



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

↳ Instituto de Ciências da Saúde

## ERITROPOIESE E INFLAMAÇÃO EM DOENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL E/OU COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública -  
Especialidade em Hematologia e Imunohemoterapia

Por

Ana Maria Pereira Fernandes

Novembro, 2011



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
↳ Instituto de Ciências da Saúde

## ERITROPOIESE E INFLAMAÇÃO EM DOENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL E/OU COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública - Especialidade em Hematologia e Imunohemoterapia

Por

Ana Maria Pereira Fernandes

Sob orientação de:

Professor Doutor Elísio Manuel de Sousa Costa  
Dra. Carla Conceição Lemos Oliveira Castro Costa

Novembro, 2011



## Índice

AGRADECIMENTOS .....	I
RESUMO.....	II
ABSTRACT .....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS .....	VI
LISTA DE FIGURAS .....	VII
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO .....	1
1. ERITROPOIESE .....	2
1.1 PAPEL DA ERITROPOIETINA NA REGULAÇÃO DA ERITROPOIESE.....	3
2. METABOLISMO DO FERRO .....	6
2.1. MECANISMOS REGULATÓRIOS .....	6
2.1.1. <i>Absorção do ferro</i> .....	6
2.1.2. <i>Captção e internalização apical no enterócito</i> .....	6
2.1.3. <i>Transporte para o plasma</i> .....	8
2.1.4. <i>Transporte e entrada do ferro no eritroblasto</i> .....	8
3. METABOLISMO DA VITAMINA B12 E DO ÁCIDO FÓLICO.....	9
3.1. ÁCIDO FÓLICO .....	9
3.1.1. <i>Absorção e Metabolismo</i> .....	9
3.2. VITAMINA B12 OU COBALAMINA .....	11
3.2.1. <i>Metabolismo</i> .....	12
4. DOENÇA RENAL .....	14
4.1. DEFINIÇÃO E DESCRIÇÃO DA DOENÇA RENAL .....	14
4.2. ORIGEM ETIOLÓGICA E CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA RENAL .....	14
4.3. COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS À DOENÇA RENAL .....	15
5. DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	17
5.1. DEFINIÇÃO E DESCRIÇÃO DA DIABETES MELLITUS.....	17
5.2. CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DA DIABETES MELLITUS.....	17
5.3. COMPLICAÇÕES CRÓNICAS DA DIABETES MELLITUS .....	18
6. INFLAMAÇÃO .....	20
CAPÍTULO II – OBJECTIVOS.....	23
CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
1. AMOSTRAS .....	26
2. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	26
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
CAPÍTULO IV – RESULTADOS.....	28
CAPÍTULO V – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	40
CAPÍTULO VII - BIBLIOGRAFIA .....	44

## **AGRADECIMENTOS**

A conclusão desta tese representa um grande marco na minha vida. Uma enorme conquista pessoal e profissional, que só pôde ser realizada com a valiosa colaboração de amigos e familiares.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Elísio Costa, pelo seu espírito de entrega no apoio no mundo dos números e da, pelas suas palavras, pela paciência, apoio e incentivo em todos os momentos, principalmente naqueles em que a minha vontade foi apagar tudo e esquecer que algum dia comecei este trabalho.

À minha orientadora, Dra. Carla Costa pelo apoio na elaboração e orientação da dissertação e nas necessárias reflexões e pelo excelente exemplo de dedicação e profissionalismo.

Ao Hospital Santa Maria Maior, E.P.E., Barcelos, pela disponibilidade que me proporcionou, sem o qual não teria sido possível desenvolver esta dissertação.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos e escolha. Agradeço todo o esforço para me proporcionarem uma educação de qualidade, e por me abrirem um mundo de possibilidades do qual posso agora desfrutar. Obrigada por serem exemplos de força, carácter, dignidade, companheirismo e amor.

Ao Carlos, o meu companheiro do bom e do mau, que no seu modo discreto de acompanhar o trabalho, me transmitiu a vontade, a necessidade e o exemplo de se terminar um projecto iniciado, ultrapassando qualquer adversidade que possa surgir.

Aos meus amigos por me terem apoiado e compreendido a ausência e a pouca disponibilidade.

## RESUMO

Neste trabalho foram estudadas as alterações eritropoiéticas e inflamatórias associados com doença renal (DR) e/ou com Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), assim como a relação entre as alterações eritropoiéticas e o grau de inflamação em indivíduos saudáveis e, em indivíduos com patologia associada.

Quinhentos e oitenta e oito indivíduos portugueses foram incluídos neste estudo: 349 doentes com DM2, 69 doentes com DR, 73 doentes com DR e DM2 e 97 controlos saudáveis. A todos, para além de se registar a idade e o sexo, foi efectuado um hemograma completo, incluindo a contagem diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas, índices hematopoiéticos, determinação dos níveis séricos de glicose, ureia, creatinina, ferro, capacidade total de fixação de ferro, transferrina, proteína C reactiva (PCR), vitamina B12, ácido fólico e a determinação da velocidade de sedimentação (VS).

Quando comparados com os controlos, os doentes com DM2 apresentam aumento na concentração de glicose sérica, e aumento nos marcadores inflamatórios e de insuficiência renal. Os DR apresentam aumento nos marcadores de insuficiência renais e inflamatórios, e diminuição da concentração de hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos. Os DR com DM2 apresentam um aumento significativo na concentração de glicose, marcadores de insuficiência renal e inflamatórios, e uma diminuição na concentração de hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos. No grupo controlo encontramos uma correlação significativa entre a hemoglobina e a creatinina ( $r=0.219$ ;  $p=0.031$ ) e uma correlação negativa entre a hemoglobina e a PCR ( $r=-0.335$ ;  $p=0.012$ ). Nos doentes com DM2 encontramos correlação significativa entre a idade e a transferrina ( $r=-0.239$ ;  $p=0.006$ ), entre a contagem de neutrófilos e o ferro sérico ( $r=-0.203$ ;  $p=0.014$ ), entre a hemoglobina e a PCR ( $r=-0.276$ ;  $p<0.001$ ), entre o volume globular médio (VGM) e a creatinina ( $r=0.134$ ;  $p=0.012$ ), e entre o ferro sérico e a PCR ( $r=-0.275$ ;  $p=0.002$ ). Nos DR existe uma correlação entre a contagem de neutrófilos e a ureia ( $r=0.281$ ;  $p=0.019$ ) e entre a VS e a ureia ( $r=0.384$ ;  $p=0.040$ ). Nos DR com DM2 encontramos uma correlação entre a idade e a contagem de neutrófilos ( $r=0.286$ ;  $p=0.014$ ) e entre a contagem de neutrófilos e o ferro sérico ( $r=-0.338$ ;  $p=0.041$ ).

Em conclusão, os nossos resultados demonstram que tanto os DR como os doentes com DM2 apresentam alterações eritropoiéticas, que poderão estar associadas com o processo inflamatório. Mais estudos serão necessários para esclarecer a origem do processo inflamatório, nestes doentes e a sua influência no prognóstico da DR e de DM2.

## ABSTRACT

In this work we studied the erythropoietic, and inflammatory changes associated with kidney disease (KD) and/or with diabetes *mellitus* type 2 (DM2), as well as correlations between the erythropoietic changes and the degree of inflammation in healthy individuals and individuals with associated pathologies.

Five hundred and eighty-eight Portuguese individuals were included in this study: 349 DM2 patients, 69 KD patients, 73 KD patients with DM2 and 97 healthy controls. In all, age and sex has been recording, and full blood counts, including differential leukocyte counts, platelet counts, hematological indices and serum levels of glucose, urea, creatinine, iron, total iron-binding capacity (TIBC), transferrin, C-reactive protein (CRP), vitamin B12, folic acid and determination of erythrocyte sedimentation rate (ESR) were also performed.

