

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES RENAIIS E ADENOSINA DEAMINASE SALIVAR EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL NA PRÉ E PÓS-HEMODIÁLISE

Idania Arcari*
Kauc Amarante Rigon**
Vanessa Stein***
Eduardo Ottobelli Chielli****

RESUMO

A doença renal é considerada um grande problema de saúde pública, causando elevadas taxas de morbidade e mortalidade principalmente em pacientes sujeitos à hemodiálise. Dessa maneira, é de suma importância a avaliação de marcadores bioquímicos como forma de avaliação e detecção precoce da Doença Renal Crônica (DRC), evitando o agravamento da doença. Analisaram-se os níveis séricos de ureia e creatinina e níveis salivares da Adenosina deaminase (ADA) em um total de 40 pacientes da Clínica Renal do Extremo-Oeste de Santa Catarina, com idade entre 19 e 60 anos. As amostras foram coletadas na pré-hemodiálise e na pós-hemodiálise. A dosagem da ADA na saliva foi realizada pelo método do salivette®, e para as dosagens de creatinina e ureia, foi coletado sangue em jejum, ambos seguiram às análises conforme o fabricante. Os resultados foram significativos quando comparados os valores da ADA salivar entre homens e mulheres na pós-hemodiálise ($p=0,05$). Quando comparados separadamente, não houve significância para o sexo feminino ($p=0,85$) nem para o sexo masculino ($p=0,37$). As dosagens de ureia e creatinina entre homens e mulheres, assim como, ureia e creatinina feminina e masculina na pré e pós-hemodiálise também obtiveram significância ($p=0,0001$). Dessa maneira, foi possível verificar que houve um aumento significativo da ADA salivar na pós-hemodiálise, evidenciando que esse processo interfere no estado imunológico-enzimático desse marcador, e que a dosagem de ADA salivar poderá servir como um biomarcador importante para verificar o estado imunológico de paciente DRC. Palavras-chave: Insuficiência renal. Hemodiálise. Adenosina deaminase. Ureia. Creatinina.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) (2012), no decorrer dos últimos anos houve um aumento significativo nas internações e tratamentos decorrentes de complicações renais, as quais resultaram no aumento de pacientes sujeitos à diálise como única forma de manter a vida. O fator comumente aos que fazem uso da diálise é a insuficiência renal (IR), tanto crônica quanto aguda, resultantes de diferentes causas e abrangendo todas as faixas etárias da população.

A doença renal é considerada um grande problema de saúde pública, porque causa elevadas taxas de morbidade e mortalidade e, além disso, tem impacto negativo sobre a qualidade de vida relacionada à saúde. No mundo, cerca de 1,2 milhão de pessoas encontra-se sob tratamento dialítico (RESENDE; SANTOS; SOUZA, 2007).

A IR, segundo Rennke e Dennker (2009), aplica-se geralmente à redução da taxa de filtração glomerular (TFG), a qual indica progressão de distúrbios subjacentes com redução da quantidade de néfrons funcionantes. Estando o paciente classificado como portador de IR se houver declínio da perfusão renal ou obstrução à eliminação da urina pelos

* Graduanda do Curso de Biomedicina pela Universidade do Oeste de Santa Catarina de São Miguel do Oeste; idania.arcari@hotmail.com

** Graduando do Curso de Biomedicina pela Universidade do Oeste de Santa Catarina de São Miguel do Oeste; kauc.rigon@gmail.com

*** Graduanda do Curso de Biomedicina pela Universidade do Oeste de Santa Catarina de São Miguel do Oeste; vani.stein@hotmail.com

**** Doutor e Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Santa Maria; Professor do Departamento de Ciências da Vida na Universidade do Oeste de Santa Catarina de São Miguel do Oeste; eduardochielli@yahoo.com.br

rins na pelve renal, nos ureteres, na bexiga ou na uretra. A doença divide-se em duas fases classificadas conforme tempo e progressão da doença: insuficiência renal aguda (IRA) e insuficiência renal crônica (IRC).

