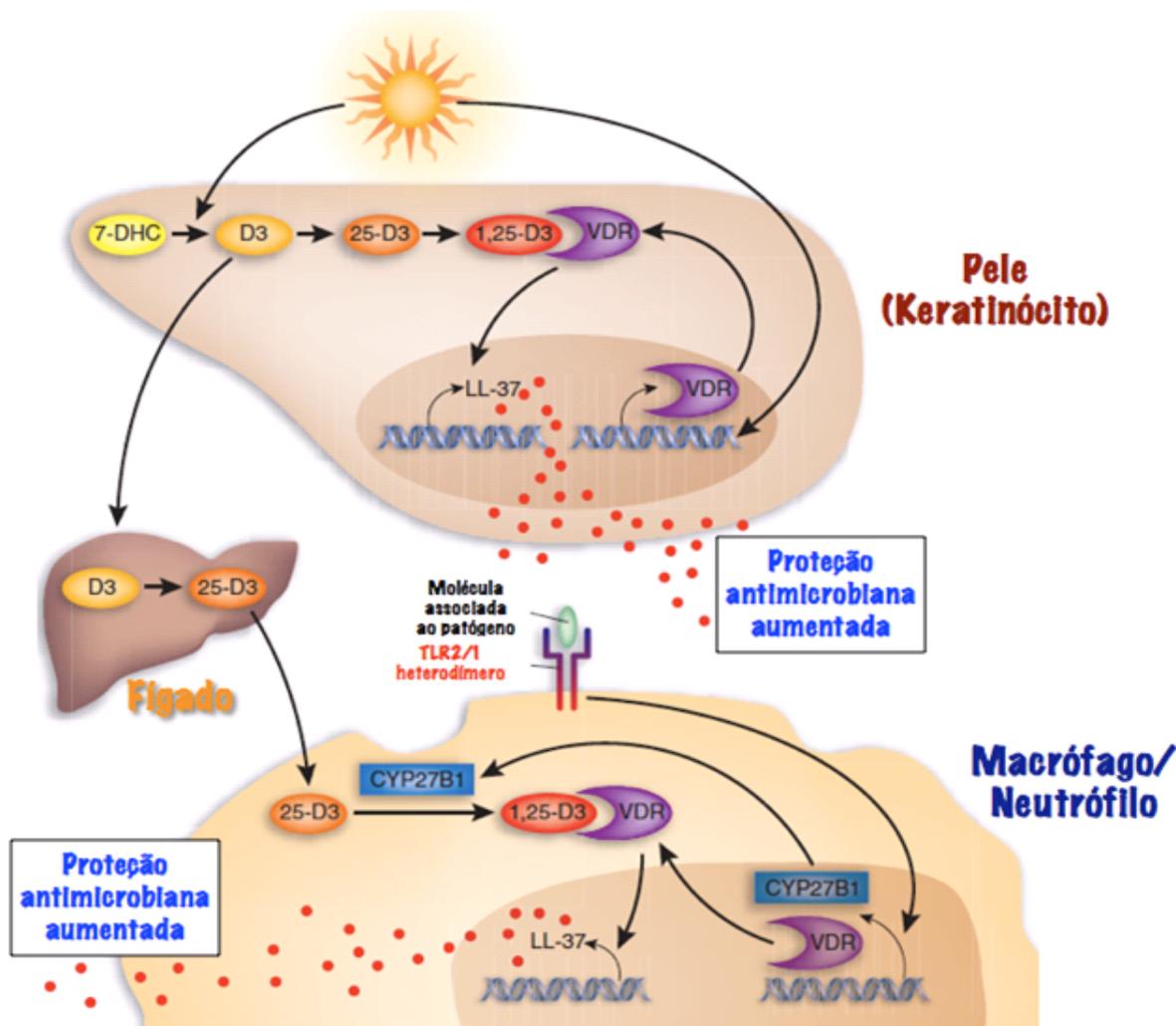


Figura 3: Ilustração da associação entre 25 (OH) D, CYP27B1 (1- α -hidroxilase), Toll-like receptors e LL-37. Adaptado do artigo do ZASLOFF, *et al.*, 2006).

Na DRC, este delicado balanço de regulação da absorção do cálcio pode tornar-se disfuncional. A DRC progressiva se associa com perda da atividade da enzima 1- α hidroxilase e, em decorrência, com diminuição da produção da vitamina D ativa (HOLICK, 2007; LEVIN *et al.*, 2007). Existem vários estudos sobre a ocorrência de hipovitaminose D em pacientes com DRC. Por exemplo, em estudo de corte transversal em diferentes regiões nos Estados Unidos, foi observado que cerca de 86% dos pacientes com DRC no estágio pré-dialítico apresentavam níveis insuficientes de vitamina D (<30 ng/mL) (LACLAIR *et al.*, 2005). No Brasil, os dados sobre hipovitaminose D em pacientes com DRC se resumem ao estudo de Cuppari e outros (2008), que avaliaram 144 pacientes com DRC pré-dialítica (FG média de

37,0±18 mL/min) e observaram que 40% destes apresentavam níveis insuficientes (<30 ng/mL) de vitamina D (CUPPARI *et al.*, 2008).

O impacto desfavorável da deficiência da vitamina D no metabolismo ósseo tem sido o principal foco de atuação clínica do nefrologista ao longo do tempo, contudo o reconhecimento dos efeitos pleitrópicos do calcitriol nas últimas décadas, particularmente na resposta inflamatória, tem despertado o interesse dos nefrologistas para outros potenciais usos da vitamina D.

O papel da vitamina D em modular a resposta imunológica advém de três importantes descobertas: presença do receptor da vitamina D (VDR) em células inflamatórias humanas; a habilidade da 1,25 (OH)₂D₃ de inibir a proliferação de células T; habilidade de macrófagos ativados em produzir 1,25 (OH)₂D₃. (BIKLE, 2008). A mesma enzima responsável pela produção da 1,25 (OH)₂D₃ em macrófagos e células dendríticas está presente nos rins (CYP27B1), também chamada de 1-α hidroxilase. Dessa forma, a vitamina D e a enzima CYP27B1 possuem papéis importantes na resposta imune inata e adquirida (BIKLE, 2008).

Em estudo de Liu *et al.* (2006), foi investigada a expressão gênica dos receptores TLR em monócitos humanos, que, após exposição genética com *Mycobacterium tuberculosis* sintético, ativariam esse receptor. Através de técnicas de identificação genética como microarranjo e reação em cadeia da polimerase, foi identificado o receptor de vitamina D (VDR). Quando o gene para VDR foi acessado, o gene para CYP27B1 estava aumentando, assim como a 1,25 (OH)₂D₃ (a provável explicação seria a conversão da 25 (OH) D em 1,25 (OH)₂D₃ através da enzima 1-alfa hidroxilase (LIU *et al.*, 2006).

O efeito da 1,25 (OH)₂D₃ na resposta imune inata envolve a ativação de Toll-like receptors (TLR), em células polimorfonucleares, monócitos e macrófagos e células epiteliais. A ativação de TLR leva à indução de peptídeos antimicrobianos, entre eles, LL-37 e espécies reativas ao oxigênio, que auxiliam na morte de microrganismos infecciosos (GOMBART *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2004). A expressão da LL-37 é induzida pela 1,25 (OH)₂D₃ em células mieloides e epiteliais. Macrófagos e células epiteliais são capazes de produzir 1,25 (OH)₂D₃ , pois

possuem o receptor VDR e a enzima CYP27B1, responsáveis pela produção de vitamina D.

A periodontite é uma doença inflamatória associada à reabsorção óssea alveolar. Polimorfismos genéticos do VDR podem estar relacionados à homeostase óssea alveolar no periodonto (YAO *et al.*, 2012). A provável explicação biológica para essa perda óssea alveolar seria o fato de que o receptor VDR ativado pela 1,25 (OH)₂D₃ induz a expressão de peptídeos antimicrobianos, como LL-37 em ceratinócitos e macrófagos. A ativação de receptores de células denominados Toll aumentaria ainda mais a expressão de VDR e CYP27B1 nessas células.

Níveis diminuídos da 25 (OH)D em negros americanos estão relacionados à produção insuficiente de LL-37 e ao aumento da susceptibilidade desses indivíduos a infecções. A LL-37 apresenta atividade contra bactérias periodontopatogênicas como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* e o fungo *Candida albicans*. (AMANO *et al.*, 2009; STEIN *et al.*, 2011).

Estudos clínicos relatam o benefício da ingestão de vitamina D (apesar de não existir ainda um consenso sobre a dosagem) na melhora de parâmetros clínicos periodontais, tais como: profundidade de sondagem e nível clínico de inserção (MILEY *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010; DIETRICH *et al.*, 2004).

Liu e colaboradores (2009) avaliaram 66 pacientes com periodontite agressiva (PA) e 52 pacientes com PC comparados a indivíduos saudáveis. Pacientes com PA apresentaram maiores níveis plasmáticos da 25 (OH)D, e foi encontrada correlação com sangramento à sondagem (IC=0,321; p<0,05) e piores parâmetros clínicos periodontais, o que poderia sugerir a associação da vitamina D com inflamação periodontal (LIU *et al.*, 2009). Esse mesmo grupo avaliou a influência do tratamento periodontal convencional nos níveis plasmáticos e no fluido gengival da 25 (OH)D. Em relação aos níveis da vitamina D no fluido gengival, o tratamento periodontal contribuiu para diminuição da 25 (OH)D nos dois primeiros meses, juntamente com a diminuição dos marcadores inflamatórios em nível local (IL-6 e IL-1β) e melhora nos parâmetros clínicos periodontais, reafirmando a influência da 25 (OH)D na inflamação periodontal. (LIU *et al.*, 2010).

Em outro estudo envolvendo 51 pacientes com PC divididos em dois grupos: que faziam (23 pacientes) ou não (28 pacientes) uso de suplementação de vitamina D, acompanhados durante 12 meses. Em relação a todos os parâmetros clínicos avaliados (PS, NCI, SS, IP), os autores concluíram que a suplementação de vitamina D₃ (≥ 800 UI/dia) foi suficiente para reduzir a gravidade da PC. (GARCIA *et al.*, 2011).

Em suma, a vitamina D não está relacionada somente à homeostase óssea, mas também à regulação da resposta imune inata e adquirida. Já se sabe que existe associação entre níveis baixos de vitamina D em pacientes com DRC, o que poderia explicar o fato desses indivíduos serem mais susceptíveis à infecção, inclusive periodontal.

5) CATELICIDINAS

As catelicidinas (LL-37) pertencem à família de peptídeos antimicrobianos que constituem uma importante parte do sistema imune inato na maioria dos organismos multicelulares (ZASLOFF, 2006(a)). Enquanto mamíferos expressam diversos tipos de catelicidinas, humanos processam um único gene para LL-37, chamado *CAMP*. (GOMBART *et al.*, 2009). Os peptídeos antimicrobianos são produzidos por neutrófilos, e um deles, a proteína antimicrobiana catiônica humana de 18 kDa (hCAP18), é o único descrito em seres humanos. A hCAP18 é armazenada em grânulos secundários de neutrófilos em forma precursora inativa. Após estimulação dos neutrófilos, o hCAP18 é liberado e chamado catelicidina, na sua forma ativa. A LL-37 é um peptídeo composto por 37 aminoácidos encontrado na localização C-terminal da proteína 18 (hCAP-18) da proteína catiônica humana (LARRICK *et al.*, 1995; GUDMUNDSSON *et al.*, 1996) (Figura 4).

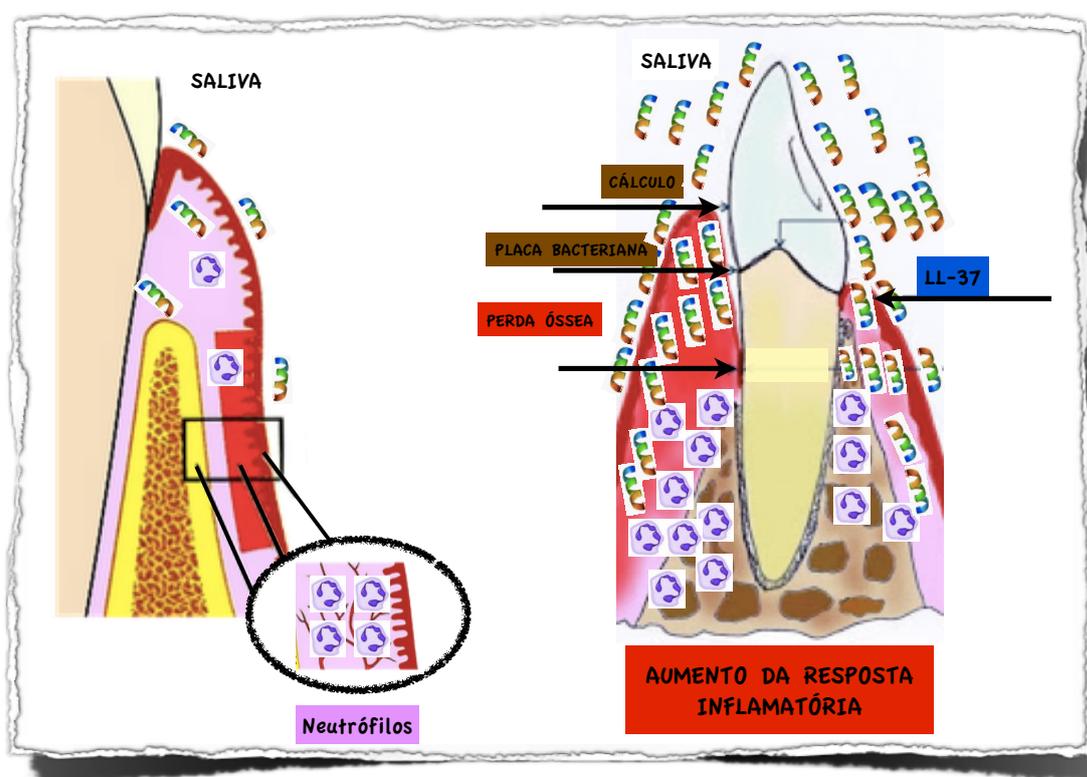


Figura 4: Ilustração da distribuição de LL-37 no periodonto. Adaptado do artigo: DALE *et al.*, 2005.