Compared with controls, DM2 patients presented an increased glucose serum levels and increase in inflammatory and renal failure markers. KD showed an increase renal failure and inflammation markers, and decreased hemoglobin concentration, hematocrit and erythrocyte counts. KD patients with DM2 have a significant increase in glucose concentration, and increased renal failure and inflammation markers, and a decrease in hemoglobin concentration, hematocrit and erythrocyte counts. In the control group, we found a significant correlation between hemoglobin and creatinine ( $r=0.219$ ;  $p=0.031$ ) and a negative correlation between hemoglobin and CRP ( $r=-0.335$ ;  $p=0.012$ ). In DM2 patients we found a significant correlation between age and transferrin ( $r=-0.239$ ;  $p=0.006$ ), between neutrophil counts and serum iron ( $r=-0.203$ ;  $p=0.014$ ), between hemoglobin and CRP ( $r=-0.276$ ;  $p<0.001$ ), between MCV and creatinine ( $r=0.134$ ;  $p=0.012$ ), and between serum iron and CRP ( $r=-0.275$ ;  $p=0.002$ ). In KD, we found a correlation between neutrophil counts and urea ( $r=0.281$ ;  $p=0.019$ ) and between VS and urea ( $r=0.384$ ;  $p=0.040$ ). KD patients with DM2 showed a correlation between age and neutrophil count ( $r=0.286$ ;  $p=0.014$ ) and between the neutrophil count and serum iron ( $r=-0.338$ ;  $p=0.041$ ).

In conclusion, our results showed that both KD and DM2 patients presented erythropoietic changes, which must be associated with the inflammatory process. Further studies are required in order to clarify the exact origin of the inflammatory process in these patients and their influences one in the prognosis of KD and DM2.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
BFU-E	Unidade formadora de colónia eritróide burst
CFU-E	Unidade formadora de colónias eritróides
CHGM	Concentração da hemoglobina globular média
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMT-1	Transportador de metal divalente 1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DR	Doença renal
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
EPO	Eritropoietina
EPOhr	Eritropoietina Humana recombinante
EPOR	Receptor de eritropoietina
FBPs	<i>Folate binding proteins</i>
Fe	Ferro
FI	Factor intrínseco
FPT	Ferroportina
GM-CSF	Factor estimulador de colónia granulócitos-monócitos
H1R	Receptor da histamina 1
HCP-1	Proteína transportadora do heme 1
HGM	Hemoglobina globular média
HIF	<i>Hypoxia inducible transcription factor</i>
HO-1	hemeoxigenase 1
Holo-Tc	Complexo Tc-cobalamina
HRE	<i>Hypoxia response element</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
JAK2	Janus quinase 2
5-metil-THF	5-metil-tetrahidrofolato
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
O <sub>2</sub>	Oxigénio
PCR	Proteína C reactiva
PHDs	<i>Prolyl-hydroxylase</i>

## Eritropoiese e inflamação em doentes com IR e/ou com DM2

pVHL	Proteína von Hippel-Lindau
RDW	<i>Red blood cells distribution</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
STEAP3	<i>Six-transmembrane epithelial antigen of prostate</i>
Tc I	Transcobalamina I
Tc III	Transcobalamina III
TfR-1	Receptor da transferrina 1
TNF	Factor de necrose tumoral
TNF- $\alpha$	Factor de necrose tumoral $\alpha$
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VS	Velocidade de sedimentação
VGM	Volume globular médio

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estádios da Doença Renal.....	14
Tabela 2. Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico e marcadores inflamatórios nos diferentes grupos de patologias.....	30
Tabela 3. Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico e marcadores inflamatórios por grupos de patologia e género. ....	31
Tabela 4. Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico e marcadores inflamatórios nos indivíduos controlos, estratificado por sexo e idade.....	32
Tabela 5. Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico, marcadores inflamatórios nos doentes com DM2, estratificado por sexo e idade.....	34
Tabela 6. Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico e marcadores inflamatórios nos DR, estratificados por sexo e idade. ....	36
Tabela 7. Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico e marcadores inflamatórios nos DR com DM2, estratificado por sexo e idade.....	39

## LISTA DE FIGURAS

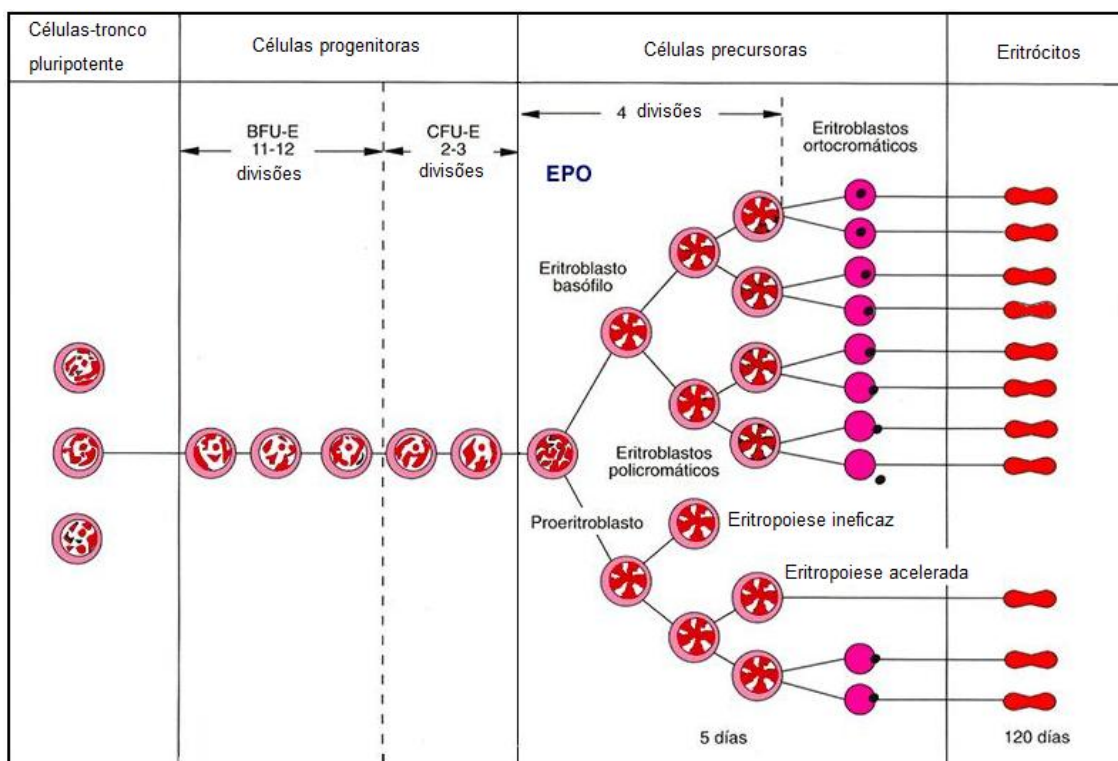
Figura 1. Representação esquemática das diferentes etapas da diferenciação eritróide..	2
Figura 2. Esquema representativo da acção da EPO na diferenciação e proliferação da linha eritróide.	4
Figura 3. Esquema representativo do enterócito e das proteínas envolvidas na absorção do ferro.	7
Figura 4. Estrutura química da vitamina B12 ou cobalamina.	11
Figura 5. Correlação significativa entre a Hb e a creatinina (A) e entre a concentração de Hb e a PCR (B), no grupo controlo.	33
Figura 6. Correlação significativa entre: (A) idade e a transferrina; (B) contagem de neutrófilos e o ferro sérico; (C) concentração de Hb e a PCR; (D) VGM e a creatinina, nos doentes com DM2.	35
Figura 7. Correlação significativa entre o ferro sérico e a PCR, nos doentes com DM2.	35
Figura 8. Correlação significativa entre a contagem de neutrófilos e a ureia (A); entre os valores de VS e ureia, no grupo de doentes com DR.	37
Figura 9. Correlação significativa entre a idade e a contagem de neutrófilos (A); e entre a contagem de neutrófilos e o ferro sérico (B), nos DR com DM2.	39

## **Capítulo I – Introdução**

# 1. Eritropoiese

Os eritrócitos são as células circulantes mais abundantes, representando cerca de 99% das células que circulam na corrente sanguínea, e representam 40% a 45% do volume total de sangue. Um indivíduo saudável tem aproximadamente 5 litros de sangue, o que representa cerca de  $2,5 \times 10^{13}$  eritrócitos, que é a quantidade necessária para o transporte de oxigénio para sustentar a respiração aeróbia. Estas células não apresentam núcleo nem organelos, mas estão abastecidas de hemoglobina para transportar oxigénio dos pulmões para os tecidos e remover o dióxido de carbono. A semi-vida do eritrócito é de aproximadamente 100 a 120 dias, com uma perda diária entre 0,8% a 1,0% dos eritrócitos circulantes. Para responder a estas perdas, a medula óssea normal produz aproximadamente  $2,5 \times 10^{11}$  células/dia (Munõz, 2009).