A IRC é definida como lesão do parênquima renal e/ou diminuição da TFG por período igual ou superior a três meses, evidenciada por marcadores de lesão renal, incluindo alterações sanguíneas/urinárias, exames de imagem ou histopatológicos. Em contrapartida, a IRA é definida como um aumento recente (nos últimos 30 dias) da concentração plasmática de creatinina em, no mínimo, 0,5 mg/dL, ou elevação maior que 50 acima do valor basal de creatinina sérica ou redução de depuração de creatinina (RENNKE; DENNKER, 2009).

A adenosina deaminase (ADA) atua como enzima mediadora na formação de algumas células de defesa do organismo, sendo, portanto, marcadora dos processos inflamatórios do organismo, associada, geralmente, a processos de origem infecciosa. Sua presença é necessária à manutenção da imunidade celular do organismo (BOTA et al., 2001).

Atualmente, o padrão-ouro para avaliação da função renal baseia-se nos testes de *clearance* da creatinina; esta, por sua vez, reflete de maneira mais reproduzível os valores da taxa de filtração glomerular, acompanhada da dosagem de ureia, a qual é quase que totalmente excretada pelos rins, não sendo sua dosagem isolada indicativa de lesão renal (RENNKE; DENNKER, 2009).

A detecção precoce da doença renal e as condutas terapêuticas apropriadas para o retardamento de sua progressão podem reduzir o sofrimento dos pacientes e os custos financeiros associados à DRC. Os portadores de disfunção renal leve quase sempre apresentam evolução progressiva, insidiosa e assintomática, dificultando o diagnóstico precoce da disfunção renal. Assim, a capacitação, a conscientização e a vigilância do médico de cuidados primários à saúde são essenciais para o diagnóstico e encaminhamento precoce ao nefrologista e à instituição de diretrizes apropriadas para retardar a progressão da DRC, prevenir suas complicações, modificar comorbidades presentes e possuir preparo adequado a uma terapia de substituição renal (ROMÃO JUNIOR, 2004).

Nesse contexto, as análises de marcadores bioquímicos como forma de detecção da doença renal e acompanhamento de pacientes já em tratamento são uma peça importante para esses indivíduos. A busca de novos metabólitos, mais específicos, que possam servir de marcadores da função renal, é algo essencial e cada vez mais pesquisado. Como a DRC geralmente é silenciosa, o estudo de novos marcadores, que possam indicar a fase inicial da doença em pacientes de risco é um passo importante para esse problema que acomete milhares de pessoas e que quando chega a sua fase mais avançada, leva o paciente a várias restrições no seu cotidiano, além de acarretar altos custos para o governo e de prevalecerem elevados índices mortalidade. Logo, o uso de biomarcadores com os demais testes de função renal auxilia na monitorização do tratamento, assim como acompanham as alterações que o uso dos processos de diálise provoca no organismo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo contou com uma população de 40 pacientes provenientes da Clínica Renal do Extremo-Oeste catarinense, sendo 20 mulheres e 20 homens na faixa etária entre 19 e 60 anos.

As amostras de sangue e saliva foram coletadas na própria, após a explicação da pesquisa e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); foram coletadas em dois momentos, antes e depois da realização da hemodiálise do processo de hemodiálise, o que permitiu a comparação de resultados. As coletas foram realizadas pela equipe de enfermagem da clínica sobre a supervisão dos pesquisadores.

Para a dosagem de ADA foi realizada coleta de saliva, os indivíduos foram orientados a enxaguar a boca com água três vezes; posteriormente, foi fornecido o Salivette®, que consiste em um recipiente cônico com filtro absorvente. Os participantes foram instruídos para remover o filtro e colocá-lo na boca por um período de três minutos, conforme recomendação do fabricante (Salivette tubos Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha). Na sequência, o filtro foi recolocado no recipiente para centrifugação para que seja extraída do filtro absorvente a saliva e em seguida possa ser utilizada para a dosagem da atividade da ADA. Para a dosagem de creatinina e ureia, foi coletado sangue total por punção venosa. O sangue foi imediatamente colocado em tubo com gel separador e foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm para a obtenção do soro.