A LL-37 é liberada a partir do hCAP18 através do processo de proteólise pela proteinase 3. O peptídeo antimicrobiano LL-37, a forma ativa da catelicidina, é um antibiótico endógeno que possui amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo capaz de rapidamente destruir bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e também apresenta alguma atividade de supressão contra vírus e fungos, como *Candida albicans* (SORENSEN *et al.*, 1997; GANZ, 2002; ZASLOFF, 2002; ZASLOFF, 2006(b)). O LL-37 apresenta propriedades de quimioatração para neutrófilos, monócitos, mastócitos, células T e é também expresso nas células epiteliais. Além de regular as respostas inflamatórias e imunes, o LL-37 acelera a angiogênese, promove a cicatrização de feridas e neutraliza lipopolissacarídeos.

A catelicidina é também produzida por células epiteliais e ceratinócitos, como hCAP-18, na sua forma precursora, e é liberada como LL-37 em diversos fluidos tissulares do nosso organismo, incluindo o fluido gástrico, saliva, sêmen, plasma, fluidos das vias aéreas e o colostro na fase da amamentação (MURAKAMI *et al.*, 2002 (a); MURAKAMI *et al.*, 2002 (b); IIMURA *et al.*, 2005; PHADKE *et al.*, 2005).

No periodonto, a LL-37 está localizada na gengiva marginal, onde apresenta contato contínuo com a placa supragengival. Também está presente em grande quantidade nos neutrófilos, que, frente à placa bacteriana, migram através do epitélio juncional para o sulco gengival. (Dale *et al.*, 2001 (a); Dale *et al.*, 2001 (b); McKay *et al.*, 1999) (Figura 4).

Estudos em animais demonstraram que a produção diminuída de LL-37 associa-se à redução da capacidade de controlar infecção, enquanto que camundongos transgênicos com expressão aumentada de hCAP18 são protegidos contra morte por sepse (BALS *et al.*, 1999; NIZET *et al.*, 2001). O gene humano que codifica o hCAP18 é regulado, a nível transcricional, pelo receptor de vitamina D (VDR) (WANG *et al.*, 2004; GOMBART *et al.*, 2005; MARTINEAU *et al.*, 2007). *In vitro*, a administração de compostos de vitamina D ativada é capaz de aumentar a produção de hCAP18 em grande número de tecidos humanos (WANG *et al.*, 2004; GOMBART *et al.*, 2007; YIM *et al.*, 2007).

Receptores de superfície celular, TLR, podem detectar componentes microbianos e disparar uma resposta imune na presença de infecção. Liu e outros

(2006) mostraram que a estimulação do ligante para TLR em macrófagos cultivados *in vitro* resultou em aumento intracelular de 1-alfa hidroxilase e VDR. A geração ampliada de calcitriol e seu receptor aumenta a síntese de hCAP18 e melhora a ação antimicrobiana (LIU *et al.*, 2006). O mecanismo da ação antimicrobiana da catelicidina envolve a ruptura de membrana celular dos microrganismos, ligação a resíduos de lipopolissacarídeos (LPS) e recrutamento de leucócitos (TURNER *et al.*, 1998; ZASLOFF, 2002; WANG *et al.*, 2004; GOMBART *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2006; ZASLOFF, 2006 (b); GOMBART *et al.*, 2007; MARTINEAU *et al.*, 2007).

Como mencionado anteriormente, tem sido descrito que TLRs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), dentre elas o LPS de bactérias gram-negativas, que é um componente da estrutura celular de bactérias periodontopatogênicas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*. Esses patógenos têm demonstrado relação com TLR2 e TLR4, sugerindo um papel potencial desses receptores na periodontite crônica (ASAI *et al.*, 2001; HIRSCHFELD *et al.*, 2001; YOSHIMURA *et al.*, 2002; MOCHIZUKI *et al.*, 2004).

Num estudo realizado por Sun e outros (2010), foram avaliados 43 chineses, destes, 24 pacientes com PC e 19 indivíduos controles saudáveis. A presença de mRNA de TLR2 e 4 no tecido gengival foi avaliada através da técnica de biologia molecular PCR em tempo real. Pacientes com PC apresentaram frequência aumentada de TLR2 e 4 quando comparados aos controles (60,46% vs 6,17% e 49,45% vs 2,93%, $p < 0,05$) (SUN *et al.* 2010).

Embora existam poucos estudos que tratem de hCAP18 em seres humanos, Gombart e outros (2009) observaram que pacientes em falência funcional renal e tratados com hemodiálise que exibiam níveis sanguíneos diminuídos de hCAP18 apresentavam risco aumentado de morte por causas infecciosas (GOMBART *et al.*, 2009). No estudo, os autores comparam pacientes que faleceram de causa infecciosa no primeiro ano de diálise com controles que sobreviveram. Os pacientes com níveis de hCAP18 no tercil mais baixo apresentaram risco aumentado em duas vezes (razão de chance, 2,1; intervalo de confiança 95%, 1,2-3,5) de óbito atribuído a infecção; após ajustes em análise multivariada, esta relação se manteve

estatisticamente diferente (razão de chance, 3,7; intervalo de confiança 95%, 1,2-11,2) (GOMBART *et al.*, 2009).

A LL-37 tem sido implicada na imunopatogênese de várias doenças, assim como a periodontite grave se associa com doenças sistêmicas. Um exemplo da importância da LL-37 na resposta imune inata na periodontite é a observação da susceptibilidade aumentada dos pacientes com Síndrome de Kostmann, caracterizada por neutropenia congênita grave e ausência de LL-37 na saliva (PUTSEP *et al.*, 2002). No caso da periodontite crônica, existe um número limitado de estudos em que se investigou o papel da LL-37 na DP.

Em estudo anterior, Putsep e outros (2002) investigaram, através da técnica de "Western blot", a presença de LL-37 na saliva de pacientes com DP e observaram que os níveis de LL-37 encontravam-se mais elevados nos pacientes com periodontite crônica do que nos controles.

A doença associada à deficiência na produção de LL-37 é a Síndrome de Papillon-Lefèvre, que dificulta a lise de bactérias periodontopatogênicas, dentre elas o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, levando à progressão de periodontite. (DE HAAR *et al.*, 2004; DE HAAR *et al.*, 2006).

A LL-37 possui como função a neutralização da atividade de LPS presente em bactérias gram-negativas do periodonto. A grande afinidade da LL-37 por LPS previne a ligação deste a receptores TLR de células hospedeiras, suprimindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , prevenindo endotoxemia (INOMATA *et al.*, 2010; MOOKHERJEE *et al.*, 2006) (Figura 5).

Adicionalmente, LL-37 e hCAP-18 também possuem como funções: suprimir a apoptose (NAGAOKA *et al.*, 2006; BARLOW *et al.*, 2006), ativar a quimiotaxia de monócitos e células T, e promover a liberação de peptídeos antimicrobianos em neutrófilos (ZHENG *et al.*, 2007; DE YANG *et al.*, 2000) e auxiliar na cicatrização de feridas, promovendo angiogênese. (KOCZULLA *et al.*, 2003.).

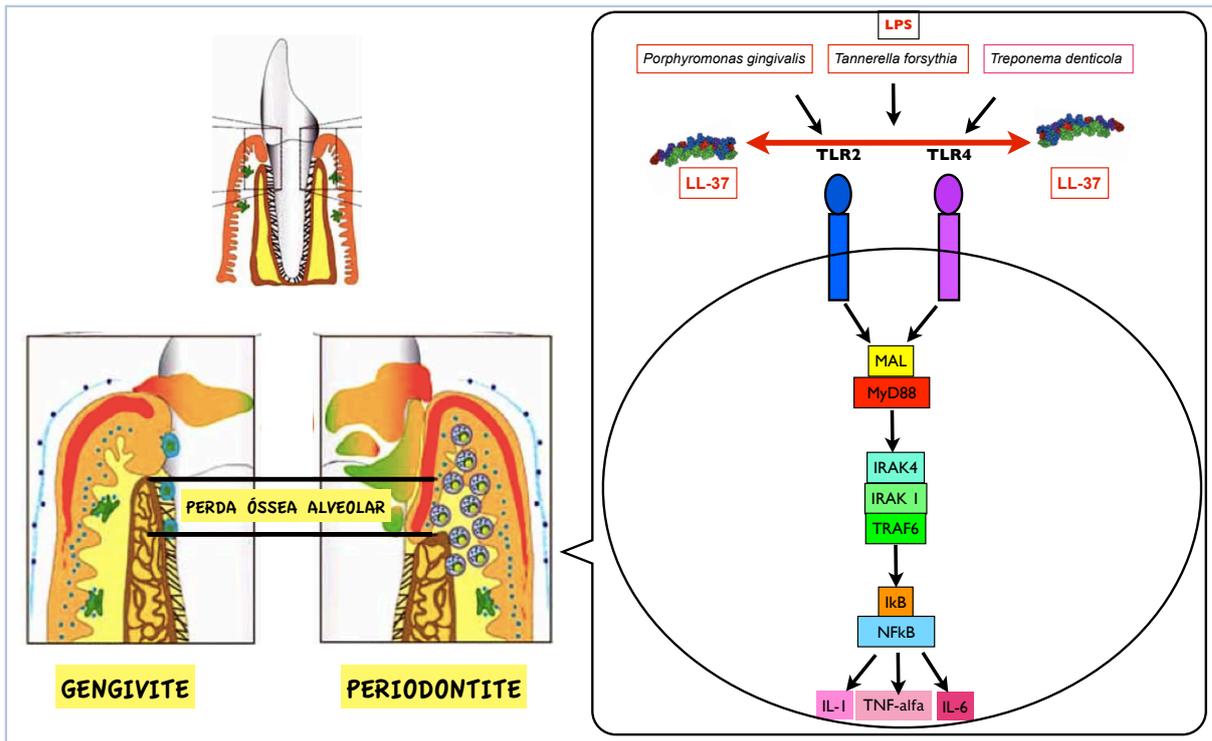


Figura 5: Representação da interação entre lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias periodontopatogênicas, catelicidina (LL-37) e toll-like receptors (TLR 2 e 4): proteína adaptadora (MAL); proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88); cinase 4 (IRAK4); cinase 1 (IRAK 1); fator 6 (TRAF 6); IκB (proteína inibidora) NFκB (fator de transcrição); IL-1 . Adaptado do artigo CARPENTER *et al.*, 2007.

Níveis salivares insuficientes de LL-37 possuem correlação positiva com a destruição periodontal em pacientes com PC, representada pelo nível clínico de inserção ($NCI \geq 5\text{mm}$) ($P < 0,01$, $\rho = 0,40$) (TAKEUCHI *et al.*, 2012.). Sendo assim, a LL-37 possui papel importante na homeostase do periodonto e a deficiência desse peptídeo é considerada um fator de risco para a periodontite.

De forma interessante, Puklo e colaboradores (2008) investigaram níveis de LL-37 no fluido gengival, através da técnica de "Western blot", em pacientes com PC que apresentaram níveis elevados desse peptídeo antimicrobiano quando comparados a indivíduos saudáveis. Foi encontrada correlação positiva entre LL-37 e a presença de bactérias do complexo vermelho de Socransky: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (OR 0,405; 0,484; 0,525; $p < 0,05$), respectivamente (PUKLO *et al.*, 2008).

De forma semelhante, em estudo envolvendo níveis de LL-37 no fluido gengival, através da técnica de ELISA, em pacientes com PC e indivíduos

saudáveis, a LL-37 estava aumentada nos pacientes com PC e foi demonstrado correlação positiva com parâmetros clínicos periodontais PS, NCI, IP, SS (0,431; 0,405; 0,509; 0,371; $p < 0,05$), respectivamente (TURKOGLU *et al.*, 2009). A possível explicação para esse fato é de que bactérias periodontopatogênicas presentes na placa dental subgingival estimulam respostas inflamatórias e imunológicas durante a progressão da periodontite. Após estimulação, a migração de neutrófilos é estimulada em direção à bolsa periodontal, ampliando a liberação de LL-37 pelos neutrófilos. Porém, neste estudo, níveis aumentados de LL-37 em pacientes com PC não foram suficientes para prevenir a progressão da destruição periodontal (TURKOGLU *et al.*, 2009).

Está bem estabelecido que a destruição tissular no hospedeiro depende do balanço entre mecanismos protetores e destruidores. As citocinas apresentam várias ações na mediação do processo inflamatório, uma delas ativando neutrófilos a secretarem LL-37, o qual, como mencionado, é parte da resposta imune inata. Os peptídeos antimicrobianos são atores importantes na manutenção do balanço entre saúde e doença. A hipovitaminose D, comum entre os pacientes com DRC, ao determinar deficiência de hCAP18 (forma inativa da LL-37), identificaria pacientes com risco aumentado para desenvolver periodontite.

Nesse contexto, alguns autores tentam explicar a associação biológica entre níveis circulantes de $1,25(\text{OH})_2$ vit.D da seguinte forma: a conversão da 25(OH) vit.D para a $1,25(\text{OH})_2$ vit.D pela enzima $1-\alpha$ hidroxilase, ou CYP27B1 também pode ocorrer em ceratinócitos e monócitos mediados por receptores TLR. Adicionalmente, na presença de infecção ou ferida, a ativação desses receptores Toll resultaria na expressão da enzima CYP27B1, causando a conversão da 25(OH)D em $1,25(\text{OH})_2$ D, com consequente liberação da LL-37. (HATA *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2006).

Alguns estudos mostram que a administração via oral de colecalciferol ou vitamina D₃ é capaz de aumentar os níveis sistêmicos de 25(OH)D e de LL-37 (HATA *et al.*, 2008; BHAN *et al.*, 2011).