A eritropoiese é um processo fisiológico complexo, que se inicia com o comprometimento das células-tronco pluripotentes, formando a primeira unidade formadora de colónias eritróides – burst (BFU-E). Estas, posteriormente transformam-se em unidades unidade formadora de colónias eritróides (CFU-E), depois em células precursoras e, finalmente o eritrócito maduro (Elliott, 2008; Felli, 2009) (figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática das diferentes etapas da diferenciação eritróide. BFU-E, unidade de ruptura de formação de eritróides; CFU-E, unidade formadora de colónias eritróides (adaptado de [www.misodor.com/images/wegwrtg.jpg](http://www.misodor.com/images/wegwrtg.jpg)).

A primeira etapa de diferenciação e proliferação das células progenitoras está já comprometida com a linhagem eritróide BFU-E. As BFU-Es humanas são definidas pela sua capacidade de formar grandes "explosões" de colónias de eritroblastos ou uma colónia muito grande de eritroblastos após 7-14 dias em meio de cultura semi-sólido. As "explosões" eritróides podem conter mais de mil eritroblastos e, assim, um único BFU-E e seus

descendentes, podem ter dez ou mais etapas de divisão celular antes de chegar à fase terminal pós-mitótica de diferenciação. A segunda etapa de diferenciação eritróide compreende as fases posteriores à eritropoiese (pró-eritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos ortocromáticos e policromáticos). Estas podem ser diferenciadas pela sua histologia em preparações coradas. A terceira fase da diferenciação eritróide consiste na maturação dos reticulócitos em eritrócitos (Wickrema, 2009).

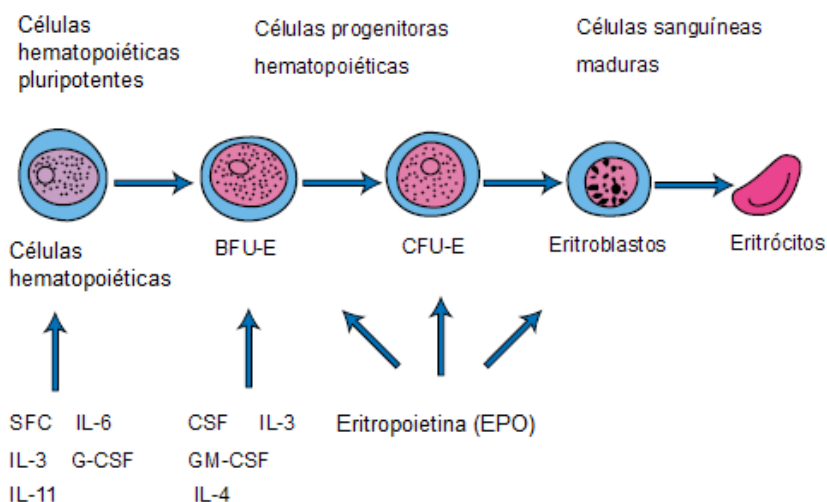
A proliferação e diferenciação normal de células progenitoras eritróides requerem vários nutrientes, tais como ferro, ácido fólico e vitamina B12, a interacção com as células do estroma medular e a estimulação pela eritropoietina (EPO) e, também, vários factores de crescimento e citocinas, entre os quais, trombopoietina, interleucina (IL) -3, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, e pelo factor estimulador de colónia granulócitos-monócitos (GM-CSF) (Wickrema, 2009).

### *1.1 Papel da Eritropoietina na regulação da eritropoiese*

Em 1906, Carnot e Deflandre (Fried, 2009) sugeriram que a produção de eritrócitos era regulada por um mecanismo humoral relacionado com a oxigenação de sangue através de um factor intermediário que estimula na eritropoiese, ao qual chamaram “hemopoiatina”. Para testar essa hipótese demonstraram que ao injectarem o plasma de coelhos anémicos em coelhos normais, o número de eritrócitos aumentava no sangue periférico. (Fried, 2009).

Mais tarde, em 1948 Bondsdorff e Jalavisto verificaram que este factor humoral influenciava apenas a linha eritróide, renomeando a “hemopoiatina” de Carnot e Deflandre, com o nome actual de “Eritropoietina”. Em 1976, Goldwasser e a sua equipa purificaram esta hormona a partir da urina e, em 1983, o gene da EPO foi clonado e sequenciado, o que possibilitou que mais tarde pudesse ser produzida a forma recombinante desta proteína. Actualmente a EPO humana recombinante (EPOhr) é usada para o tratamento da anemia de diferentes etiologias, nomeadamente no tratamento da insuficiência renal crónica, doenças hematológicas, neoplasias, linfomas, mielomas múltiplos, entre outras. Actuando sobre o receptor da EPO, do mesmo modo que a EPO nativa, a EPOhr activa as vias de sinalização que estimulam a eritropoiese e inibe a apoptose dos progenitores eritróides (Yoshimura, 1996).

A EPO é uma hormona glicoprotéica de 30.4 kDa, 40% da qual é atribuído ao seu conteúdo em carboidratos. É produzida pelos rins (90%) e pelo fígado (10%), e tem como principal função regular a eritropoiese, actuando nas células precursoras eritróides da medula óssea estimulando a sua proliferação e diferenciação (figura 2) (Byts, 2009).



**Figura 2.** Esquema representativo da acção da EPO na diferenciação e proliferação da linha eritróide (adaptado de Akihiko, 1996).

O gene da EPO está localizado no cromossoma 7, apresenta com 5.4 kb do DNA genómico, que codifica uma cadeia polipeptídica com 193 aminoácidos. Durante a produção e secreção da EPO, um peptídeo 166 aminoácidos é inicialmente gerado após a clivagem de 27 aminoácidos no N-terminal. Uma arginina carboxi-terminal na posição 166 é posteriormente removida sendo a EPO em circulação composta por 165 aminoácidos. A remoção da arginina terminal ocorre tanto na proteína humana, como na sua forma recombinante. A estrutura tridimensional da EPO foi determinada em 1998 por Cheetham *et al.* (Maiese, 2005), apresentando 4 hélices alfa com uma orientação “up-up-down-down”. Duas das hélices anti-paralelas estão ligadas por uma ponte dissulfureto entre a Cys7 e Cys161 enquanto as outras duas hélices estão ligadas por uma pequena ansa.

A síntese de EPO é regulada por mecanismos sensíveis ao oxigénio. Em resposta à hipóxia (baixa tensão de oxigénio nos tecidos) a produção de EPO aumenta em algumas horas. A hipóxia induz a expressão do gene da EPO através da activação transcripcional e estabilização do mRNA como resultado directo da activação do HIF (HIF - *hypoxia-inducible transcription factor*), que é um factor de transcrição que se liga ao elemento de resposta à hipóxia na extremidade 3' do gene da EPO e induz a sua expressão (Ebert, 1999).