2.1 DOSAGEM DE UREIA E CREATININA

As dosagens de ureia e creatinina séricas foram determinadas em amostras de soro, conforme técnicas estabelecidas pelo fabricante (LABTEST Diagnóstica).

2.2 DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ADENOSINA DEMANINASE SALIVAR

A dosagem da ADA salivar foi determinada em amostra de saliva conforme técnicas estabelecidas pelo fabricante EBRAM, utilizando-se a metodologia de desaminação enzimática.

O ensaio de ADA sérica está baseado na desaminação enzimática de adenosina à inosina que é convertido a hipoxantina através da fosforilase do nucleosídeo purina. A hipoxantina é convertida, então, a ácido úrico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio da xantina oxidase. O H_2O_2 reage mais adiante com N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina e 4-aminoantipirina na presença de peroxidase para gerar pigmento de quinona, que é monitorado de maneira cinética. A unidade de ADA está definida como a quantia de ADA que gera um umol de inosina da adenosina por minuto à temperatura de 37 °C.

2.3 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados estatisticamente com o auxílio do *software* PRISMA 5.0. A normalidade dos resultados foi verificada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Utilizaram-se os testes t-Student para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos, considerando significativos os resultados com $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

A comparação entre as determinações laboratoriais encontra-se disponíveis nas Tabelas 1, 2 e 3. A normalidade dos resultados foi verificada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Para os dados que apresentaram distribuição normal (creatinina e ureia), foi utilizado o teste t-student para ver a comparação entre os grupos, e para os dados não paramétricos (ADA) foi utilizado o teste Mann-Whitney.

Analizou-se um total de 40 amostras de pacientes em hemodiálise, dos quais 20 eram do sexo masculino e 20 do sexo feminino. A faixa etária do estudo foi de 19 a 60 anos.

Tabela 1 – Comparação das análises laboratoriais na pré e pós-hemodiálise

	Pré-hemodiálise (n=40)	Pós-hemodiálise (n=40)	P
ADA (U/L)	2.8 + 0.5	3.4 + 0.5	0,05
Ureia (mg/dL)	123,8 + 4,6	43,5 + 2,5	0,0001
Creatinina (mg/dL)	9,7 + 0,5	4,2 + 0,3	0,0001

Fonte: os autores.

Notas: Considera-se diferença significativa quando $p < 0,05$. Os dados são expressos em médias e desvio padrão.

Conforme Tabela 1, nas dosagens de creatinina e ureia houve diferença significativa em ambos os sexos. Creatinina apresentou uma média de 9,7 mg/dL \pm 0,5 na pré-hemodiálise e 4,2 mg/dL \pm 0,3 na pós-hemodiálise ($p=0,0001$). A ureia apresentou uma média de 123,8 mg/dL \pm 4,6 na pré-hemodiálise e 43,5 mg/dL \pm 2,5 na pós-hemodiálise ($p=0,0001$). Também houve diferença significativa entre os resultados da ADA salivar pré-hemodiálise e pós-hemodiálise quando comparados homens e mulheres ($p=0,05$), observando-se uma média de 2.8 U/L \pm 0.5 na pré e 3.4 U/L \pm 0.5 na pós-hemodiálise.

Tabela 2 – Comparação de ureia, creatinina e ADA salivar feminina na pré e na pós-hemodiálise

	Pré-hemodiálise feminino (n=40)	Pós-hemodiálise feminino (n=40)	P
ADA (U/L)	2.7 + 0.6	2.5 + 0.2	0,85
Ureia (mg/dL)	129 + 6.5	44 + 3.9	0,0001
Creatinina (mg/dL)	9.5 + 0.6	4.1 + 0,3	0,0001

Fonte: os autores.

Notas: Considera-se diferença significativa quando $p < 0,05$. Os dados são expressos em médias e desvio padrão.