TLR 2 e 4 são capazes de reconhecer diversos microrganismos, entre eles, LPS de bactérias gram-negativas e *Candida albicans*. Esse reconhecimento

desencadeia uma sinalização enzimática mediada pela proteína adaptadora MyD88 e a ativação do fator de transcrição NF κ B, que regula a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 (CARPENTER *et al.*, 2007).

Em um modelo sugerido por Mookherjee e colaboradores (2006), assim que ocorre a liberação de LL-37 por monócitos e neutrófilos, esse peptídeo teria a capacidade neutralizar LPS de bactérias gram-negativas, evitando a sua ligação com os receptores para TLR 2 e 4, com isso, evitando também a cascata enzimática intracelular, como diminuição da produção de mediadores inflamatórios (MOOKHERJEE *et al.*, 2006). Porém, mais estudos envolvendo vitamina D, LL-37 e Toll são necessários para comprovação dessa teoria.

Portanto, os dados disponíveis na literatura apontam para o papel da vitamina D e sua interação com LL-37 na defesa imune inata contra patógenos periodontais. Assim, no presente estudo, nossa hipótese é que a vitamina D e LL-37, em pacientes com DRC pré-dialítica, encontram-se diminuídas em comparação com indivíduos saudáveis. Esse fato poderia explicar a maior gravidade e frequência de PC na população com DRC.

6) OBJETIVO

Investigar em pacientes com DRC se a ocorrência de hipovitaminose D se associa com deficiência de LL-37 e a periodontite crônica grave.

7) MATERIAL e MÉTODOS

7.1 Pacientes

Entre novembro de 2009 e agosto de 2012, foram convidados a participar deste estudo 623 indivíduos distribuídos nos ambulatórios de DRC do Centro HIPERDIA (NIEPEN), Nefrogeral (HU/CAS da UFJF) e do ambulatório do Serviço de Controle da Hipertensão, Diabetes e Obesidade (SCHDO/ Pam- Marechal); Do total de 623 participantes inicialmente avaliados, 563 não foram incluídos pelas seguintes razões: 1) 252 apresentavam TFG >60 mL/min/1,73 m²; 2) 139 não compareceram para a avaliação periodontal e coleta de sangue; 3) 108 eram edêntulos totais; 4) 48 eram tabagistas ativos; 5) 16 não assinaram o TCLE;

Trata-se de um estudo transversal comparativo constituído de quatro grupos: Grupo 1, 15 indivíduos sistemicamente saudáveis (SS) e sem PC (SS/PC-); Grupo 2, 15 pacientes SS e com PC (SS/PC+); Grupo 3, 15 pacientes com DRC e sem PC (DRC/PC-), e o Grupo 4 composto de 15 pacientes com DRC e PC (DRC/PC+), totalizando sessenta participantes (Figura 6):

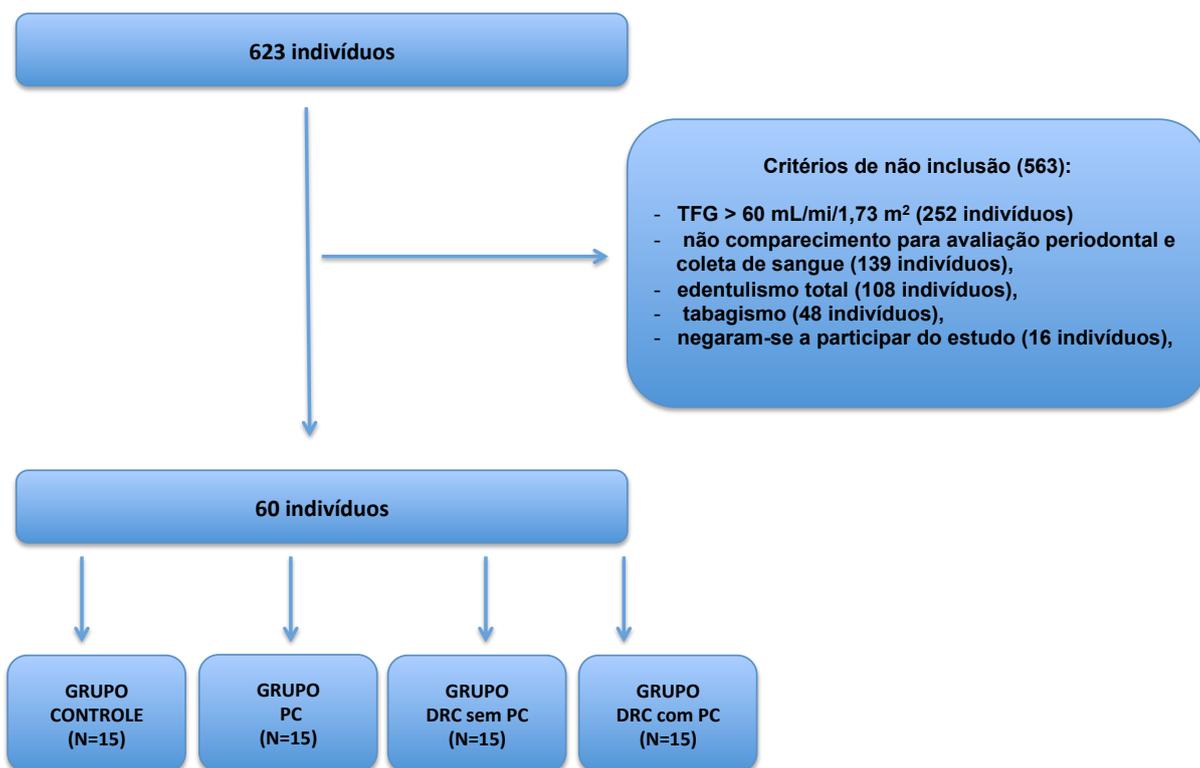


Figura 6: Triagem dos indivíduos da pesquisa

Os indivíduos do grupo controle foram aqueles que concordaram em participar da pesquisa e se enquadraram nos critérios de inclusão. Foram selecionados na Especialização em Implantodontia da Associação Brasileira de Odontologia (ABO) seção Juiz de Fora. Os pacientes com periodontite crônica grave foram triados na Clínica de Periodontia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Os pacientes com DRC dos grupos DRC sem PC e com PC foram triados no ambulatório do Programa HIPERDIA e PrevenRim do Núcleo Interdisciplinar de Estudos, Pesquisas e Tratamento em Nefrologia (NIEPEN), da Nefrogeral do Hospital Universitário da UFJF e do Serviço de Controle de Hipertensos, Diabéticos e Obesos (SCHIDO) no PAM MARECHAL-Juiz de Fora- MG . Todos os pacientes selecionados se enquadraram nos critérios de inclusão do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Não foram incluídos os pacientes tabagistas, aqueles em uso de anti-inflamatórios e antibióticos nos últimos três meses, grávidas, com diagnóstico de

câncer, os portadores do vírus HIV, os diabéticos não compensados, os portadores de outras infecções ou com quadro de febre de origem indeterminada, os tratados para periodontite nos últimos seis meses, com doenças periodontais agressivas ou agudas ou então gengivites e doenças periodontais leves.

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-HU/CAS) da Universidade Federal de Juiz de Fora. Parecer nº 0130/2009; folha de rosto: 290100; CAAE: 0107.0.420.000-09.

7.2 Exame médico e odontológico.

O diagnóstico e o estagiamento da DRC seguiram os critérios propostos pela National Kidney Foundation americana (K/DOQI, 2002). A filtração glomerular foi estimada a partir da dosagem de creatinina sérica, utilizando a equação do CKD-EPI (LEVEY et al., 2009). A proteinúria foi quantificada em amostras urinárias de 24 horas.

Foram avaliadas várias covariáveis, incluindo idade, gênero, raça (negro ou branco), etiologia da DRC, índice de massa corporal, pressão arterial sistólica e diastólica (sentado, deitado e em pé), frequência cardíaca, exame físico, história da doença atual e familiar, doença de base, comorbidades, medicamentos em uso .

Para calibrar as duas examinadoras do estudo com a sonda computadorizada (*Florida Probe Corp., USA*), foram selecionados dez pacientes com DRC pré-dialítica e PC de forma aleatória apresentando pelo menos dois sítios de dente com $PS \geq 5$ mm, previamente mensurada com sonda milimetrada manual (*PQ-W, Hu Friedy manufacturing Inc., Chicago. IL, USA*), totalizando 630 sítios. Cada examinador mensurou a profundidade da bolsa periodontal em duas ocasiões, dentro de um intervalo de 1 hora no mesmo dia. Um paciente foi selecionado para a avaliação interexaminador em duas ocasiões com intervalo de 1 hora. A habilidade do profissional foi testada através de coeficiente de correlação através do teste

estatístico Kappa. O coeficiente intraexaminador foi de 0,84 e o interexaminador foi de 0,82.

O exame periodontal foi conduzido por duas examinadoras devidamente qualificadas. Todos os dentes, exceto terceiros molares, foram examinados. A PS e a recessão gengival foram mensuradas nos seis sítios por dente (mésiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), utilizando sonda computadorizada (*Florida Probe Corp., USA*). As mensurações foram realizadas em milímetros. O nível clínico de inserção (NCI) foi calculado através da distância da junção cimento-esmalte até o fundo da bolsa periodontal. O número de sítios com placa bacteriana foi mensurado pela presença ou ausência de placa dental supragengival nos três sítios da face vestibular e um sítio do dente por lingual de acordo com o software (*Florida Probe Corp., USA*), assim como o número de sítios com sangramento à sondagem (SS).

Os exames clínicos periodontais foram realizados focando a presença de placa dental associada à destruição do tecido periodontal para distinguir a periodontite crônica da forma agressiva. Radiografias digitais foram realizadas para determinação de perda óssea e exclusão de dentes com lesões periapicais.

A periodontite crônica moderada a grave foi definida naqueles que apresentaram NCI \geq 6mm em dois ou mais dentes e PS \geq 5mm em um ou mais sítios do dente de acordo com a classificação da Academia Americana de Periodontologia (1999) e a metodologia proposta por Armitage e outros (2004).

As amostras do FCG foram coletadas após a avaliação médica e odontológica. As amostras foram coletadas da face vestibular do dente, na região mesial ou distal no sítio interproximal. O FCG foi coletado em dois dentes, em um único sítio de cada dente, representativos da boca, apresentando PS \geq 5mm e NCI \geq 6mm naqueles pacientes com periodontite crônica. No grupo controle, as amostras foram coletadas em dois dentes, em um único sítio do cada dente, apresentando PS < 3mm sem presença de sangramento à sondagem (TURKOGLU et al., 2009). A placa dental supragengival foi removida da superfície interproximal com auxílio de cureta McCall estéril (Trinity Corp., Brasil).

Posteriormente, as superfícies foram secas através de seringa tríplice e isoladas com gaze estéril antes da coleta do FCG. As amostras do FCG foram coletadas através de filtros de papel (*Periopapers, Pro Flow, USA*). As tiras de papel foram cuidadosamente inseridas a 1 mm dentro do sulco gengival e deixadas no local por 30 segundos, e as contaminadas por sangue foram descartadas. O volume do FCG absorvido pela tira de papel foi determinado através de um aparelho eletrônico (*Periotron 8000, Oraflow, USA*), e a tira de papel foi armazenada em um criotubo em freezer a -80°C até a análise do material (TURKOGU et al., 2009). O valor determinado foi transformado em unidade de volume (µL) com o auxílio de um programa específico para esse fim (Periotron Professional - Oraflow Inc.).

7.3 Avaliação laboratorial

Foram analisados hemograma completo e dosagens séricas de creatinina, triglicérides, albumina, colesterol total, HDL, proteínas totais e frações, cálcio, fósforo, hemoglobina glicosilada, paratormônio molécula inteira dos pacientes.

A proteína C-reativa ultrasensível foi analisada através da técnica de imunoturbidimetria. As partículas de látex recobertas com anticorpos anti-PCR humana foram aglutinadas PCR presentes na amostra. O processo de aglutinação provoca acréscimo na absorbância proporcional à concentração de PCR da amostra do paciente que é quantificada pela comparação com um calibrador de PCR de concentração conhecida medida em 546 nm (Biotécnica Ind.com.ltda©, 2012). A 25 (OH) vitamina D foi analisada através da técnica por quimioluminescência (ARCHITECT and Chemiflex, Abbot Laboratories ©, 2012).

A determinação do nível de LL-37 e IL-6 foi realizada em amostras de plasma e no FCG. Amostras do FCG foram coletadas utilizando *periopapers (Periopapers, Pro Flow, USA)*. Depois de armazenada e congelada em freezer a -80°C, a tira de papel foi removida do *ependorf* e foi cortado o marcador laranja com tesoura estéril.

O peripaper somente com material biológico foi imediatamente inserido em outro tubo eppendorf estéril contendo 300 µl de tampão de extração (PBS + 0,05% de Tween 20 (GAMONAL *et al.*, 2000))

Após a colocação do tampão, o "eppendorf" foi deixado em agitador horizontal por 1 hora em gelo e passado duas vezes no vortex durante este período. O fluido adsorvido foi eluído das pontas de papel por vigorosa agitação com vortex e então extraído por centrifugação a 13.000g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado e analisado pela técnica de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) utilizado o kit para LL-37 (Hbt Human LL-37, Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands©) (TURKOGLU *et al.*, 2009) e IL-6 (Human IL-6 ELISA Set, BD OptEIA, San Diego, CA).

Os reagentes dos kits para LL-37 e IL-6 citados acima, foram deixados à temperatura ambiente e a seguir foi adicionado o anticorpo monoclonal anti- IL-6 e deixado por duas horas; sendo que no caso do kit para LL-37, o anticorpo monoclonal específico contra o peptídeo a ser quantificado, já estava aderido à placa.