A produção e activação do HIF é regulada a nível da sua cadeia  $\alpha$ , por dois mecanismos dependentes do oxigénio (Al-Sheikh, 2008). No primeiro mecanismo, dois resíduos conservados de prolina localizados no domínio de degradação dependente do oxigénio sofrem hidroxilação por acção de proteínas com domínio *prolyl-hydroxylase* (PHDs), o que permite a interacção da cadeia  $\alpha$  com a proteína von Hippel-Lindau (pVHL), um componente de uma ligase da ubiquitina. A subsequente ubiquitinação leva à degradação do HIF- $\alpha$  pelo proteossoma. No segundo mecanismo, um resíduo de asparagina (Asn803) é hidroxilado pelo factor de inibição do HIF 1 (HIF1), e a actividade do HIF é reprimida ao impedir a ligação do co-activador de transcrição p300/CBP. As PHDs e o HIF1 usam o oxigénio como co-substrato, por isso uma diminuição na tensão de oxigénio resulta na inibição das PHDs e do HIF1. A cadeia  $\alpha$  dimeriza com a cadeia  $\beta$ , o complexo HIF é estabilizado e, após recrutamento

do co-activador p300/CBP, liga-se ao elemento de resposta à hipóxia (HRE - *hypoxia response element*) dos genes alvo do HIF.

A EPO é secretada para o plasma, e na medula óssea liga-se ao receptor da EPO (EPOR) na superfície de células precursoras eritróides. O EPOhr é uma proteína de 508 aminoácidos, membro da família de receptores de citocinas tipo 1, de cadeia transmembranar simples. Estes receptores têm em comum, em termos estruturais de dois pares de cisteínas ligadas por pontes de dissulfureto (Noguchi, 2007).

O EPOR existe como um homodímero na superfície celular dos percursores eritróides (Percy, 2007), sendo constituído por um domínio extracelular e um intracelular, e não possui actividade tirosina cinase endógena (Kionstantinopoulos, 2007).

A activação de EPOR segue um mecanismo de activação sequencial de dimerização envolvendo a via da Janus quinase 2 (JAK2 – desempenha um papel importante na promoção da proliferação celular), fosforilação, e translocação nuclear do transdutor de sinal, com subsequente activação da transcrição - 5 (STAT5 - *Signal transducer and activator of transcription 5*). O STAT é activado pela fosforilação e, em seguida, vai para o núcleo, reconhecendo uma sequência de bases específicas na região promotora do gene alvo, e inicia-se a transcrição (Rossert, 2005).

## **2. Metabolismo do ferro**

O ferro é um elemento indispensável ao organismo, pois é essencial para o transporte de oxigénio, para a síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) e para o metabolismo energético (Wijayanti, 2004).

A quantidade total de ferro no organismo é de aproximadamente 3 – 4 g, dois terços desta quantidade encontra-se nos eritrócitos ligado à hemoglobina, o restante é armazenado sob a forma de ferritina/hemossiderina. Um a 2 mg de ferro são absorvidos por dia pelo epitélio duodenal, que apresenta estruturas vilosas para ampliar a superfície de absorção. O ferro necessita de atravessar a membrana apical e basal do epitélio intestinal de forma a alcançar o compartimento plasmático (Kohgo, 2008).

### *2.1. Mecanismos regulatórios*

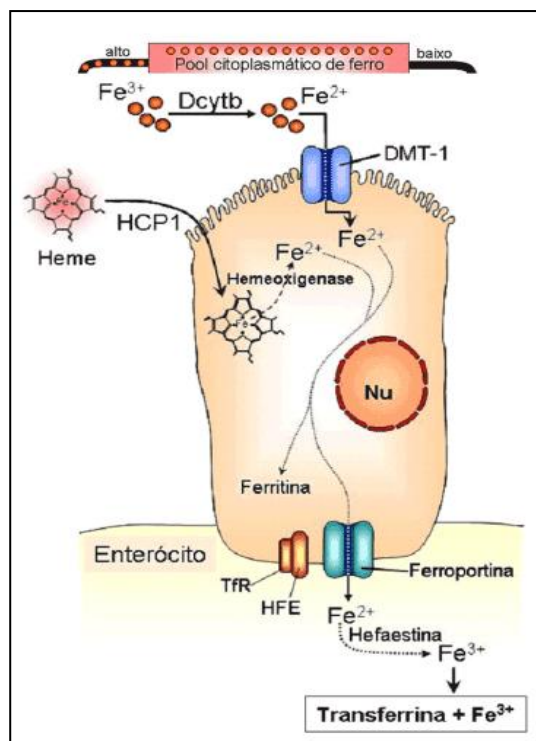
#### **2.1.1. Absorção do ferro**

O ferro utilizado pelo organismo provém de duas fontes principais: da dieta normal e da reciclagem dos eritrócitos senescentes. Uma dieta normal contém de 13 a 18 mg de ferro, dos quais 1 a 2 mg são absorvidos na forma inorgânica ou na forma de heme. Cerca de 1/3 de ferro absorvido a nível do duodenal provém do grupo heme contido na hemoglobina e na mioglobina da carne vermelha ingerida (Hoffbrand, 2006).

Alguns factores favorecem a absorção intestinal no ferro, nomeadamente a acidez e a presença de agentes solubilizantes, sendo a quantidade absorvida regulada pelas necessidades do organismo. Assim, em situações em que há falta de ferro ou aumento das necessidades, há um aumento na sua absorção. O transporte do ferro do lúmen intestinal até à circulação sanguínea ocorre em três fases principais: a) captação e internalização na membrana apical do enterócito; b) transporte intracelular e c) transporte para o plasma (Chung, 2003).

#### **2.1.2. Captação e internalização apical no enterócito**

A figura 3 ilustra uma célula intestinal e a localização das proteínas envolvidas no processo de absorção de ferro.



**Figura 3.** Esquema representativo do enterócito e das proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb = ferroredutase; DMT-1 = transportador de metal divalente; HCP-1 = proteína transportadora de heme-1; Nu = núcleo; HFE = proteína da hemocromatose; TfR = receptor da transferrina (adaptado de Grotto, 2010)

O ferro ingerido é classificado como heme (10%) e não-heme (90%). Este último é essencialmente composto por ferro sérico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) inorgânico, que é absorvido pelos enterócitos através do transportador de metal divalente 1 (DMT-1, também conhecido como Nramp2). Este ferro é reduzido para  $\text{Fe}^{2+}$ , antes do seu transporte, pela enzima citocromo b redutase ou Dcytb, localizada na membrana apical dos enterócitos intestinais. Em paralelo, o ferro hémico também é absorvido, sendo este proveniente da quebra da hemoglobina e da mioglobina contida nas carnes vermelhas, peixe e carne de aves, sendo absorvido para os enterócitos pela proteína transportadora do heme-1 (HCP-1), sendo reduzido pela hemoxigenase-1 (HO-1) (Zhang, 2009).

O grupo heme liga-se à membrana da borda em escova dos enterócitos duodenais e atravessa intacta a membrana plasmática, importando o heme extracelular. A HCP-1 também é expressa noutros locais, tais como no fígado e nos rins, sendo a sua regulação dependente dos níveis de ferro intracelular. De facto, quando existe um défice de ferro, a HCP-1 redistribui-se, passando do citoplasma para a membrana plasmática das células duodenais, enquanto que em condições de excesso de ferro a redistribuição dá-se a partir da borda da escova da célula para o seu citoplasma, permitindo desta forma, uma maior ou menor absorção de ferro. Por outro lado, a hipoxia também induz a síntese HCP-1, facilitando a captação de heme, quando há maiores necessidades do organismo (Kohgo, 2008).

### 2.1.3. Transporte para o plasma

No interior da célula duodenal, o ferro contido no grupo heme é libertado da protoporfirina pela heme oxigenase. Após a libertação, este fará parte do mesmo *pool* de ferro não heme, sendo armazenado na forma de ferritina ou libertado do enterócito para o plasma ligando-se à transferrina (Anderson, 2009).

O transporte do ferro através da membrana basolateral é mediado pela ferroportina, (FPT), que é uma proteína com um peso molecular calculado de 67 kDa, possuindo 12 domínios transmembrana, e parece funcionar como um dímero que transporta  $Fe^{2+}$  para o plasma, sendo posteriormente oxidado a  $Fe^{3+}$  pela hephaestina, que é uma multi-cobre oxidase que existe na membrana basolateral do epitélio intestinal, facilitando a ligação do ferro à transferrina. A FPT é o único exportador de ferro que se conhece, sendo encontrado em todo o tipo de células onde este mecanismo de passagem de ferro para o plasma se desenrola, nomeadamente nas células da mucosa duodenal, macrófagos e células da placenta (Pietrangelo, 2004).