No sexo feminino, a dosagem de ureia apresentou diferença significativa ($p=0,0001$), em que se têm 129 mg/dL \pm 6.5 na pré-hemodiálise e 44 mg/dL \pm 3.9 na pós-hemodiálise. O mesmo vale para a dosagem de creatinina ($p=0,0001$), em que se obtiveram 9.5 mg/dL \pm 0.6 na pré-hemodiálise e 4.1 mg/dL \pm 0.3 na pós-hemodiálise. Na comparação entre pré-hemodiálise e pós-hemodiálise de ADA salivar feminino não houve diferença significativa ($p=0.85$), observando-se uma média de 2.7 U/L \pm 0,6 na pré e de 2.5 U/L \pm 0.2 na pós-hemodiálise (Tabela 2)

Tabela 3 – Comparação de ureia, creatinina e ADA salivar masculina na pré e na pós-hemodiálise

	Pré-hemodiálise masculino (n=40)	Pós-hemodiálise masculino (n=40)	P
ADA (U/L)	3.1 + 0.9	4.3 + 1.0	0.37
Ureia (mg/dLm)	118 + 6.5	49 + 2.9	0,0001
Creatinina (mg/dL)	9,9 + 0.7	4.3 + 0.3	0,0001

Fonte: os autores.

Notas: Considera-se diferença significativa quando $p < 0,05$. Os dados são expressos em médias e desvio padrão.

As dosagens da creatinina apresentaram diferença significativa para o sexo masculino ($p=0,0001$), em que se têm 9.9 mg/dL \pm 0.7 na pré-hemodiálise e 4.3 mg/dL \pm 0.3 na pós-hemodiálise; o mesmo ocorre com as dosagens de ureia ($p=0,0001$), com uma média de 118 mg/dL \pm 6.5 na pré-hemodiálise e 49 mg/dL \pm 2.9 na pós-hemodiálise. Na comparação das dosagens pré e pós-hemodiálise de ADA salivar masculina, não houve diferença significativa ($p=0.37$), observando-se uma média de 3.1 U/L \pm 0.9 na pré e de 4.3 U/L \pm 1.0 na pós (Tabela 3).

4 DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisados os biomarcadores renais referentes à creatinina e ureia sérica, com dosagem concomitante do biomarcador inflamatório ADA na saliva, a fim de se avaliar o estado inflamatório dos pacientes e a eficácia da diálise, por meio da comparação dos resultados na pré-hemodiálise e pós-hemodiálise, respectivamente.

A saliva é um fluido essencial necessário para a manutenção do equilíbrio fisiológico na cavidade oral; tem sido amplamente utilizada para estudar uma variedade de moléculas e substâncias bioquímicas. É uma amostra prontamente disponível, que pode ser recolhida por procedimentos não invasivos, e contém muitos hormônios, drogas e anticorpos de interesse na triagem e diagnóstico laboratorial (SARACOGLU et al., 2005).

Avaliou-se a atividade da ADA em amostras de saliva de pacientes com DRC. O resultado foi significativo quando comparados os valores da ADA salivar entre homens e mulheres na pós-hemodiálise (Tabela 1). No sexo masculino houve um aumento maior da atividade da ADA em comparação com o sexo feminino, no entanto esses resultados não apresentaram diferença significativa (Tabelas 2 e 3); dessa forma, pode-se sugerir que o aumento da ADA salivar é dependente do gênero, pois o sexo masculino apresenta maior número de células imunológicas e eritrócitos.

Em virtude de a ADA ser uma enzima importante e que participa do metabolismo das purinas e do DNA, atua como importante avaliadora do estado inflamatório dos pacientes já que está envolvida no desenvolvimento de linfócitos B e T, sugerindo que após o processo de hemodiálise ocorra ativação do sistema imunológico e consequente aumento dos marcadores inflamatórios na circulação, o que diretamente influencia no aumento destes na saliva.