Os padrões e amostras foram então adicionados aos poços, permitindo a ligação do peptídeo e da citocina ao anticorpo imobilizado. Após um período de incubação de uma hora para a LL-37 e de duas horas para IL-6, as placas foram lavadas com solução tampão fornecida pelo fabricante. A seguir um segundo anticorpo policlonal específico contra o peptídeo LL-37 conjugado a uma enzima (Streptavidina-peroxidase) foi adicionado e, para a citocina IL-6, foi utilizado a enzima Streptavidina-horseradish peroxidase conjugado .

A placa foi novamente incubada e lavada em seguida. Foi adicionado então o substrato (TMB), que inicia a reação colorimétrica, seguido de incubação e adição de solução amplificadora da reação colorimétrica. O desenvolvimento e a intensidade da cor foram quantificados utilizando um leitor de placas para ELISA, com absorvância em 450 nm (Biotek Elx800©, 2012). A curva padrão feita com os padrões fornecidos nos kits serviu como parâmetro para a determinação das

concentrações das proteínas. Os resultados foram expressos em ng/mL para LL-37 e pg/mL para IL-6.

8) ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho mínimo da amostra para o teste ANOVA de um fator com um poder do teste de 0,8, $\alpha=0,05$ e "effect size" = 0,31 que corresponde a diferença para a média do nível sérico de LL-37 por grupo. Foram totalizados quatro grupos de 120 elementos (ou seja, 30 pacientes para cada grupo).

No primeiro artigo:

Os dados foram coletados e processados utilizando-se o programa SPSS, versão 15.0 (*Chicago, IL, USA*). Os resultados foram representados pela mediana e valores (mínimo e máximo) para as variáveis numéricas, e frequências absoluta e relativa para as variáveis categóricas. Para comparação das variáveis entre os grupos foram aplicados os testes de Mann-Whitney para as variáveis numéricas e qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher (quando as frequências esperadas foram menores que 5) para variáveis categóricas. A diferença estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

No segundo artigo:

Os dados foram coletados e processados utilizando-se o programa SPSS, versão 15.0 (*Chicago, IL, USA*). Os resultados foram representados pela mediana e valores (mínimo e máximo) ou média \pm desvio-padrão (DP) para as variáveis numéricas, e frequências absoluta e relativa para as variáveis categóricas. Para comparação das variáveis entre os grupos quanto aos parâmetros clínico-demográficos, laboratoriais e periodontais, foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis para as variáveis numéricas com comportamento normal, e qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher (quando as frequências esperadas foram menores que cinco) para variáveis categóricas.

Na comparação entre os grupos PC com e sem DRC, foi aplicado o Teste-t. Na comparação dos níveis séricos de 25(OH)D e LL-37 e IL-6 no plasma entre os grupos, foi realizado o teste ANOVA, sendo que a diferença entre os grupos foi apontada pelo teste Post Hoc Bonferroni. A diferença estatística foi considerada significativa para valores de $p < 0,05$.

9) RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados na forma de dois artigos científicos, um artigo já publicado no Jornal Brasileiro de Nefrologia intitulado “**Níveis séricos de vitamina D e periodontite crônica em pacientes com doença renal crônica**” e outro artigo que será submetido ao Journal of Clinical Periodontology intitulado “**Low levels of vitamin D and LL-37 in patients with CKD: association with chronic periodontitis.**”

Além disso, o presente estudo originou:

- Resumos de trabalhos apresentados em congressos na modalidade pôster e sob apresentação oral (APÊNDICES 1, 2).
- Resumo publicado na revista American Journal of Kidney diseases: Am J Kidney Dis. 2013;61(4):A1-A100. (APÊNDICE 3)

ARTIGO 1: Apresentação do artigo publicado no Jornal Brasileiro de Nefrologia na modalidade Artigo Original

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

Níveis séricos de vitamina D e periodontite crônica em pacientes com doença renal crônica

Serum levels of vitamin D and chronic periodontitis in patients with chronic kidney disease

Autores

Jessica do Amaral Bastos¹
Luiz Carlos Ferreira de Andrade²
Ana Paula Ferreira³
Erica de Almeida Barroso⁴
Patrícia de Castro Daibert⁴
Patrícia Lima de Sá Barreto⁴
Eduardo Machado Vilela⁴
Andrea Marcia Marcaccini⁵
Fernando Antonio Basile Colugnati⁶
Marcus Gomes Bastos⁷

¹ Núcleo Interdisciplinar de Estudos, Pesquisas e Tratamento em Nefrologia (NIEPEN).

² Departamento de Clínica Médica da FAMED/UFJF. Núcleo Interdisciplinar de Estudos, Pesquisas e Tratamento em Nefrologia (NIEPEN). PPGS/FAMED/UFJF. HU/UFJF.

³ Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF.

⁴ Faculdade de Odontologia da UFJF.

⁵ Universidade de São Paulo - USP.

⁶ Departamento de Clínica Médica da UFJF. Núcleo Interdisciplinar de Estudos, Pesquisas e Tratamento em Nefrologia (NIEPEN) da UFJF.

⁷ Universidade Federal de São Paulo. Núcleo Interdisciplinar de Estudos, Pesquisas e Tratamento em Nefrologia (NIEPEN).

Data de submissão: 04/12/2012.
Data de aprovação: 05/02/2013.

Correspondência para:

Jessica do Amaral Bastos.
Fundação e Instituto de Pesquisas em Nefrologia - Fundação IMEPEN.
Avenida José Lourenço Kelmer, nº 1300/204-222, São Pedro, Juiz de Fora, MG, Brasil. CEP: 36036-330
E-mail: jessicabastos7@gmail.com
Fundação IMEPEN e Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora.

DOI: 10.5935/01012800.20130004

RESUMO

Introdução: A concomitância de periodontite crônica (PC) em pacientes com doença renal crônica (DRC) tem sido associada a desfechos adversos. A deficiência de vitamina D (25(OH)D) parece desempenhar papel importante na PC e níveis inadequados de vitamina D têm sido descritos em pacientes com DRC. **Objetivo:** Examinar a relação entre níveis séricos de vitamina D e PC em pacientes com DRC pré-dialítica. **Método:** Estudo de caso-controle, definidos, respectivamente, como pacientes com DRC e PC e DRC sem PC. Os dados demográficos, de exame físico e laboratoriais foram obtidos no dia da consulta. A DRC foi definida e estagiada segundo a NKF QDOKI™. Os níveis séricos de 25(OH)D foram dosados por quimioluminescência quando da avaliação da PC, a qual foi caracterizada segundo os critérios de Academia Americana de Periodontologia (1999). Os resultados de 25(OH)D foram estratificados em deficiência (≤ 14 ng/mL), insuficiência (15-29 ng/mL) e suficiência (≥ 30 ng/mL). **Resultados:** Um total de 29 pacientes foram estudados, 15 no grupo caso e 14 no grupo controle. Os pacientes casos apresentaram mediana de 25(OH)D inferior a dos pacientes controles (22,6 vs. 28,6 ng/mL; $p < 0,01$). A frequência de pacientes casos com insuficiência/deficiência de vitamina D foi maior do que entre os pacientes controles (93,3% vs. 57,1%, $p < 0,004$). Por outro lado, o percentual de pacientes com suficiência de vitamina D foi maior entre os controles se comparados aos integrantes do grupo casos (42,9% vs. 6,7%, $p < 0,004$). **Conclusão:** Em pacientes com DRC, a deficiência de vitamina D se associa com PC.

Palavras-chave: insuficiência renal crônica, periodontite crônica, vitamina D.

ABSTRACT

Introduction: Concomitance of chronic periodontitis (CP) in patients with chronic kidney disease (CKD) have been associated with adverse outcomes. Vitamin D (25(OH)D) deficiency may play a role in CP and inadequate vitamin D status is common among patients with CKD. **Objective:** To examine the relationship between vitamin 25(OH)D and CP in patients with CKD not yet on dialysis. **Method:** A case-control study was conducted. Cases and controls were defined as patients with CKD with and without CP, respectively. The demographic, clinical and laboratory data were obtained when the patient was attended in the outpatient clinic. CKD was defined and staged according to the NKF QDOKI™. Serum 25(OH)D levels were measured by chemiluminescence when assessing the CP, which was defined according to the American Academy of Periodontology (1999). Serum 25(OH)D levels were stratified into deficient (≤ 14 ng/mL), insufficient (15-29 ng/mL) and sufficiency (≥ 30 ng/mL). **Results:** A total of 15 cases were compared with 14 controls. Cases had lower median 25(OH)D levels than controls (22.6 versus 28.6 ng/mL, $p < 0.01$) and were more likely to be categorized as vitamin D insufficiency/deficiency (93.3% versus 57.1%, $p < 0.004$). On the other hand, the percentage of controls with vitamin D sufficiency was higher than cases (42.9% versus 6.7%, $p < 0.004$). **Conclusion:** In patients with CKD not yet on dialysis, vitamin D deficiency is associated with CP.

Keywords: chronic periodontitis, renal insufficiency, chronic, vitamin D.

INTRODUÇÃO

A periodontite crônica (PC) é uma infecção subgingival, predominantemente causada por bactérias Gram-negativas¹ e caracterizada por períodos de exacerbação e remissão. No Brasil, cerca de 70% dos indivíduos acima de 30 anos apresentam PC na forma moderada, representada pelo nível de inserção clínica (NIC) ≥ 5 mm e 52% destes na forma grave da doença (NIC ≥ 7 mm).² Pacientes, na pré-dialise e em hemodiálise, apresentaram prevalência de PC mais grave quando comparados a pacientes em diálise peritoneal e indivíduos saudáveis.³ A PC, na forma grave, pode levar à perda dentária⁴ e se associa a risco aumentado de doença cardiovascular,⁵ controle glicêmico inadequado em pacientes com diabetes melitus tipo 2,⁶ gravidez complicada,⁷ acidente vascular cerebral,⁸ sendo considerada um importante problema de saúde pública que pode ser prevenido e tratado.

Estudos recentes sugerem alta prevalência de PC em pacientes com DRC tanto nos estágios pré-dialíticos^{9,10} quanto no estágio dialítico.^{11,12} Em pacientes com DRC, a PC é mais grave e observa-se maior prevalência de patógenos bacterianos periodontais se comparados aos indivíduos saudáveis.¹³ O impacto desfavorável da ocorrência da PC, no curso da DRC, não está completamente definido, mas a sua associação desfavorável com as doenças cardiovasculares,¹⁴ principais causas de óbito no paciente com doença renal,¹⁵ pode constituir um novo fator de risco ainda pouco valorizado.

A vitamina D apresenta função importante na resposta imunológica e pode desempenhar um papel chave na PC, observada em pacientes com DRC. Estudos têm evidenciado a associação entre saúde periodontal e ingestão de vitamina D.^{16,17} A suplementação de vitamina D e cálcio melhora a saúde periodontal, aumenta a densidade óssea na mandíbula e inibe a reabsorção óssea alveolar.^{18,19} Postulamos que o nível inadequado de vitamina D favorece a ocorrência de PC em pacientes com DRC; assim, o objetivo do estudo é examinar a relação entre níveis séricos de vitamina D e PC em pacientes com DRC pré-dialítica.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo caso-controle, realizado em pacientes acompanhados no ambulatório de prevenção secundária do Núcleo Interdisciplinar de Estudos, Pesquisas e Tratamento em Nefrologia (NIEPEN) da

Universidade Federal de Juiz de Fora e Fundação IMEPEN, no período de 11/2009 a 08/2012.

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos e com DRC pré-dialítica, nos estágios 3B a 5, na faixa etária de 30 a 78 anos. Não foram incluídos os pacientes tabagistas, em uso de anti-inflamatórios, de utilização de antibiótico nos últimos três meses, as grávidas, os com diagnóstico de câncer, os portadores do vírus HIV, os diabéticos não compensados, os portadores de outras infecções ou com quadro de febre de origem indeterminada, os tratados para periodontite nos últimos 6 meses e com doenças periodontais agressivas ou agudas.

A taxa de filtração glomerular (TFG) foi estimada a partir da dosagem da creatinina sérica, utilizando-se a equação desenvolvida pelo grupo de estudo *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI).²⁰ O diagnóstico da DRC seguiu os critérios propostos pelo NKF KDOQI™.²¹

A dosagem de 25 hidroxi-vitamina D (25(OH)D) foi realizada pela técnica quimioluminescência em soro estocado a -80°C, obtido no dia do exame periodontal. O nível sérico de 25(OH)D foi utilizado como reserva orgânica de vitamina D. A 25(OH)D sérica representa a combinação de fontes endógenas e exógenas de vitamina D e apresenta meia vida prolongada.²² Os resultados de 25(OH)D foram estratificados em deficiência (≤ 14 ng/mL), insuficiência (15-29 ng/mL) e suficiência (≥ 30 ng/mL).

O exame periodontal foi conduzido por duas examinadoras devidamente qualificadas. Todos os dentes, exceto terceiros molares, foram examinados. Profundidade de sondagem (PS) e recessão gengival foram mensuradas nos seis sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual, disto-lingual), utilizando sonda computadorizada (*Florida Probe Corp., USA*). As mensurações foram expressas em milímetros. O nível de inserção clínica (NIC) foi calculado através da distância da PS, a partir da junção cimento/esmalte somada à recessão gengival e subtraindo-se a hiperplasia gengival. O número de sítios com placa bacteriana foi quantificado pela presença ou ausência de placa dental supragengival, assim como o número de sítios com sangramento à sondagem (SS).

A habilidade do profissional foi testada pelo coeficiente de correlação, por meio do teste estatístico *Kappa*. O coeficiente intraexaminador foi de 0,84 e interexaminador foi de 0,82.

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-HU/CAS) da Universidade Federal de Juiz de Fora. Parecer nº 0130/2009; folha de rosto: 290100; CAAE: 0107.0.420.000-09.

ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados e processados utilizando-se o programa SPSS, versão 15.0 (Chicago, IL, USA). Os resultados foram representados pela mediana e valores (mínimo e máximo) para as variáveis numéricas, e frequências absoluta e relativa para as variáveis categóricas. Para comparação das variáveis entre os grupos, foram aplicados os testes de Mann-Whitney para as variáveis numéricas e qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher (quando as frequências esperadas foram menores que 5) para variáveis categóricas. A diferença estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Do total de 623 pacientes inicialmente avaliados, 594 não foram incluídos pelas seguintes razões: TFG > 44 mL/mi/1,73 m² (252), não comparecimento para avaliação periodontal e coleta de sangue (139), edentulismo total (108), tabagismo (48), negaram-se a participar do estudo (31), sem indicação para avaliação periodontal (16). Vinte e nove pacientes preencheram os critérios de inclusão, 15 do grupo caso (DRC e PC) e 14 do grupo controle (DRC sem PC), sendo a mediana de idade de ambos semelhantes. O grupo caso, comparativamente ao grupo controle, foi constituído principalmente por pacientes do sexo masculino e diabéticos, porém sem significância estatística (Tabela 1). As causas de DRC mais frequentes foram doença renal diabética nos pacientes caso e nefropatia hipertensiva e doença renal diabética nos pacientes controle. Houve diferença estatística quanto à mediana da pressão arterial sistólica (140 mmHg vs. 130 mmHg, $p < 0,05$) e dos níveis de paratormônio (105 pg/mL vs. 53 pg/mL, $p < 0,05$), ambos mais elevados nos pacientes caso relativamente aos pacientes controle.

Como esperado, foi observada diferença estatística em todos os parâmetros clínicos periodontais na comparação dos grupos. Os pacientes caso apresentaram maior inflamação local e PC caracterizada como moderada a grave, com acometimento de grande parte dos sítios da boca (PS ≥ 5 mm = 5,5% e NIC ≥ 6 mm = 32%, $p < 0,001$). Não

houve significância estatística quanto ao número de dentes (Tabela 2).

Os pacientes caso apresentaram mediana de 25(OH)D inferior a dos pacientes controle (22,6 vs. 28,6 ng/mL; $p < 0,01$) (Figura 1). O percentual de pacientes com DRC com e sem PC, de acordo com os níveis de 25(OH)D, foi 33,3% vs. 0% no grupo deficiência, 60% vs. 57,1% no grupo insuficiência e 6,7% vs. 42,9% no grupo suficiência ($p < 0,004$). O percentual de pacientes caso, com insuficiência ou deficiência de 25(OH)D, foi comparativamente maior entre os pacientes caso relativamente aos pacientes controle (93,3% vs. 57,1%, $p < 0,004$).

DISCUSSÃO

Este estudo mostra que pacientes com DRC e PC apresentam níveis séricos menores de vitamina D e são mais frequentemente insuficientes e deficientes em 25(OH)D relativamente aos pacientes com DRC sem PC. Esta associação ficou evidente a despeito de excluirmos vários fatores confundidores, tais como: tabagismo, uso de medicações anti-inflamatórias, utilização recente de antibiótico, gravidez, câncer, infecção pelo vírus de imunodeficiência adquirida, diabetes não compensados, febre de origem indeterminada ou outras infecções, tratamento periodontal nos últimos 6 meses, e os casos de doenças periodontais agressivas ou agudas. Os resultados sugerem que nível suficiente de vitamina D é importante na manutenção de um periodonto saudável e na redução das consequências da PC.

A hipovitaminose D não é infrequente no Brasil. Entre os 73 médicos residentes de um hospital público da cidade de Porto Alegre, com idade média de 26 anos, o nível sérico de 25(OH)D encontrado foi de $17,9 \pm 8,0$ ng/mL, sendo que, em 57,4% deles, os níveis de vitamina D eram < 20 ng/mL.²³ Na DRC, nível insuficiente de 25(OH)D, definido como < 30 ng/mL, foi observado em 39,6% dos pacientes em tratamento conservador na cidade de São Paulo.²⁴ Contudo, se considerarmos como suficiência de 25(OH)D, níveis ≥ 40 ng/mL,^{25,26} o percentual de pacientes insuficientes atinge 51%.²⁷ No presente estudo, 75,8% dos pacientes com DRC avaliados apresentaram níveis insuficientes ou deficientes de vitamina D e, dentre esses, 63,6% apresentavam PC.

A PC é uma doença infecciosa crônica, causada por bactérias Gram-negativas, que determinam resposta inflamatória sistêmica.⁴ A destruição do tecido

TABELA 1 VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM DRC COM E SEM PC

Variáveis	DRC com PC (n = 15) mediana (mín-máx)	DRC sem PC (n = 14) mediana (mín-máx)	Valor de p
Idade (anos)	63 (51-72)	64 (30-78)	0,5
Sexo (masculino), %	67	50	0,2
Diabetes, %	46	21	0,1
Hipertensão arterial, %	86	93	0,5
Doença de Base			0,5
Nefropatia hipertensiva, %	20	21,4	
Efropatia diabética, %	40	21,5	
Glomerulonefrite crônica, %	6,7	14,3	
Outras e indeterminadas, %	33,3	42,8	
Pressão arterial sistólica (mmHg)	140 (100-190)	130 (100-180)	0,014
Pressão arterial diastólica mmHg)	80 (60-100)	80 (68-130)	0,6
Índice de massa corporal (kg/m ²)	27 (17-39)	26 (21-86)	0,8
Creatinina sérica (mg/dL)	1,8 (1,3-5)	1,7 (0,8-3,2)	0,2
TFG* (mL/min/1,73 m ²)	31 (9-63)	32 (15-78)	0,3
Colesterol total (mg/dL)	183 (109-330)	192 (119-255)	0,4
Paratormônio (pg/mL)	105 (39-595)	53 (22-175)	0,02
Distribuição dos pacientes de acordo com os níveis de 25(OH)D*, n (%)			0,004
≤ 14 ng/mL	5 (33,3)	0	
15-29 ng/mL	9 (60)	8 (57,1)	
≥ 30 ng/mL	1 (6,7)	6 (42,9)	

* TFG: Taxa de filtração glomerular; 25(OH)D: 25-hidroxi-vitamina D.

TABELA 2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS NOS PACIENTES COM DRC COM E SEM PC

Variáveis	DRC com PC (n = 15) mediana (mín-máx)	DRC sem PC (n = 14) mediana (mín-máx)	Valor de p
Profundidade de sondagem (mm)	2,1 (1,4-3,7)	1,4 (1,3-1,8)	< 0,001
Profundidade de sondagem ≥ 5mm, %	5,5 (2-36)	*	
Nível de inserção clínica (mm)	4,5 (1,7-6)	2,2 (1,4-4,9)	< 0,001
Nível de inserção clínica ≥ 6 mm, %	32 (2,7-54)	*	
Sítios com placa dental, %	85 (2-100)	3,5	< 0,001
Sítios com sangramento à sondagem, %	52 (2-98)	*	
Número de dentes	14 (4-23)	12 (6-26)	0,9

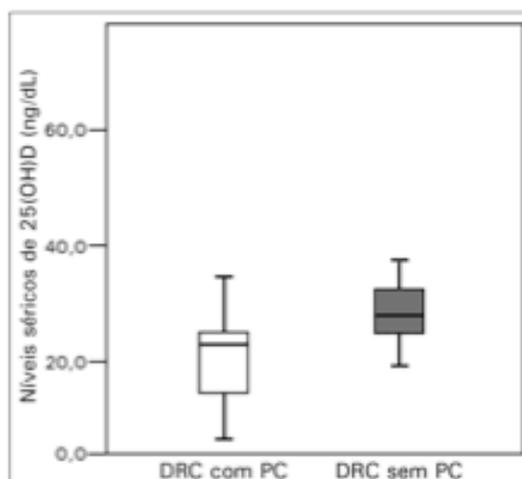
* Fatores exclusivos e definidores do grupo "Caso" para confirmação clínica de PC sem ocorrência no grupo "Controle".

periodontal local favorece a disseminação sistêmica dos patógenos periodontais e seus produtos (por exemplo, lipopolissacarídeos) e de mediadores inflamatórios (por ex., fator de necrose tumoral, interleucina-6) produzidos localmente.²⁸ Em estudos anteriores, nós observamos que a PC tende a ser mais grave nos pacientes com DRC em tratamento dialítico ou conservador, relativamente aos pacientes com PC e sem doenças sistêmicas.^{13,29} No presente estudo, a PC ficou muito bem definida nos pacientes caso, com todos os parâmetros clínicos utilizados para caracterizar

a doença periodontal estatisticamente diferentes dos pacientes controles.

No terceiro *National Health and Nutritional Examination Survey* (NHANES III), um levantamento expressivo da população adulta dos Estados Unidos da América, níveis insuficientes de 25(OH)D se associaram independentemente a PC.¹⁶ Em ensaio randomizado, a administração de vitamina D (700 UI/dia) e cálcio (500 mg/dia) significativamente reduziu a perda de dentes em pacientes idosos ao longo de três anos de observação.³⁰ Adicionalmente, a

Figura 1. Box-plot representando a mediana (linha horizontal), intervalo interquartil (limites superior e inferior) e limites superior e inferior (hastes) dos níveis de 25(OH)D em pacientes com DRC e PC (pacientes caso) contra DRC sem PC (pacientes controle). Pacientes caso apresentaram mediana dos níveis séricos de 25(OH)D menor do que os pacientes controle ($p < 0,01$).



suplementação alimentar com vitamina D e cálcio melhorou a saúde periodontal, aumentou a densidade óssea na mandíbula, inibiu a reabsorção óssea^{18,19} e diminuiu a gravidade da PC.²¹

A vitamina D possui funções importantes nas respostas imune e inflamatória e, quando deficiente, associa-se com maior prevalência de infecção.²² A vitamina D age como um agente anti-inflamatório ao inibir a expressão de citocinas inflamatórias e estimular monócitos/macrófagos a secretarem moléculas com potentes efeitos antibióticos.^{16,17} A vitamina D induz diretamente a expressão do peptídeo antimicrobiano endógeno catelicidina, cuja produção é desencadeada a partir de receptores Toll-like em resposta à infecção bacteriana. A ativação de receptores Toll-like em macrófagos humanos aumenta a expressão de receptores de vitamina D e da enzima 1- α -hidroxilase. Como consequência, observa-se indução de catelicidina e morte de bactérias intracelulares (p. ex., *Mycobacterium tuberculosis*).³³ A PC é causada por bactérias que estimulam as respostas imune e inflamatória como parte dos mecanismos de defesa do organismo e a respostas através dos receptores Toll-like são importantes na patogênese da doença periodontal.^{34,35} A vitamina D parece modular grande parte da resposta imune do hospedeiro.³⁶ No nosso estudo, os pacientes com DRC e PC apresentaram menores níveis de 25(OH)D do que os controles

sem PC. Observamos, ainda, que a PC ocorreu mais frequentemente nos pacientes com < 30 ng/mL 25(OH)D, 1/3 dos quais eram deficientes de vitamina D. Por outro lado, somente 6,7% dos pacientes com DRC e PC apresentaram níveis suficientes de 25(OH)D.

No presente estudo, fica evidente a nossa preocupação de parear os pacientes casos e controles o máximo possível. Conseguimos igualar os pacientes em vários fatores confundidores tradicionais que se associam com a PC, tais como: idade, sexo, obesidade e tabagismo. Contudo, observa-se diferença estatística entre os níveis de pressão arterial sistólica, mais elevados nos pacientes com PC. Evidências epidemiológicas atuais reforçam a associação da PC com níveis pressóricos elevados. Os mecanismos envolvidos nesta associação parecem envolver a disseminação sistêmica da infecção periodontal, resposta imune do hospedeiro, ação bacteriana direta no sistema vascular, disfunção endotelial¹⁷ e/ou hiperparatiroidismo³⁸ e/ou regulação inadequada do sistema renina-angiotensina pela vitamina D.³⁹

É sabido que a deficiência de vitamina D ocorre precocemente no curso da DRC⁴⁰ e se associa com hiperparatiroidismo secundário.⁴¹ Estas observações estão de acordo com os nossos achados de níveis mais elevados de paratormônio molécula intacta nos pacientes com DRC e PC, relativamente mais deficientes em vitamina D do que os com periodonto saudável.

Faz-se imperioso apresentar algumas limitações presentes em nosso trabalho. Primeiro, a natureza do estudo, corte transversal, não nos permite estabelecer uma natureza causativa entre hipovitaminose D e PC. Segundo, os critérios rígidos de inclusão e não inclusão limitaram o tamanho amostral. Terceiro, o uso de 30 ng/mL como ponto de corte para estabelecer as reservas orgânicas de 25(OH)D pode ser discutido, pois alguns autores preconizam níveis de 40 ng/mL ou mais como ótimo.^{25,26} Finalmente, é possível que haja outros fatores confundidores que possam explicar os nossos resultados.

Em suma, os nossos achados sugerem que a hipovitaminose D predispõe os pacientes com DRC a desenvolverem PC, possivelmente por limitar a resposta imune e inflamatória do paciente frente à agressão bacteriana do periodonto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação IMEPEN e do Programa de Pós-Graduação em Saúde

36. Bikle DD. Vitamin D and the immune system: role in protection against bacterial infection. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:348-52.
37. Tsioufis C, Kasiakogias A, Thomopoulos C, Stefanadis C. Periodontitis and blood pressure: the concept of dental hypertension. *Atherosclerosis* 2011;219:1-9.
38. Snijder MB, Lips P, Seidell JC, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, et al. Vitamin D status and parathyroid hormone levels in relation to blood pressure: a population-based study in older men and women. *J Intern Med* 2007;261:558-65.
39. Pilz S, Tomaschitz A. Role of vitamin D in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2010;8:1599-608.
40. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 2007;71:31-8.
41. Martinez I, Saracho R, Montenegro J, Llach F. The importance of dietary calcium and phosphorus in the secondary hyperparathyroidism of patients with early renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997;29:496-502.

10)COMENTÁRIOS FINAIS

A DRC é uma doença crônica não transmissível prevalente em todo o mundo e no Brasil. Recentemente, a PC tem sido considerada um fator de risco não tradicional para DRC. Vários estudos mostram que a PC é prevalente e mais grave em paciente com DRC quando comparados a indivíduos sistemicamente saudáveis. Nenhum estudo até o momento conseguiu explicar essa relação.