A FPT é regulada pela hepcidina, a qual inibe a sua acção, assim aumentando a concentração plasmática de hepcidina, o ferro absorvido é retido como ferritina ao nível dos enterócitos, sendo posteriormente removido para as fezes, por descamação do lúmen intestinal (Shayeghi, 2005).

### 2.1.4. Transporte e entrada do ferro no eritroblasto

Os eritroblastos recebem o ferro que circula no plasma ligado à transferrina. A transferrina, é uma glicoproteína de 80kDa, sintetizada no fígado, testículos, retina e cérebro, que se liga ao receptor da transferrina-1 (TfR-1), que é um homodímero constituído por duas sub-unidades transmembranares ligadas por pontes disulfídicas na superfície da célula, formando o complexo transferrina/ferro, e interioriza-o para formar o endossoma, onde é induzido a sua libertação. Aqui o  $Fe^{3+}$  é convertido em  $Fe^{2+}$  por uma proteína redutora chamada STEAP-3 (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3*), permitindo o transporte do ião para fora (dentro da célula) dos endossomas através da DMT-1. As apotransferrinas e os TfR-1 retornam à superfície da célula para um novo ciclo posterior. O ferro é transportado para as mitocôndrias para a síntese do grupo heme, a fim de formar a hemoglobina. O ferro não utilizado é armazenado como ferritina ou como hemossiderina (Ohgami, 2005).

Nos macrófagos é realizada a reciclagem do ferro. Eles fagocitam os eritrócitos com perda de flexibilidade ou com defeitos intrínsecos, e digerem-nos num compartimento fagolisossomal, no qual a hemoglobina é degradada e o ferro é libertado do grupo heme, na presença da enzima heme oxigenase. O ferro proveniente da senescência dos eritrócitos é armazenado como ferritina, ou exportado e oxidado a  $Fe^{3+}$  pela ceruloplasmina, a fim de facilitar a ligação ferro-transferrina (Ohgami, 2005).

### 3. Metabolismo da Vitamina B12 e do Ácido fólico

#### 3.1. Ácido Fólico

De todos os nutrientes hematopoiéticos essenciais envolvidos na eritropoiese normal destacam-se o ferro, a vitamina B12 e ácido fólico. O termo ácido fólico deriva do latim *folium*, que significa folha, pois este foi isolada pela primeira vez a partir de folha verdes, como o espinafre. Na segunda metade do século XX, foi possível conhecer melhor esta vitamina, a sua importância na dieta e o seu potencial de prevenção de algumas patologias, como o cancro, doenças cardiovasculares e defeitos congénitos. O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel, existindo poucas reservas no organismo. É essencial para reacções metabólicas específicas, a nível celular, e vital para o funcionamento e crescimento normal do organismo (Nasser, 2005).

O ácido fólico é um co-factor essencial em muitas reacções do metabolismo intermediário, como: transferência de unidades de carbono, síntese de nucleotídeos, interconversão de aminoácidos (metionina-homocisteína), que requer a cobalamina de forma a prover S-adenosilmetionina para a metilação do DNA, ácido ribonucléico (RNA) e proteínas. É também essencial em períodos de rápida proliferação celular, como a gestação, dado o crescimento e o desenvolvimento fetal, para além da intensa actividade hematopoiética (McNulty, 1995).

O ácido tetrahidrofólico funciona como transportador dos grupos formil, metil ou hidroximetil de carbono simples. Desempenha papel importante na síntese de purinas (guanina e adenina) e da pirimidina (timina), compostos utilizados na formação do DNA e RNA. Os quais são essenciais para a divisão celular e síntese protéica. O grupo metila do 5-metil-tetrahidrofolato (5-metil-THF) é utilizado pela metionina sintase, enzima dependente da vitamina B12, que metila a homocisteína em metionina. Alterações na re-metilação da homocisteína em metionina aumentam a homocisteína. Além disso, alterações neste ciclo de metilação resulta numa incapacidade da célula em metilar outros compostos importantes como proteínas, lípidos e DNA (Czeizel, 1996).

Durante períodos de inadequada ingestão ou absorção de folatos, ocorrem modificações bioquímicas, decorrentes deste estado, e alterações na transferência de unidades de carbono no metabolismo. Estas alterações (hiperhomocisteinemia e hipometilação do DNA) podem resultar em consequências perniciosas, incluindo aumento de doenças crónicas (Vannuchi, 1998).

#### 3.1.1. Absorção e Metabolismo

O ácido fólico é absorvido principalmente na sua forma livre como ácido pteroi glutâmico, na parte proximal do intestino delgado. No entanto, uma pequena parte é absorvida pelo jejuno íleo distal. Para a sua absorção, os poliglutamatos necessitam de ser hidrolisados a monoglutamatos pela enzima intestinal pteroi poliglutamato hidrolase ou glutamil

hidrolase, uma hexopeptidase zinco-dependente, que cliva a cadeia de poliglutamatos no seu primeiro residuo, necessitando para isso de um pH óptimo próximo da neutralidade. No entanto, em altas concentrações, atravessa directamente a parede dos enterócitos sem essas modificações (Forssén, 2000). A absorção do ácido fólico é limitada, sendo controlada por um mecanismo desconjugante que, no entanto, pode ser afectado pela acção de inibidores das conjugases existentes nos alimentos, como por exemplo as leveduras (Said, 1993).

Durante ou após a absorção, o ácido monoglutâmico é transformado em ácido metiltetrahidrofólico e armazenado. O folato encontra-se no plasma distribuído em três partes: o folato livre, e os ligados aos transportadores de baixa e de alta afinidade, que são responsáveis pelo transporte do folato para as células da medula óssea e do fígado, reticulócitos, fluido cerebrospinal e células tubulares renais (McNulty, 1995).

Uma vez absorvidos, os folatos monoglutamatos podem ser convertidos em 5-metil THF, principal forma encontrada no plasma, onde é transportado para o fígado e para os tecidos periféricos. Os folatos monoglutamatos são convertidos a poliglutamatos pela acção da enzima pteroilpoliglutamato sintase, que reconhece tetrahydrofolato, porém parece não reconhecer 5-metil THF que, ou sofre desmetilação ou é utilizado antes da poliglutamação. Porém, parece que a poliglutamação intracelular é de grande importância na regulação da homeostase de folatos, pois essencialmente todo folato celular encontra-se na forma de poliglutamatos para as suas diversas funções de coenzimas, bem como para ser retido na célula (Brzezinska, 2000).

O ácido fólico é armazenado principalmente a nível hepático e a excreção é feita através da bilis e da urina sob a forma de folato, onde a circulação entero-hepática reabsorverá e reutilizará esses folatos, diminuindo as perdas orgânicas. Este mecanismo tornando-se essencial para a manutenção dos seus níveis séricos, pois a sua redução, poderá interferir no aporte de folato à medula óssea e a outros tecidos. O folato circulante, principalmente como metil-THF ligado a proteínas de baixa afinidade como a albumina, a globulina ou à hemoglobina, e apenas uma pequena parte do folato plasmático está ligado à proteína ligante específica de alta afinidade (folate binding proteins: FBPs) (Brody, 1994; Steinberg, 1984).