O estado inflamatório crônico dos pacientes com DRC em hemodiálise pode ser atribuído à constante ativação de monócitos e neutrófilos circulantes durante a passagem do sangue através do circuito de diálise, à transferência de endotoxinas da membrana do capilar de diálise para o sangue, à ativação de citocinas inflamatórias e pró-inflamatórias

e, principalmente, a alterações endoteliais. As células endoteliais são ativadas em decorrência da expressão de moléculas de adesão celular que se ligam aos leucócitos e migram para os tecidos inflamados (ALVES; TEIXEIRA; MARTINO, 2010), aumentando o processo inflamatório e elevando os biomarcadores.

Em um estudo realizado por Balwant et al. (2010) com 50 pacientes com carcinoma de células escamosas de língua em fase I, II e III e 30 indivíduos normais, encontrou-se níveis de ADA salivar significativamente maiores nos pacientes em relação aos controles. Além disso, houve um aumento estatisticamente significativo no nível sérico de ADA, visto que o estágio da doença progrediu da fase I para a fase III. Valores de ADA salivares foram maiores nos casos com estágio III da doença, quando comparados aos pacientes com estágios I e II. O aumento da atividade desta enzima pode sugerir que o metabolismo das purinas e sua atividade na via de nucleotídeos são acelerados nos tecidos orais humanos cancerosos.

Foram igualmente analisados neste estudo os marcadores da função renal, entre eles a ureia e a creatinina, ambas atuando como método de controle do tratamento, avaliando a progressão ou regressão da doença.

Os valores de creatinina e ureia encontram-se elevados na pré-hemodiálise em ambos os grupos, confirmando os resultados esperados, em razão da lesão renal existente. A ureia é um composto resultante da degradação das proteínas e acumula-se no sangue nos casos IR, é responsável pelos quadros de uremia e tem sua concentração sérica aumentada à medida que a taxa de filtração renal reduz (SOUZA et al., 2011). Após a hemodiálise seus valores retornaram a índices normais, demonstrando que o processo hemodialítico é eficiente para a remoção de compostos indesejados. Durante a hemodiálise, o excesso de ureia é parcialmente retirado, sendo necessário acompanhamento nutricional com controle do nível proteico ingerido na dieta, evitando que a quantidade de ureia na pré-hemodiálise alcance níveis extremos diminuindo a capacidade de filtração da hemodiálise e impossibilitando que seus valores retornem a níveis seguros (DRACZEWSKI; TEIXEIRA, 2011).

Em um estudo paralelo realizado por Draczevski e Teixeira (2011), que avaliou os valores de ureia na pré e pós-hemodiálise, houve diminuição significativa dos níveis séricos da ureia, demonstrando que esse processo se mostra eficiente, correlacionando-se aos resultados obtidos no presente estudo.

A hemodiálise mostrou-se também eficiente em relação à diminuição dos valores de creatinina, porém estes ainda permaneceram acima dos valores de referência considerados seguros aos indivíduos em geral. A concentração de creatinina sérica é utilizada como um indicativo para função renal, entretanto é considerada um método pouco sensível em decorrência de vários interferentes que afetam o seu resultado, como massa muscular, desnutrição, ingestão excessiva de carnes cozidas, medicamentos que podem interferir na secreção tubular, idade, sexo, raça e a técnica de dosagem laboratorial. Por isso da importância de algum exame adicional à dosagem de creatinina, pela variabilidade individual dos pacientes (DRACZEWSKI; TEIXEIRA, 2011).

De modo geral, as dosagens bioquímicas mostraram-se diminuídas na pós hemodiálise, confirmando a eficácia da diálise, enquanto que a ADA em diferentes grupos apresentou elevação de seus índices, sugerindo que uma possível ativação do sistema imunológico é ocasionada pelo contato mecânico com a máquina de hemodiálise; no entanto, entre prós e contras, os achados inflamatórios, se ocasionados pela hemodiálise não diminuem a importância e as vantagens do processo hemodialítico, sendo este atualmente a melhor opção para substituição renal dos pacientes enquanto no aguardo de um transplante renal.