No primeiro trabalho **“Níveis séricos de vitamina D e periodontite crônica em pacientes com doença renal crônica”**, avaliamos a relação entre níveis séricos de vitamina D e PC em pacientes com DRC pré-dialítica. Os resultados evidenciaram frequência aumentada de hipovitaminose D, principalmente no nível deficiência (≤ 14 ng/mL) nos pacientes com DRC e PC. Esse dado sugere que a deficiência de vitamina D se associa com PC em pacientes com DRC.

No segundo estudo **“Low levels of vitamin D and LL-37 in patients with CKD: association with chronic periodontitis”**, avaliamos a relação entre níveis séricos de 25 (OH) D, LL-37 e IL-6 no plasma e no fluido gengival de pacientes com PC e DRC pré-dialítica. Os resultados mostram uma associação entre níveis deficientes de vitamina D e valores baixos de catelicidina no plasma dos pacientes com DRC e PC quando comparados aos indivíduos dos outros grupos. Ao mesmo tempo, eram mais inflamados sistemicamente e apresentavam PC mais grave. De forma inversa, a LL-37 encontrou-se aumentada juntamente com o níveis de IL-6 no fluido gengival.

Esses resultados sugerem que, em pacientes com DRC, a deficiência de vitamina D e de LL-37 torna o indivíduo mais sujeito a infecção e o aumento do IL-6 e da LL-37 no fluido gengival caracteriza uma hiper-resposta inflamatória local, o que poderia explicar PC mais grave nesses pacientes.

Em suma, os nossos dados sugerem que a possível explicação para a frequência aumentada e maior gravidade da PC em pacientes com DRC reside no fato de que pacientes com DRC apresentam hipovitaminose D, com isso secretam menor quantidade de LL-37, deixando o paciente mais sujeito a infecção, inclusive por bactérias periodontopatogênicas.

11) CONCLUSÃO

Os achados deste estudo sugerem que a hipovitaminose D leva à diminuição de LL-37 nos pacientes com DRC, tornando esses pacientes sujeitos a infecção. Diante de bactérias periodontopatogênicas, os níveis de LL-37 aumentam, assim como a inflamação local. Frente a esse aumento da resposta inflamatória, o paciente com DRC evolui para a forma mais grave de periodontite.

12)REFERÊNCIAS

1. AMANO, Y.; KOMIYAMA, K.; MAKISHIMA, M. Vitamin D and periodontal disease. **Journal of Oral Science**, v. 51, n. 1, p. 11-20, Mar 2009.
2. ARMITAGE, G. C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v.34, p.9-21. 2004.
3. (Atlas Corações do Brasil. Disponível em: <http://educacao.cardiol.br/coracoedobrasil/default.asp>. Acessado em fevereiro de 2009). 2005.
4. AKAR, H. *et al.* Systemic consequences of poor oral health in chronic kidney disease patients. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 6, n. 1, p. 218-26, Jan 2011.
5. ARTESE, H. P. *et al.* Effect of non-surgical periodontal treatment on the subgingival microbiota of patients with chronic kidney disease. **Brazilian Oral Research**, v. 26, n. 4, p. 366-72, Jul 2012.
6. ASAI, Y. *et al.* Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7387-95, Dec 2001.
7. BALS, R. *et al.* Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 6084-9, Nov 1999.
8. BARLOW, P. G. *et al.* The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 3, p. 509-20, Set 2006.
9. BASTOS, J. A. *et al.* Identification of periodontal pathogens and severity of periodontitis in patients with and without chronic kidney disease. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 8, p. 804-11, Ago 2011.
10. BASTOS, J.A. *et al.* Estudo piloto sobre a avaliação da periodontite crônica em pacientes com doença renal crônica. **J Bras Nefrol**, v. 31, n. 2, p.163-166, 2009.
11. BASTOS, RMR. *et al.* Prevalência da doença renal crônica nos estágios 3, 4 e 5 em adultos. **Rev. Assoc. Med. Bras**,55:40-44, 2009.
12. BHAN, I. *et al.* Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and human cathelicidin in healthy adults. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 5, p. 1302-4 e1, May 2011.

13. BIKLE, D. D. Vitamin D and the immune system: role in protection against bacterial infection. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 17, n. 4, p. 348-52, Jul 2008.
14. BRITO, F. *et al.* Extent and severity of chronic periodontitis in chronic kidney disease patients. **Journal of Periodontal Research**, v. 47, n. 4, p. 426-30, Aug 2012.
15. CARPENTER, S.; O'NEILL, L. A. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 1891-901, Aug 2007.
16. CUPPARI, L. *et al.* Vitamin D Status of Chronic Kidney Disease Patients Living in a Sunny Country. **J Renal Nutr**, v.18, p.408–414, 2008.
17. DALE, B. A.; KRISANAPRAKORNKIT, S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. **Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 30, n. 6, p. 321-7, Jul 2001. (a)
18. DALE, B. A. *et al.* Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. **Journal of Periodontal Research**, v. 36, n. 5, p. 285-94, Out 2001. (b)
19. DALE, B. A.; FREDERICKS, L. P. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 7, n. 2, p. 119-33, Jul 2005.
20. DE HAAR, S. F. *et al.* Loss-of-function mutations in cathepsin C in two families with Papillon-Lefevre syndrome are associated with deficiency of serine proteinases in PMNs. **Human Mutation**, v. 23, n. 5, p. 524, May 2004.
21. DE HAAR, S. F. *et al.* Role of polymorphonuclear leukocyte-derived serine proteinases in defense against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 9, p. 5284-91, Set 2006.
22. DE, Y. *et al.* LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 7, p. 1069-74, Out 2000.
23. DIETRICH, T. *et al.* Association between serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D3 and periodontal disease in the US population. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 108-13, Jul 2004.
24. ECKARDT, K. U. *et al.* Definition and classification of CKD: the debate should be about patient prognosis--a position statement from KDOQI and KDIGO. **American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the**

- National Kidney Foundation**, v. 53, n. 6, p. 915-20, Jun 2009.
25. FERNANDES, F. *et al.* Sucessos e Fracassos - Uma Análise dos Dados do BRAZPD Comparados às Diretrizes Espanholas. **J Bras Nefrol**, v.30, p. 22-31, 2008.
 26. FISHER, M. A. *et al.* Periodontal disease and other nontraditional risk factors for CKD. **American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation**, v. 51, n. 1, p. 45-52, Jan 2008.
 27. FISHER, M. A.; TAYLOR, G. W. A prediction model for chronic kidney disease includes periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 1, p. 16-23, Jan 2009.
 28. GAMONAL, J. *et al.* Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 10, p. 1535-45, Oct 2000.
 29. GANZ, T. Immunology. Versatile defensins. **Science**, v. 298, n. 5595, p. 977-9, Nov 2002.
 30. GARCIA, M. N. *et al.* One-year effects of vitamin D and calcium supplementation on chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 1, p. 25-32, Jan 2011.
 31. GOMBART, A. F.; BORREGAARD, N.; KOEFFLER, H. P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 9, p. 1067-77, Jul 2005.
 32. GOMBART, A. F. *et al.* Regulation of the CAMP gene by 1,25(OH)₂D₃ in various tissues. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, n. 3-5, p. 552-7, Mar 2007.
 33. GOMBART, A. F. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. **Future Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1151-65, Nov 2009.
 34. GUDMUNDSSON, G. H. *et al.* The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 238, n. 2, p. 325-32, Jun 1996.
 35. HATA, T. R. *et al.* Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 4, p. 829-31, Oct 2008.

36. HIRSCHFELD, M. *et al.* Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1477-82, Mar 2001.
37. HOLICK, MF. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med**, v.357, p.266-281, 2007.
38. IIMURA, M. *et al.* Cathelicidin mediates innate intestinal defense against colonization with epithelial adherent bacterial pathogens. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 8, p. 4901-7, April 2005.
39. INOMATA, M.; INTO, T.; MURAKAMI, Y. Suppressive effect of the antimicrobial peptide LL-37 on expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 induced by Porphyromonas gingivalis cells and extracts in human gingival fibroblasts. **European Journal of Oral Sciences**, v. 118, n. 6, p. 574-81, Dec 2010.
40. IOANNIDOU, E.; SWEDE, H. Disparities in periodontitis prevalence among chronic kidney disease patients. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 6, p. 730-4, Jun 2011.
41. KATO, S. *et al.* Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 3, n. 5, p. 1526-33, Set 2008.
42. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. **Am. J. Kidney Dis.**, v.39, n.2, p. S1-S246, 2002.
43. KOVESDY, CP; KALANTAR-ZADEH, K. Novel targets and new potential: Developments in the treatment of inflammation in chronic kidney disease. **Expert Opin Investig Drugs**, v.17,p. 451-467. 2008.
44. KOCZULLA, R. *et al.* An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 11, p. 1665-72, Jun 2003.
45. LACLAIR, RE. *et al.* Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. **Am J Kidney Dis**, v.45, p.1026-1033, 2005.
46. LARRICK, J. W. *et al.* Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 4, p. 1291-7, April 1995.
47. LEVEY, A. S.*et al.* A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. **Ann Intern Med**, v.130, n.6, p. 461-70, 1999.

48. LEVEY AS, STEVENS LA, SCHMID CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Ann Intern Med**, v. 150, p. 604-12, 2009.
49. LEVIN, A. *et al.* Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the Study to Evaluate Early Kidney Disease. **Kidney Int**, v. 71, p. 31-38, 2007.
50. LIU, P. T. *et al.* Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770-3, Mar 2006.
51. LIU, K. *et al.* Elevated plasma calcifediol is associated with aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 7, p. 1114-20, Jul 2009.
52. LIU, K. *et al.* Initial periodontal therapy reduced systemic and local 25-hydroxy vitamin D(3) and interleukin-1beta in patients with aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 81, n. 2, p. 260-6, Feb 2010.
53. MCKAY, M. S. *et al.* Immunomagnetic recovery of human neutrophil defensins from the human gingival crevice. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 14, n. 3, p. 190-3, Jun 1999.
54. MARTINEAU, A. R. *et al.* IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 7190-8, Jun 2007.
55. MILEY, D. D. *et al.* Cross-sectional study of vitamin D and calcium supplementation effects on chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 9, p. 1433-9, Sep 2009.
56. MOCHIZUKI, S. *et al.* Gamma-interferon enhances expression of CD14/MyD88 and subsequent responsiveness to lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, n. 5, p. 333-43, Oct 2004.
57. MOOKHERJEE, N. *et al.* Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 4, p. 2455-64, Feb 2006.
58. MURAKAMI, M. *et al.* Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 12, p. 845-50, Dec 2002. (a)
59. MURAKAMI, M. *et al.* Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, n. 5, p. 1090-5, Nov 2002. (b)
60. NAGAOKA, I.; TAMURA, H.; HIRATA, M. An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. **Journal of Immunology**, v. 176, n.

- 5, p. 3044-52, Mar 2006.
61. NIZET, V. *et al.* Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. **Nature**, v. 414, n. 6862, p. 454-7, Nov 2001.
 62. PHADKE, S. M. *et al.* Antimicrobial peptides in mucosal secretions: the importance of local secretions in mitigating infection. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 5, p. 1289-93, May 2005.
 63. PUKLO, M. *et al.* Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, n. 4, p. 328-35, Ago 2008.
 64. PUTSEP, K. *et al.* Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. **Lancet**, v. 360, n. 9340, p. 1144-9, Oct 2002.
 65. SCANNAPIECO, F. A. Systemic effects of periodontal diseases. **Dental Clinics of North America**, v. 49, n. 3, p. 533-50, Jul 2005.
 66. SCHIFFRIN, EL. *et al.* Chronic kidney disease: Effects on the cardiovascular system. **Circulation**, v. 116, p.85-97, 2007.
 67. SESSO, R. *et al.* Relatório do Censo Brasileiro de Diálise. **J Bras Nefrol**, v. 33, p. 442-7, 2011.
 68. SILNESS, J. e H. LOE. Periodontal Disease in Pregnancy. li. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. **Acta Odontol Scand**, v.22, Feb, p.121-35, 1964.
 69. SORENSEN, O. *et al.* An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. **Journal of Immunological Methods**, v. 206, n. 1-2, p. 53-9, Au 1997.
 70. STEIN, S. H.; TIPTON, D. A. Vitamin D and its impact on oral health--an update. **The Journal of the Tennessee Dental Association**, v. 91, n. 2, p. 30-3, 2011.
 71. STENVINKEL, P. Inflammation in end-stage renal disease: the hidden enemy. **Nephrology**, v. 11, n. 1, p. 36-41, Feb 2006.
 72. SUN, Y. *et al.* In vivo expression of Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4, CSF2 and LY64 in Chinese chronic periodontitis patients. **Oral Diseases**, v. 16, n. 4, p. 343-50, May 2010.
 73. TAKEUCHI, Y. *et al.* Salivary levels of antibacterial peptide (LL-37/hCAP-18) and cotinine in patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**,

- v. 83, n. 6, p. 766-72, Jun 2012.
74. TURNER, J. *et al.* Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 9, p. 2206-14, Set 1998.
75. TURKOGLU, O. *et al.* Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis. **J Periodontol**, v.80, n.6, Jun, p.969-76, 2009.
76. US RENAL DATA SYSTEM. USRDS 2007 ANNUAL DATA REPORT. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2007.
77. WANG, T. T. *et al.* Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 2909-12, Set 2004.
78. YAO, S. G.; FINE, J. B. A review of vitamin D as it relates to periodontal disease. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 33, n. 3, p. 166-71, Mar 2012.
79. YIM, S. *et al.* Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Journal of Cystic Fibrosis : Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society**, v. 6, n. 6, p. 403-10, Nov 2007.
80. YOSHIMURA, A. *et al.* Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 218-25, Jan 2002.
81. VILELA, E. M. *et al.* Treatment of chronic periodontitis decreases serum prohepcidin levels in patients with chronic kidney disease. **Clinics**, v. 66, n. 4, p. 657-62, 2011.
82. ZASLOFF, M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. **Lancet**, v. 360, n. 9340, p. 1116-7, Oct 2002.
83. ZASLOFF, M. Fighting infections with vitamin D. **Nature Medicine**, v. 12, n. 4, p. 388-90, April 2006 (a).
84. ZASLOFF, M. Inducing endogenous antimicrobial peptides to battle infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 24, p. 8913-4, Jun 13 2006 (b).