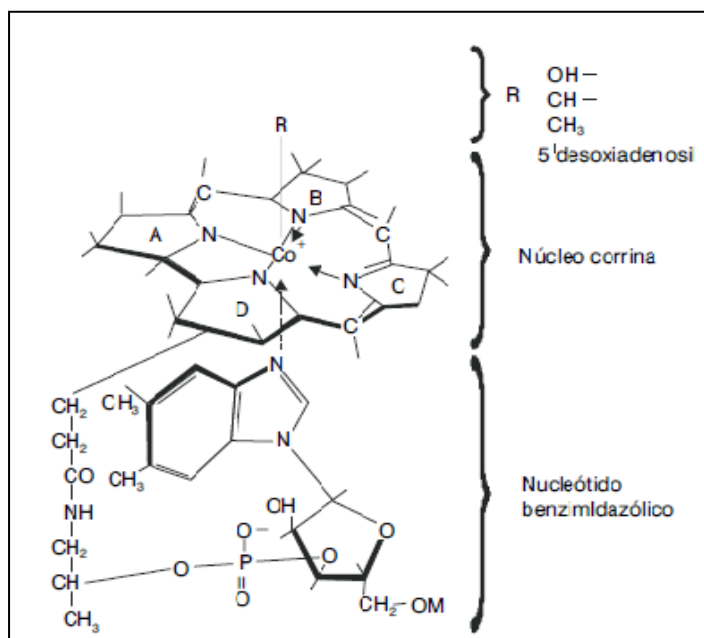
A principal consequência metabólica da deficiência de ácido fólico é a alteração no metabolismo do DNA, que condiciona alterações na morfologia nuclear das células, especialmente naquelas em que a velocidade de multiplicação é mais rápida, como por exemplo, precursoras dos eritrócitos, leucócitos e células epiteliais do estômago, intestino, vagina e cérvix uterino. Dentre as funções principais dos folatos, está também a da síntese de nucleotídeos, sendo também necessário, a presença da cobalamina, que actua como coenzima na síntese de metionina a partir da homocisteína, catalisada pela enzima metionina sintase, que requer metilCbl como coenzima e 5-metil-THF como co-substrato. Por este motivo, é difícil distinguir a deficiência clínica de uma vitamina da outra, excepto por testes específicos, pois ambas podem resultar em anemia megaloblástica. Neste caso haverá síntese insuficiente de nucleotídeos, resultando numa replicação celular ineficaz que, em tecidos de acentuada proliferação celular, como o hematopoiético, levará ao aparecimento de megaloblastose, com a

presença de células gigantes, que possuem citoplasma suficiente, mas cromatina insuficiente para a divisão celular; culminando com macrocitose eritocitária e pancitopenia (Herbert, 1980; McNulty, 1995).

### 3.2. Vitamina B12 ou cobalamina

A vitamina B12, ou cianocobalamina, tem um peso molecular de 1355 kDa e faz parte de uma família de compostos denominados genericamente de cobalaminas. É uma vitamina hidrossolúvel, sintetizada exclusivamente por microrganismos e é encontrada em todos os tecidos animais sendo armazenada no fígado na forma de adenosilcobalamina. O termo vitamina B12 é atribuído a uma família de substâncias compostas por um anel tetrapirrólico, em que circula um átomo central de cobalto, um grupo nucleotídico, que consiste na base 5,6 dimetilbenididazol e numa ribose fosforilada estreificada com 1-amino, 2-propanol (Henry, 2999) (figura 4).

Quimicamente, o termo vitamina B12 refere-se a hidroxicobalamina ou cianocobalamina, ainda que genericamente seja aplicado para todas as formas de cobalamina. A sua forma predominante no soro é a metilcobalamina, e no citosol, a adenosilcobalamina (Klee, 2000).



**Figura 4.** Estrutura química da vitamina B12 ou cobalamina (adaptado de Barrios, 1999).

A deficiência de vitamina B12 ou cobalamina ocorre frequentemente em doentes idosos, mas não é frequentemente reconhecida ou investigada porque as manifestações clínicas são subtis. O diagnóstico precoce da deficiência de vitamina B12 é de grande importância para evitar danos patológicos irreversíveis. A anemia perniciosa é a consequência da deficiência de cobalamina num número limitado de doentes, especialmente idosos e

indivíduos que adoptam uma dieta estritamente vegetariana. Uma outra causa mais comum é a má absorção da cobalamina alimentar, sendo este distúrbio caracterizado pela incapacidade de absorver vitamina B12 a partir de alimentos (Dali-Youcelf, 2009).

### 3.2.1. Metabolismo

A cobalamina é a única vitamina que é sintetizada exclusivamente por microrganismos. É encontrada praticamente em todos os tecidos animais, sendo armazenada principalmente a nível hepático na forma de adenosilcobalamina. A cobalamina é libertada pela digestão de proteínas de origem animal, onde posteriormente é vinculada pela haptocorrina (também denominada transcobalamina I [Tc I] ou Holo-Hc), uma proteína R produzida na saliva e no estômago, sendo este complexo degradado posteriormente pelas proteases pancreáticas com conseqüente transferência para um factor intrínseco (FI) gástrico. Este factor é uma glicoproteína de 44 kDa produzida pelas células parietais do estômago e é necessário para a absorção intestinal da vitamina B12 no íleo distal (Herrmann, 2003).

A ligação da cobalamina ao FI forma na mucosa um complexo que resiste a enzimas proteolíticas no lúmen intestinal e que, mais tarde, adere a receptores específicos das células epiteliais do íleo terminal, onde a cobalamina é absorvida, liga-se a um transportador plasmático e é lançada na circulação (Afman, 2001).

O FI não é absorvido pelo intestino, sendo expelido sem transformação. A cobalamina, absorvida pelo íleo terminal, é ligada à Tc I, entra na circulação portal, ligando-se às células que expressam receptores específicos, ou às que internalizam a vitamina na forma de complexo Tc-cobalamina (Holo-Tc) (Ulleland, 2002).

Qualquer alteração na absorção leva à deficiência de cobalamina. Na ausência de FI, a absorção da cobalamina é prejudicada e finalmente segue-se a deficiência desta vitamina. A causa mais frequente de vitamina B12 corre mais em adultos, em que a falta de FI está associada a atrofia gástrica e à deficiência de muitas outras secreções gástricas. Existe ainda uma forma de deficiência congénita, por défice de FI. Ambas vão-se traduzir em deficiência de vitamina e caracteriza uma patologia denominada anemia perniciosa (Henry, 1999).

No plasma, a vitamina B12 circula ligada às proteínas transportadoras denominadas transcobalaminas, que são três (Carmel, 2002). Uma outra porção é transportada pela Holo-Tc, que representa aproximadamente 10-30% da fracção circulante de vitamina B12, e uma pequena porção de vitamina B12 circula ligada à transcobalamina III (Tc III) (Lloyd-Wright, 2003).

A transcobalamina é uma glicoproteína de transporte de aproximadamente 120 kDa, que embora, represente a maior fracção de vitamina B12 circulante, é considerada inerte porque não existem receptores celulares para holo-Hc nas células e pela sua função no organismo ser pouco conhecida. A Holo-Hc é libertada no plasma pelos granulócitos, podendo ocorrer reduções de transcobalamina circulante por decréscimo da massa total de granulócitos (Carmel, 2002).

A Holo-Tc é uma proteína de 43 kDa, é produzida pelo fígado, macrófagos e íleo, e contém a fracção biologicamente activa da cobalamina, pois promove a entrada específica da cobalamina em todas as células do organismo (Herrmann, 2003). A falta desta resulta em anemia megabloblástica severa na infância, em que os níveis séricos de vitamina B12 poderão estar normais, devido a valores mais elevados de Holo-Hc (Henry, 1999).

A tanscobalamina III é uma isoproteína da Holo-Hc, não saturada com cobalamina e menos carregada. É libertada pelos granulócitos durante a coagulação *in vitro* e é produzida por várias células como fibroblastos, macrófagos, enterócitos, células renais, hepatócitos, mucosa gástrica e endotélio (Henry, 1999).

## 4. Doença Renal

### 4.1. Definição e descrição da Doença Renal

A doença renal (DR) está associada com uma gradual e habitualmente permanente perda de função renal. É considerado um problema de saúde pública a nível mundial, visto que a sua prevalência e incidência têm aumentado de forma acentuada nos últimos anos. Os sinais e sintomas urémicos manifestam-se clinicamente nos estádios IV e V, requerendo terapêutica de substituição – diálises ou transplante no estágio V (Lenz and Fornoni, 2006). Segundo a *National Kidney Foundation Disease Outcomes Quality Initiative* (NKF-KDOQI) a DR é classificada em 5 estádios que variam de acordo com o grau de lesão renal (Abensur, 2010). Na tabela I está resumida a classificação e estadiamento da DR.