5 CONCLUSÃO

Houve um aumento significativo da ADA salivar na pós-hemodiálise, sugerindo que este processo interfere no estado imunológico-enzimático deste marcador. A dosagem de ADA salivar pode ser considerada um biomarcador importante para verificar o estado imunológico de paciente DRC; no entanto, cabe ressaltar a necessidade de maiores estudos para esclarecimento aprofundado das rotas metabólicas e interações que esta enzima pode sofrer no organismo de pacientes DRC e em processo hemodialítico.

Em relação aos biomarcadores creatinina e ureia, pode-se ressaltar que apresentam diminuição de seus valores na pós-hemodiálise, demonstrando a eficácia da hemodiálise na remoção de compostos nitrogenados, principalmente a ureia, que se não eliminada ocasiona a danos ao organismo.

Evaluation of kidney and biomarkers salivary and adenosine deaminase in patients with kidney disease in pre and post-hemodialysis

Abstract

The kidney disease is considered a major public health problem, causing high rates of morbidity and mortality especially in patients undergoing hemodialysis. Thus, it is of paramount importance the evaluation of biochemical markers as a way of assessment and early detection of Chronic Kidney Disease (CKD), preventing the disease from worsening. We analyzed the serum levels of urea and creatinine and salivary levels of adenosine deaminase (ADA) in a total of 40 patients of Clínica Renal do Extremo-Oeste de Santa Catarina, aged between 19 and 60 years. The samples were collected in pre-hemodialysis and post-hemodialysis. The ADA determination in saliva was performed by the method Salivette®, and for the measurements of creatinine and urea, fasting blood was collected, both followed the analysis according to the manufacturer. The results were significant when compared to the values of salivary ADA between men and women in post-hemodialysis ($p=0.05$). When compared separately, there was no significance for females ($p=0.85$) nor for males ($p=0.37$). The dosage of urea and creatinine for men and women, as well as urea and creatinine in male and female pre- and post-hemodialysis also reached significance ($p=0.0001$). Thus, we found that there was a significant increase in salivary ADA in post-hemodialysis, indicating that this process interferes in the immune-enzymatic status of this marker, and that the dosage of salivary ADA may serve as an important biomarker to check immune status of CKD patient.

Keywords: Renal insufficiency. Hemodialysis. Adenosine deaminase. Urea. Creatinine.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C. M. P.; TEIXEIRA, M. do C. B.; MARTINO, M. C. de. Dosagem de marcadores de lesão endotelial em pacientes com doença renal crônica em hemodiálise. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 207-214, jun. 2010.
- BALWANT, R et al. Adenosine deaminase in saliva as a diagnostic marker of squamous cell carcinoma of tongue. **Clinical Oral Investigations**, Apr. 2010.
- BOTA, A. et al. Production and certification of an enzyme reference material for adenosine deaminase 1 (BCR 647). **International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine**, v. 306, p. 79-89, 2001.
- DRACZEWSKI, L.; TEIXEIRA, M. L. avaliação do perfil bioquímico e parâmetros hematológicos em pacientes submetidos à hemodiálise. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 15-22, jan./abr. 2011.
- JUNIOR, J. E. R. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 3, ago. 2004.
- RENNKE, H. G.; DENNKER, B. M. **Fisiopatologia renal: princípios básicos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2009.
- RESENDE, M. C. de et al. Atendimento psicológico a pacientes com insuficiência renal crônica: em busca de ajustamento psicológico. **Revista Brasileira de Psicologia clínica**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 87-99, 2007.
- SARACOGLU, U. et al. Adenosine deaminase and 5'-nucleotidase activities in saliva from patients with oral and laryngeal cancer. **Oral Diseases**, v. 11, p. 323-325, Feb. 2005.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Censo de diálise SBN 2012**. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/pdf/publico2012.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2013.
- SOUZA, C. et. al. Avaliação das dosagens de ureia pré e pós-hemodiálise em uma unidade de saúde. **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde**, Aracaju, v. 13, n. 13, p. 11-17, jan./jun. 2011.