APÊNDICE 1

RESUMO APROVADO NO XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE NEFROLOGIA, 2012

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE VITAMINA D EM PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA E DOENÇA RENAL CRÔNICA.

JESSICA DO AMARAL BASTOS, LUIZ CARLOS FERREIRA DE ANDRADE, ANA PAULA FERREIRA, NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO, ANDRÉA MARCIA MARCACCINI, FLÁVIO LOMBARDI SILVA, PATRÍCIA DE CASTRO DAIBERT, EDUARDO MACHADO VILELA, ERICA DE ALMEIDA BARROSO, TATIANA RORIZ LOPES, RÔMULO AMARAL TAFURI, MARCUS GOMES BASTOS.

INTRODUÇÃO. A doença renal crônica (DRC) se associa frequentemente a níveis anormalmente baixos de vitamina D (vit D). A vit D controla a resposta inflamatória inata e adquirida. A periodontite crônica (PC), tem sido associada a várias doenças sistêmicas, entre elas a DRC. Tal associação parece ser mediada pela expressão sistêmica da resposta inflamatória decorrente da PC.

OBJETIVO. Avaliar a associação entre níveis de 25-hidroxi-vit D (25-OH-D) e a ocorrência da PC em pacientes com PC e DRC em tratamento não dialítico.

CASUÍSTICA E MÉTODOS. Trata-se de um estudo transversal envolvendo 60 participantes divididos em quatro grupos: Um grupo composto de 15 indivíduos saudáveis; um grupo composto de 15 pacientes sem doenças sistêmicas e com PC; um grupo composto de 15 pacientes com DRC pré-dialítica estágios 3B, 4, 5 e sem PC; e um grupo composto de 15 pacientes DRC pré-dialítica nos estágios 3B, 4, 5 e com PC). A definição e estagiamento da DRC baseou-se no NKF KDOQI™). A taxa de filtração glomerular (TFG) foi estimada a partir da creatinina plasmática, utilizando a equação CKD-EPI. O exame periodontal incluiu: 1. Profundidade de sondagem e recessão gengival com sonda periodontal computadorizada; 2. Nível de inserção clínica; 3. Número de sítios com placa bacteriana; e 4. Número de sítios com sangramento à sondagem. A resposta inflamatória sistêmica foi avaliada pela Proteína C-reativa ultra-sensível (PCR-us) no soro e nível sérico da 25 (OH) vitamina D (25-OH-D) foi determinado por quimioluminescência.

RESULTADOS. A PC mais grave e níveis elevados de PCR-us foram observados mais frequentemente nos pacientes com DRC comparativamente aos outros três grupos. Relativamente aos participantes sem PC, os pacientes com PC apresentaram menores níveis de 25-OH-D. A maioria absoluta dos participantes com níveis mais baixos de 25-OH-D (0,15 ng/mL) apresentavam DRC e PC ($p < 0,02$).

CONCLUSÃO. A PC, particularmente em pacientes com DRC, é mais grave e é mais frequente entre os pacientes com menores níveis de vit D.

APÊNDICE 2

RESUMO APROVADO NO XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE PERIODONTOLOGIA 2013

NÍVEIS DE VIT. D E PC EM PACIENTES COM DRC.

Jessica do Amaral BASTOS; Luiz Carlos Ferreira de ANDRADE; Ana Paula FERREIRA; Erica de Almeida BARROSO; Patrícia de Castro DAIBERT;

Patrícia Lima de Sá BARRETO; Eduardo Machado VILELA; Andrea Marcia MARCACCINI; Fernando Antonio Basile COLUGNATI; Marcus Gomes BASTOS.

RESUMO:

INTRODUÇÃO: A concomitância de periodontite crônica (PC), em pacientes com doença renal crônica (DRC), têm sido associada a desfechos adversos. A deficiência de vitamina D (25(OH)D) parece desempenhar papel importante na PC e níveis inadequados de vitamina D têm sido descritos em pacientes com DRC. **OBJETIVO:** Examinar a relação entre níveis séricos de vitamina D e PC em pacientes com DRC pré-dialítica. **MÉTODO:** Estudo de caso-controle, definidos, respectivamente, como pacientes com DRC e PC e DRC sem PC. Os dados demográficos, de exame físico e laboratoriais foram obtidos no dia da consulta. A DRC foi definida e estagiada segundo a NKF QDOKI™. Os níveis séricos de 25(OH)D foram dosados por quimioluminescência quando da avaliação da PC, a qual foi caracterizada segundo os critérios de Academia Americana de Periodontologia (1999). Os resultados de 25(OH)D foram estratificados em deficiência (≤ 14 ng/mL), insuficiência (15-29 ng/mL) e suficiência (≥ 30 ng/mL). **RESULTADOS:** Um total de 29 pacientes foram estudados, 15 no grupo caso e 14 no grupo controle. Os pacientes casos apresentaram mediana de 25(OH)D inferior a dos pacientes controles (22,6 vs. 28,6 ng/mL; $p < 0,01$). A frequência de pacientes casos com insuficiência/deficiência de vitamina D foi maior do que entre os pacientes controles (93,3% vs. 57,1%, $p < 0,004$). Por outro lado, o percentual de pacientes com suficiência de vitamina D foi maior entre os controles se comparados aos integrantes do grupo casos (42,9% versus 6,7%, $p < 0,004$). **CONCLUSÃO:** Em pacientes com DRC, a deficiência de vitamina D se associa com PC.

APÊNDICE 3

SERUM VITAMIN D, CATHELICIDIN AND CHRONIC PERIODONTITIS IN PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

Jessica A. Bastos, Luiz Carlos F. Andrade, Fernando A.B. Colugnati, Ana Paula Ferreira, Erica A. Barroso, Patricia C Daibert, Patricia L S. Barreto, Eduardo M. Vilela, Andrea M. Marcaccini, Marcus G. Bastos. Faculties of Medicine and Dentistry, Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

Concomitance of chronic periodontitis (CP) in patients with chronic kidney disease (CKD) have been associated with adverse outcomes. Vitamin D (25(OH)D) deficiency may play a role in CP and inadequate vitamin D status is common among patients with CKD. Vitamin D directly induces expression of the antimicrobial peptide cathelicidin, which can be triggered by a Toll-like receptor response to bacterial infection. The aim of this study was to examine the relationship between 25(OH)D, serum cathelicidin levels and CP in patients with CKD not yet on dialysis. A case-control study was conducted. Cases and controls were defined as patients with CKD with and without CP, respectively. The demographic, clinical and laboratory data were obtained when the patient was attended at the outpatient clinic. CKD was defined and staged according to the NKF QDOKI™. Serum 25(OH)D levels were measured by chemiluminescence when assessing the CP, which was defined according to the American Academy of Periodontology (1999). Serum 25(OH)D levels were stratified into deficient (≤ 14 ng/mL), insufficient (15-29 ng/mL) and sufficiency (≥ 30 ng/mL). Cathelicidin (LL-37) was measured by ELISA. A total of 15 cases were compared with 14 controls. Cases had lower median 25(OH)D levels than controls (22.6 versus 28.6 ng/mL, $p < 0.01$) and were more likely to be categorized as vitamin D insufficiency/deficiency (93,3% versus 57,1%, $p < 0,004$). On the other hand, the percentage of controls with vitamin D sufficiency was higher than cases (42,9% versus 6,7%, $p < 0,05$). Median LL-37 levels were lower in cases compared to controls (5.4 versus 6.6 pg/mL, $p < 0.08$). Compared to CKD patients with 25(OH)D sufficiency, those with insufficiency/deficiency had lower median LL-37 levels (5.5 versus 9.0 pg/mL, $p < 0.045$). In conclusion, vitamin D insufficiency (serum 25[OH] < 30 ng/mL) is associated with CP in patients with CKD not yet on dialysis. This association seems to be mediated through an impairment in clearing bacterial infection due to a decrease in LL-37 production.

RESUMO PUBLICADO NO AMERICAN JOURNAL OF KIDNEY DISEASES: Am J Kidney Dis. 2013;61(4):A1-A100.

APÊNDICE 4-

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO- POPs

LABORATÓRIO CÔRTEZ VILLELA

ALBUMINA

1 - METODOLOGIA: Verde de bromocresol.

2 - PRINCÍPIO DO TESTE: A albumina presente na amostra reage com o verde de bromocresol em meio ácido,

formando um complexo colorido que é quantificado espectrofotometricamente. A absorbância do complexo formado, medida em 630 nm, é diretamente proporcional à concentração da albumina na amostra analisada.

3 – APLICAÇÃO CLÍNICA: A albumina, principal componente protéico do soro humano normal, é uma proteína

globular produzido pelo fígado. Ela tem diversas funções importantes como:

- Transporte de moléculas hidrofóbica como a bilirrubina e os ácidos graxos. Isto é possível devido à zona hidrofóbica que existe em sua estrutura, sendo essa propriedade utilizado para dosar a albumina.
- Nutrição.
- Manutenção da pressão osmótica sanguínea.

4 - AMOSTRA:

. 4.1 – Tipo: Soro, Plasma(EDTA, heparina, citrato)

. 4.2 – Recipiente: Frasco do laboratório previamente identificado.

. 4.3 – Aditivo: N.A.

. 4.4 – Volume mínimo: 300 µL

. 4.5 – Volume recomendado: 500 µL

. 4.6 – Transporte: Se o exame não for realizado no mesmo dia, refrigerar a amostra

. 4.7 – Critérios de Rejeição: Hemólise e Icterícia

COLESTEROL TOTAL

1 - METODOLOGIA: Enzimático - colorimétrico.

2 - PRINCÍPIO DO TESTE: Os estéres do colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase (CHE) formando

colesterol livre que após oxidação pela colesterol oxidase (CHOD) forma peróxido de hidrogênio. Este, reagindo com o fenol e 4-aminoantipirina, através de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase (POD), produz uma quinonimina de cor vermelha. A absorvância do complexo formado, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

CHE Ésteres do Colesterol $\xrightarrow{\quad}$ Colesterol + Ácidos Graxos

CHOD Colesterol + O₂ $\xrightarrow{\quad}$ Colest-4-em-ona + H₂O₂

2H₂O₂ + Fenol + 4-Aminoantipirina $\xrightarrow{\quad}$ 4H₂O + quinoneimina

3 – APLICAÇÃO CLÍNICA: Diversos estudos epidemiológicos e experimentais comprovam uma correlação

positiva entre os níveis do colesterol, mais precisamente do colesterol LDL e o risco de doença arterial coronariana (DAC). Ao contrário, os níveis de colesterol HDL são inversamente proporcionais ao risco de DAC.

4 - AMOSTRA: 4.1 – Tipo:

Soro ou plasma. Heparina, EDTA, oxalato ou fluoreto não interferem. Analito estável 7 dias entre 2-8 oC.

4.2 – Recipiente: Frasco do laboratório previamente identificado.

4.3 – Aditivo: N.A.

4.4 – Volume mínimo: 300 µL

4.5 – Volume recomendado: 500 µL

4.6 – Transporte: Se o exame não for realizado no mesmo dia, refrigerar a amostra

4.7 – Critérios de Rejeição: Hemólise intensa e bilirrubina acima de 10 mg/dL. Lipemia (triglicérides até 1000 mg/dL) não interfere.

COLESTEROL HDL

1 - METODOLOGIA: Enzimático - colorimétrico.

2 - PRINCÍPIO DO TESTE: O sistema utiliza dois reagentes que possibilitam a dosagem seletiva do colesterol

ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL). O primeiro reagente contém um poliânion que forma complexos estáveis com a

superfície das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e dos Quilomícrons. Por outro lado, os complexos formados com as partículas de colesterol HDL não permanecem estabilizados e se solubilizam por ação de um detergente, permitindo a reação com as enzimas presentes no segundo reagente. Como somente o colesterol HDL fica sujeito à ação das enzimas, a cor resultante da segunda reação é diretamente proporcional à concentração do colesterol HDL na amostra.

3 – APLICAÇÃO CLÍNICA: Sistema para determinação homogênea direta do Colesterol HDL no soro e no

plasma. Somente para uso diagnóstico in vitro.

4 - AMOSTRA: 4.1 – Tipo:

Soro, plasma heparinizado ou com EDTA, o analito é estável por 6 dias de 2-8 °C.

- . 4.2 – Recipiente: Frasco do laboratório previamente identificado.
- . 4.3 – Aditivo: N.A.
- . 4.4 – Volume mínimo: 300 µL
- . 4.5 – Volume recomendado: 500 µL
- . 4.6 – Transporte: Se o exame não for realizado no mesmo dia, refrigerar a amostra
- . 4.7 – Critérios de Rejeição: Hemólise intensa. Lipemia pós prandial

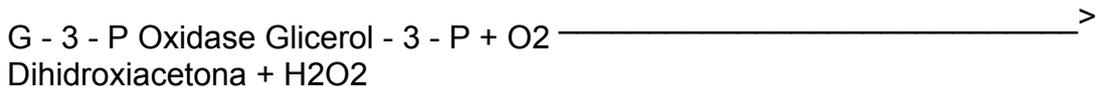
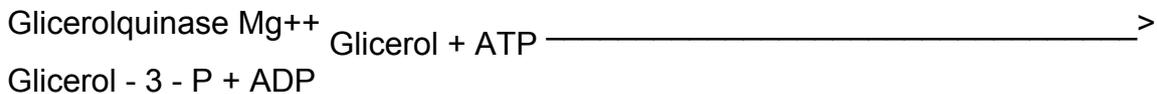
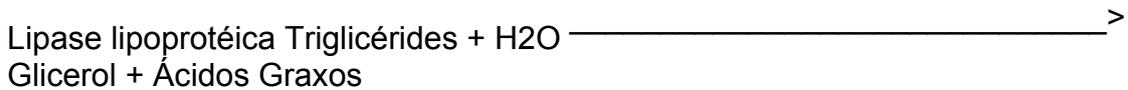
TRIGLICÉRIDES

1 - METODOLOGIA: Enzimático-colorimétrico.