Em Portugal, estima-se que mais de 800 mil indivíduos sofram da doença e a cada ano são registados mais 2200 novos casos de insuficiência renal crónica terminal, existindo actualmente 14 mil indivíduos dependentes de diálise, dos quais 5000 são transplantados. A DR não escolhe idades nem sexo, apesar de a incidência ser maior nos adultos e idosos, o que leva a que seja considerada uma patologia geriátrica. A diabetes e a obesidade são dois factores que contribuem para que estes números possam ser ainda mais elevados no futuro, razão pela qual o diagnóstico e o tratamento precoce são fundamentais (Rodrigues, 2011).

**Tabela 1.** Estádios da Doença Renal.

Estádios	Descrição	TFG* (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )
1	Lesão renal com filtração normal ou aumentada	> 90
2	Lesão renal com mínima diminuição da função renal	60-89
3	Redução moderada na função renal	30-59
4	Diminuição severa da função renal	15-29
5	Falência renal	< 15

\* TFG: taxa de filtração glomerular. Adaptado de Abensur, 2010.

### 4.2. Origem etiológica e classificação da doença renal

Diversas causas podem causar DR, tais como DM2, nefropatia hipertensiva, a nefropatia isquémica, glomerulonefrites primárias e secundárias, doenças tubulointersticiais (rim do mieloma múltiplo, tuberculose renal), vasculites, doenças hereditárias, tumores e doenças metabólicas. Estas doenças podem ser classificadas em: primárias (glomerulopatias, doenças císticas) ou secundárias (DM, hipertensão arterial [HÁ], lúpus eritematoso sistémico, hepatite B e C, vírus da imunodeficiência humana [HIV]); localização anatómica (patologias glomerulares, vasculares, obstrutivas e tumorais) e, por ultimo, as adquiridas e hereditárias. Entre todas estas causas a nefropatia diabética, a nefropatia hipertensiva, as glomerulonefrites

crónicas e a DR policística são as etiologias mais frequentes (Lenz and Fornoni, 2006; Makekman, 2009; Agarwal, 2009; Wakai, 2000).

Nos últimos anos o DM tornou-se a principal causa de DR terminal, principalmente pelo aumento na incidência da DM2 (Garcia, 2001). Outros factores identificados são: história familiar de hipertensão arterial, litíase urinária, uropatias (obstrução urinária, infecção urinária frequente), transplante renal e uso de drogas nefrotóxicas. Para além destes, alguns autores consideram factores de risco: idade avançada, tabagismo, proteinúria persistente, dislipidemia, estado inflamatório, infecções sistémicas e doenças auto-imunes (Romão, 2004; Romão, 2006).

#### *4.3. Complicações associadas à doença renal*

A anemia é uma das complicações frequentes nos indivíduos com DR, reconhecida à mais de 150 anos, sendo responsável por grande parte da sintomatologia dos doentes. Cerca de 90% desses indivíduos apresentam algum grau de anemia durante a evolução da sua doença (Tsakiris, 2000). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), considera-se que há anemia quando a hemoglobina é inferior a 13 g/dl nos homens e nas mulheres na pré-menopausa, é inferior a 12 g/dl (WHO, 2008).

A causa da anemia em indivíduos com DR é multifactorial. A mais conhecida é o défice de produção de EPO, a qual se combina muitas vezes com a deficiência em ferro. A sobrevivência dos eritrócitos encontra-se diminuída nesses indivíduos, com duração aproximadamente 60-90 dias (Torre-Amione, 1996).

O *stress* oxidativo é uma das causas de progressão da DR. Na DR existe uma alteração do balanço entre a produção de ROS (Reactive Oxygen Species) e a capacidade anti-oxidante, com excesso de produção de ROS, tendo esta perturbação a agravar-se à medida que a DR evolui (Mimic-Okal, 2001).

Os eritrócitos apresentam um dos componentes anti-oxidantes mais importantes o sistema da glutathione. Têm ainda a capacidade de regenerar equivalentes redox consumidos pelas vias da pentose fosfatos, através da redução da glutathione oxidada. Deste modo, existe na anemia uma diminuição da capacidade anti-oxidante e de fornecimento de oxigénio aos tecidos (hipóxia), o que favorece o agravamento da fibrose renal (Rossert, 2002). A nível renal, os ROS têm origem nas células vasculares, glomerulares e tubulares (Galle, 2001).

Também as células associadas às reacções inflamatórias têm capacidade de produção de grandes quantidades de ROS. Por outro lado, a capacidade anti-oxidante é dada por enzimas como a superóxido dismutase, catalase, sintetase do óxido nítrico (NO) e peroxidase da glutathione (González, 2001; Galle, 2001).

A formação de ROS é considerada como parte da defesa inespecífica do organismo, podendo, no entanto, afectar as suas próprias células, principalmente em zonas de inflamação (Galle, 2001). Na DR existe uma alteração do balanço entre ROS e capacidade anti-oxidativa, com excesso e produção de ROS (Witko, 1996), havendo uma tendência para um agravamento

à medida que a doença evolui (Mimic-Oka, 2001). Os ROS ao actuarem a nível do ciclo celular contribuem para a hipertrofia celular (Hannken, 1998; Wolf, 2001; Galle, 2001).

A nível vascular, o superóxido inactiva o NO vasodilatador, com a consequente disfunção endotelial. A maior fonte do *stress* oxidativo é o superóxido derivado da oxidase da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que lesa directamente a célula e promove também a proliferação celular e a fibrose (Onozato e Tojo, 2005). Após aumento da oxidase da NADPH verifica-se também um aumento da actividade inflamatória, com aumento da IL-6, TNF- $\alpha$  (Factor de necrose tumoral- $\alpha$ ), MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) e VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) (Zhang *et al*, 2003a).

Em resumo, o *stress* oxidativo via oxidase da NADPH é uma via patológica comum na lesão renal em diversas situações como a hipertensão arterial, a diabetes ou a DR (Galle, 2001). Inúmeros mecanismos contribuem para a instalação e progressão da DR. Esta, uma vez instalada e tendo sido atingido determinado grau de lesão, é inexoravelmente progressiva. Durante décadas houve disputa no sentido de se atribuir maior, se não toda a importância, a determinados factores (hemodinâmicos vs hipertrofia). Surgem finalmente, à luz do conhecimento actual, tentativas de criar uma teoria única que integre os diferentes factores intervenientes. Harris e Neilson (2006), muito recentemente, propõem essa mesma teoria.

Muitos processos contribuem para a perda progressiva da função renal, existindo claramente uma lesão inflamatória que conduz à fibrose, que é o equivalente à fase 5 da DR. É fundamental a compreensão destes mecanismos com vista a uma intervenção mais precoce e eficaz. O *stress* oxidativo é uma das causas da progressão da DR. Na DR existe uma alteração do balanço entre ROS e capacidade anti-oxidante, com excesso de produção de ROS, tendo esta perturbação tendência a agravar-se à medida que a DR evolui. A creatinina sérica, produzida pela desidratação não-enzimática da creatinina, é um marcador mais específico que a ureia para a estimativa da filtração glomerular, mas a dosagem sofre interferência de condições que influenciam no metabolismo e no seu volume de distribuição. Embora as alterações dos níveis sejam tardias em relação ao comprometimento da função renal, é um bom marcador evolutivo (Melnikov, 2008).

## 5. Diabetes mellitus tipo 2

Segundo a *International Diabetes Federation* – IDF (2009), estima-se que cerca de 438 milhões de indivíduos terão diabetes *mellitus* (DM) em 2030, sendo como tal, uma preocupante epidemia mundial. Este aumento é resultado de múltiplos factores, tais como as alterações socioculturais induzidas pela industrialização, o consumo de dietas hipocalóricas, a diminuição de práticas de actividade física, o aumento da obesidade, as mudanças do estilo de vida tradicional, e o aumento da esperança de vida, justificam o crescimento das doenças crónicas, no qual se destaca a DM.