2 - PRINCÍPIO DO TESTE: Os triglicérides são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e o glicerol liberado é

fosforilado pela glicerolquinase formando glicerolfosfato que é oxidado a dihidroxiacetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através de reação de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com o 4-aminoantipirina (4-AMP) e 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina (vermelha) cuja absorbância, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à

concentração de triglicérides.



3 – APLICAÇÃO CLÍNICA: A dosagem dos triglicérides é utilizada principalmente com o parâmetro na

avaliação dos riscos das doenças cardiovasculares.

4 - AMOSTRA: 4.1 – Tipo:

Soro ou plasma. O analito é estável por 5 dias entre 2-80C. Armazenamento prolongado não é recomendado porque varias substancias podem ser hidrolisadas, liberando glicerol e conseqüentemente originando resultados falsamente elevados. Os anticoagulantes heparina, EDTA, oxalato ou fluoreto não interferem no resultado. 4.2 – Recipiente:

Frasco do laboratório previamente identificado. 4.3 – Aditivo:

N.A. 4.4 – Volume mínimo:

300 µL 4.5 – Volume recomendado:

500 µL 4.6 – Transporte:

Se o exame não for realizado no mesmo dia, refrigerar a amostra 4.7 – Critérios de Rejeição: Hemólise. Jejum inferior a 12 horas.

CREATININA

1 - METODOLOGIA: Cinético-Colorimétrico.

2 - PRINCÍPIO DO TESTE: A creatinina e os interferentes presentes na amostra reagem com o picrato em

meio alcalino originando um complexo colorido. Mede-se a velocidade de formação desse complexo em períodos iniciais curtos, evitando-se assim a interferência de outros compostos.

Uma primeira leitura é realizada aos 30 segundos iniciais da reação para eliminar o efeito dos interferentes de reação rápida. Aos 90 segundos de reação é realizada uma segunda leitura, antes que os interferentes de reação lenta possam ter efeitos significativos. Dessa forma, isola-se a formação do complexo creatinina- quelante e a determinação colorimétrica do produto final torna-se livre de interferentes, referindo-se exclusivamente à creatinina presente no teste.

Os principais interferentes são representados pela glicose, frutose, ácido úrico, ácido ascórbico, corpos cetônicos e proteínas plasmáticas.

3 – APLICAÇÃO CLÍNICA: Reagentes para determinação quantitativa da creatinina no soro, plasma e urina.

Somente para uso diagnóstico in vitro.

4 - AMOSTRA: 4.1 – Tipo:

Soro ou plasma (heparina, EDTA, fluoreto, oxalato), urina e líquido amniótico o analito é estável por 7 dias de 2-8^{0C}.

4.2 – Recipiente:

Frasco do laboratório previamente identificado. 4.3 – Aditivo:

N.A. 4.4 – Volume mínimo:

300 µL 4.5 – Volume recomendado:

500 µL 4.6 – Transporte:

Se o exame não for realizado no mesmo dia, refrigerar a amostra 4.7 – Critérios de Rejeição:

Hemólise. Lipemia

HEMOGRAMA

1 - METODOLOGIA: Contador de células automático Coulter STKS, utilizando impedância e laser na

contagem e classificação das células. 2 - PRINCÍPIO DO TESTE:

O Hemograma é um exame altamente automatizado. No Laboratório Côrtes Villela, ele é realizado no equipamento STKS. Nos casos de confirmação de resultado (por exemplo, plaquetopenia, CHCM acima ou abaixo dos valores de referência, leucopenia e não concordância com os outros parâmetros hematimétricos) ou falha deste equipamento, recorreremos ao equipamento back up T-890.

O propósito do STKS é prover resultados precisos compreendendo a detecção de amostras que apresentem anormalidades e parâmetros como Hemoglobina,

Hematócrito, Hemácias, índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), RDW, contagem de plaquetas, PDW, PCT, MPV, Leucometria Global e Específica (neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos normais e monócitos).

Os contadores Coulter STKS e T-890 determinam a hemoglobina pelo método da cianometemoblobina, contam e medem os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas pela tecnologia de impedância.

O equipamento STKS produz uma contagem diferencial de leucócitos, em cinco tipos celulares baseadas em diversas características físicas dos leucócitos, depois da remoção do citoplasma. São determinadas 3 determinações simultâneas em cada célula: 1) impedância com corrente eletromagnética de baixa frequência; 2) condutividade com corrente eletromagnética de alta frequência; 3) Dispersão frontal da luz em 10 – 70º, quando as células passam por um feixe laser, determinada pela estrutura, forma e reflexividade da célula. 3 - APLICAÇÃO CLÍNICA:

O Hemograma representa um auxílio valioso no diagnóstico de várias nosologias, sendo fundamental na análise da hematopoiese medular; do grau de nutrição medular, relacionado às reservas de ferro, ácido fólico e vitamina B12, da presença de defeitos de membrana eritrocitária congênitos ou adquiridos, na investigação de infecções ou reações alérgicas, na visualização de anormalidades congênitas ou adquiridas de organelas intracelulares; invasão medular por células malignas ou agentes infecciosos. A sua realização de forma correta, com aparelhos de alta reprodutibilidade e sua análise criteriosa, por parte do clínico e do laboratório, o torna um exame indispensável na prática médica. 4 - AMOSTRA: 4.1 – Tipo:

Sangue total (em EDTA). 4.2 – Recipiente:

Tubo de ensaio com tampa de borracha. 4.3 – Aditivo:

N.A. 4.4 – Volume mínimo:

1,5 mL 4.5 – Volume recomendado:

3 mL 4.6 – Transporte:

O transporte das amostras das unidades até a matriz é realizado em caixas fechadas à temperatura, de 15oC a 25oC. 4.7 – Critério de rejeição:

Presença de coágulos ou micro-coágulos, volume inferior a 1,5 ml, lipemia e amostra hemolisada.

CÁLCIO

1 - METODOLOGIA: Arsenazo III.

2 – PRINCÍPIO DO TESTE: O cálcio reage com o arsenazo III em meio discretamente ácido formando o

complexo cálcio-arsenazo III de cor azul, cuja intensidade é diretamente

proporcional à concentração de cálcio na amostra. A absorbância do produto da reação deve ser medida nos comprimentos de onda 600 ou 660nm.

2 – APLICAÇÃO CLÍNICA: A determinação dos níveis de cálcio no sangue e urina é útil no diagnóstico e

seguimento de distúrbios no metabolismo do cálcio e também do fósforo. O cálcio é também um importante mediador do sistema hemostático do organismo.

4 – AMOSTRA: 4.1 – Tipo:

Soro (não hemolisado), plasma (heparina) e urina. Não usar plasma contendo citrato, oxalato ou EDTA.

4.2 – Recipiente: Frasco do laboratório previamente identificado.

4.3 – Aditivo: N.A.

4.4 – Volume mínimo: Usar via venosa, sem deixar o torniquete por muito tempo (isso altera a

albumina e forma-se um gradiente de concentração de cálcio ao redor do torniquete). 4.4 – Volume mínimo:

300 µL 4.5 – Volume recomendado:

500 µL 4.6 – Transporte:

Se o material não for enviado no mesmo dia, refrigerar a amostra. 4.7 – Critérios de rejeição:

Lipemia. Plasma não heparinizado. Amostra obtida por garroteamento prolongado. Amostra hemolisada.

FÓSFORO

1 - METODOLOGIA: Daly e Ertingshausen modificado.

2 - PRINCÍPIO DO TESTE: O fósforo inorgânico reage com o Molibdato de Amônio na presença de ácido

sulfúrico resultando na formação de um complexo Fosfomolibdato não reduzido. A absorbância em 340nm do complexo formado .e proporcional à concentração de Fósforo inorgânico na amostra.

3 – APLICAÇÃO CLÍNICA: A determinação de fósforo inorgânico em amostras de sangue e urina é útil na

avaliação do balanço cálcio/fósforo no organismo.

4 - AMOSTRA: 4.1 – Tipo:

Soro ou plasma (heparina), urina. 4.2 – Recipiente:

Frasco do laboratório previamente identificado. 4.3 – Aditivo:

N.A. 4.4 – Volume mínimo:

300 µL 4.5 – Volume recomendado:

500 µL 4.6 – Transporte:

Se o exame não for realizado no mesmo dia, refrigerar a amostra estável entre 2 - 8°C (no máximo 07 dias).

4.7 – Critérios de Rejeição: Hemólise.

PROTEÍNA C QUANTITATIVA ULTRA-SENSÍVEL

1 - METODOLOGIA: Imunoturbidimetria.

2 - PRINCÍPIO DO TESTE: As partículas de látex recobertas com anticorpos anti PCR humana são

aglutinadas PCR presentes na amostra. O processo de aglutinação provoca acréscimo na absorbância proporcional à concentração PCR na amostra.

3 – APLICAÇÃO CLÍNICA: A PCR é um marcador da fase aguda que se eleva especialmente em processos

inflamatórios e infecciosos. Dentre os novos marcadores cardíacos, é considerado um dos mais importantes. Trata-se da proteína que indica a inflamação dos vasos sanguíneos, causada pelo acúmulo de gordura nas artérias. Estudos recentes mostram que mesmo um discreto aumento da PCR é um fator de risco cardiovascular independente de outros já conhecidos, como níveis de colesterol e frações, apolipoproteína B-100 e homocisteína. Na avaliação de risco de doença cardiovascular, valores de PCR inferiores a 3 mg/L são considerados satisfatórios, enquanto níveis de PCR elevados se associam a maior risco cardiovascular. Este fato está de acordo com a evidência recente, que ao menos parcialmente, a aterosclerose é uma doença inflamatória. A dosagem da PCR por método ultrasensível pode contribuir tanto para a identificação de indivíduos assintomáticos com riscos de doença cardiovascular por aterosclerose, com acompanhamento de pacientes que já tenham doença cardiovascular.

4 - AMOSTRA: 4.1 – Tipo:

Soro. Após 8 horas de jejum. 4.2 – Recipiente:

Frasco do laboratório previamente identificado. 4.3 – Aditivo:

N.A. 4.4 – Volume mínimo:

100 µL 4.5 – Volume recomendado:

500 µL 4.6 – Transporte:

Se o exame não for realizado no mesmo dia, centrifugar, separar as amostras e acondicionar.

4.7 – Critérios de Rejeição: Excesso de hemólise e lipemia.

PARATORMÔNIO (PTH INTACTO)

1 - METODOLOGIA: Quimioluminescência.

2 - INTERPRETAÇÃO: O paratormônio (PTH) é um hormônio polipeptídico secretado pelas paratireóides e atua na regulação das concentrações de cálcio plasmático e no metabolismo ósseo. Como a hipocalcemia atua estimulando secreção de PTH, seus valores devem ser sempre avaliados em associação aos valores de cálcio. Sua dosagem é útil no diagnóstico diferencial das duas principais causas de hipercalcêmica (hiperparatireoidismo primário e hipercalcêmica relacionada a malignidade) estando aumentado no hiperparatireoidismo primário. No diagnóstico diferencial de hipocalcemia o PTH também pode ser utilizado. São causa de hipocalcemia: hipoparatiroidismo primário, pancreatite aguda, sepse, rhabdomiólise, deficiência de magnésio, insuficiência renal crônica, dentre outros. Pacientes com insuficiência renal crônica apresentam hiperparatireoidismo secundário.

3 - AMOSTRA: 3.1 – Tipo:

Soro. Jejum de 8 horas, colher pela manhã e informar medicamentos. Centrifugar após a coleta.

3.2 – Recipiente: Frasco do laboratório previamente identificado.

3.3 – Aditivo: N.A.

3.4 – Volume mínimo: 0.5 ml

3.5 – Volume recomendado: 1 ml

3.6 – Transporte: Enviar congelado após centrifugação o mais rápido possível.

Observação: Exame atualmente sendo enviado para realização em laboratório associado.

HEMOGLOBINA GLICOSILADA

1 - METODOLOGIA: LPLC – Cromatografia Líquida de Pressão baixa de troca iônica.

2 - PRINCÍPIO DO TESTE: Utiliza a cromatografia de permuta catiônica de baixa pressão, em conjunto com

a eluição por gradiente, para separar os subtipos e as variantes da hemoglobina humana no sangue total hemolisado. As frações de hemoglobina separadas são monitorizadas através da absorção de luz num comprimento de onda de 415nm. O cromatograma obtido é registrado e armazenado pelo computador incorporado no aparelho. Um software efetua a análise do cromatograma e produz o relatório impresso.

3 – APLICAÇÃO CLÍNICA: A hemoglobina humana no interior dos eritrócitos sofre uma reação química não

enzimática com a glicose. Crê-se que a taxa e a extensão desta reação dependem da concentração média de glicose no sangue durante a vida do eritrócito. Existem vários produtos de reação, “hemoglobinas glicadas”, que no seu conjunto se denominam HbA1. Destas, a mais abundante é a HbA1c. A relação entre HbA1c ou HbA1 e a concentração de HbA total foi sugerida como um parâmetro fiável do grau de controle metabólico em doentes diabéticos.

4 - AMOSTRA: 4.1 – Tipo:

Sangue total em EDTA. 4.2 – Recipiente:

Frasco do laboratório previamente identificado. 4.3 – Aditivo:

N.A. 4.4 – Volume mínimo:

1 ml 4.5 – Volume recomendado:

3 ml 4.6 – Transporte:

Se o exame não for realizado no mesmo dia, refrigerar a amostra estável entre 2 - 8oC (no máximo 05 dias).

4.7 – Critérios de Rejeição: Amostra coagulada.