O aumento da prevalência da DM em todo o mundo é um dos problemas de saúde mais sérios e desafiante do século XXI. Estudos recentes, estimam que a prevalência da DM em Portugal é de 11,7 %, sendo mais prevalente em homens (14,2%) e na faixa etária dos 60 aos 79 anos, existindo 905 035 portugueses entre os 20 e os 79 anos com DM (Correia, 2009).

### 5.1. Definição e descrição da diabetes mellitus

A designação de DM engloba um grupo de situações clínicas com alterações metabólicas, que tem em comum a hiperglicemia que resultam de uma complexa interacção de factores genéticos e ambientais. As células betas do pâncreas fazem com que os níveis de insulina variem acima e abaixo do normal. Em indivíduos saudáveis, esta suprime a produção de glicose a nível hepático e promove a sua recaptação, utilização e armazenamento (Fauci, 2008). Quando a produção de insulina está diminuída, não vai haver correcção de hiperglicemia. Por outro lado, os tecidos podem não responder normalmente a esta hormona, o que condiciona uma resposta menor, tanto à insulina endógena, como exógena (Correia, 2009).

Há fortes indícios que a genética desempenha um papel importante. A DM é causada por deficiência congénita e/ou adquirida na produção de insulina pelo pâncreas ou pela ineficiência da insulina produzida. É a forma mais comum de doença, que corresponde a 95% dos casos. (van den Oever IA, 2010)

### 5.2. Classificação etiológica da diabetes mellitus

A classificação, assim como os critérios de diagnóstico da DM, têm vindo a sofrer alterações nos últimos anos, acompanhando a evolução dos conhecimentos sobre a sua fisiopatologia e epidemiologia. Em 1997, a American Diabetes Association (ADA) sugeriu uma nova classificação para a diabetes, baseada em aspectos fisiopatológicos, dividindo em três grupos: diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e diabetes gestacional. Segundo Raj SM et al (American Diabetes Association, 2007), a possível relação entre a DM1 e DM2 é um assunto controverso, pois os dois tipos de diabetes são etiológicamente distintos.

Assim, a DM1, representa cerca de 5 a 10% dos casos de DM e resulta primariamente da destruição das células beta-pancreáticas, resultando numa deficiência de insulina, de natureza auto-imune ou idiopática. Relativo a este tipo de diabetes, os portadores apresentam tendência à cetoacidose, uma complicação aguda da DM (van den Oever IA, 2010).

A DM2 representa 90 a 95% dos casos de diabetes, abrangendo indivíduos em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado a partir dos 40 anos, mantendo uma evolução lenta, sendo causada pelo enfraquecimento da função da capacidade das células beta, associadas a um declínio da sensibilidade da insulina. Muitos indivíduos não apresentam sintomas clássicos da diabetes e podem permanecer anos sem diagnóstico da doença. No entanto, o risco de desenvolver este tipo de diabetes aumenta com a idade, sexo, sedentarismo (van den Oever IA, 2010).

A DM2 é uma das doenças crónicas mais comum na actualidade. Nos países desenvolvidos, a mortalidade do doente diabético é aproximadamente duas vezes superior à dos doentes que não sofrem desta patologia havendo uma redução da esperança de vida em cerca de 5-10 anos nos diabéticos de meia-idade, em relação à população em geral (Shu, 2010).

Devido às semelhanças na sua manifestação clínica os dois tipos de diabetes podem partilhar um complexo fisiopatológico comum. Na fisiopatologia da DM2 há uma combinação de resistência à insulina, em que o nível de insulina é normal, mas não é eficaz na sua função de promover a utilização periférica da glicose, isto é, significa que as células do organismo não respondem adequadamente quando a insulina está presente. (Raj, 2009)

Os doentes com DM2 possuem as células beta pancreáticas funcionais e não requerem insulina para sobreviver, mas alguns casos, a insulina é importante para o controlo de hiperglicemia (Powers, 2008).

A importância da DM2 resulta ainda do impacto económico que esta patologia e suas complicações representam no orçamento da saúde e estima-se que cerca de 11,6% dos gastos totais mundiais na saúde se devam a este tipo de diabetes, o que não parece difícil de compreender se a considerarmos como a primeira causa de insuficiência renal terminal e de cegueira na Europa. Se não for bem controlada a diabetes pode resultar em múltiplas comorbidades que podem necessitar de grandes cuidados, incluindo a hospitalização (Correia, 2009).

### *5.3. Complicações crónicas da diabetes mellitus*

Segundo, Choudhary Nikhile e Ahlawat Ravinder, em 2008 as complicações crónicas do DM2 são classificadas como macrovasculares, microvasculares e as neuropatias. As complicações macrovasculares manifestam-se, principalmente, nas artérias coronárias (doença cardiovascular), cerebrais e periféricas das extremidades inferiores, tendo prognóstico agravado, pelo facto de a aterosclerose desenvolver-se em idade precoce nos portadores de DM resultando em amputações de membros, sendo responsável por gastos excessivos em

saúde e substancial redução da capacidade de trabalho e expectativa de vida. As microvasculares resultam de alterações dos níveis glicémicos, que provocam um espessamento de membrana basal dos capilares, e estão relacionadas à retinopatia (possibilidade de cegueira), a nefropatia (com possível evolução para insuficiência renal) e neuropatia. A nefropatia ou DR secundária relativamente às alterações microvasculares diabéticas, constitui uma complicação comum da diabetes. Indivíduos com diabetes representam cerca de 25% dos indivíduos com DR em estágio terminal que necessitam de diálise ou de transplante. Os indivíduos com DM1 mostram com frequência os sinais de doença renal depois de 15 a 20 anos, enquanto os indivíduos com DM2 desenvolvem a DR dentro de 10 anos a partir do diagnóstico (Choudhary, 2009).

Segundo, van den Oever IA et al., (van der Oever IA, 2010) a disfunção endotelial é considerado um factor importante na patogênese da doença vascular na DM. O papel da disfunção endotelial na DM2 é complexo, dado que existe muitos factores independentes envolvidos, incluindo o envelhecimento, obesidade, dislipidemia, hipertensão, inflamação de baixo grau, resistência à insulina e hiperglicemia. Todos estes factores estão associados à síndrome metabólica, que geralmente precede a DM2.

## 6. Inflamação

A inflamação ou processo inflamatório é a resposta do organismo a qualquer tipo de agressão sofrida. É uma resposta fisiológica a uma variedade de estímulos, tais como lesão tecidual associada a infecção ou a danos físicos. Esta resposta, padrão comum a vários tipos de tecido, é mediada por diversas substâncias produzidas pelas células danificadas e células do sistema imunitário que se encontram nas proximidades da lesão. Qualquer dano tecidual durante esses processos leva à libertação de citocinas pró-inflamatórias (Douglas, 2002).

A mobilização dos leucócitos que ocorre durante o processo inflamatório é caracterizada por uma infiltração inicial de neutrófilos, o principal tipo de célula associado às reacções inflamatórias agudas e que algumas vezes, se associam aos eosinófilos e, atinge o seu pico após 48 a 72 horas após o início do estímulo. Além disso, uma série de alterações bioquímicas e hematológicas que podem ser medidas em laboratório, tal como, diminuição na contagem do número de leucócitos totais, diminuição dos níveis séricos de ferro e de vitamina A, e aumento da concentração de proteínas de fase aguda, principalmente da PCR (Skovgaard, 2009).

A deterioração da função renal tem sido associada ao aumento dos níveis de PCR e de citocinas pró-inflamatórias nos diferentes estádios da DR. Estas citocinas ao interagirem com seus receptores localizados na membrana celular, regulam a transcrição de inúmeros genes e determinam modificações do comportamento das células presentes no tecido renal. De todas as citocinas pró-inflamatórias que têm sido associadas à fisiopatologia da DR destacam-se a IL-1, a IL-6 e o TNF- $\alpha$ . Na população adulta, há evidências de activação do sistema imune em estádios precoces da DR crónica (Hsu, 2010).

Nos últimos anos tem sido demonstrado que a inflamação desempenha um papel importante na DR, particularmente em doentes sob terapêutica substituição. A DR parece estar relacionada com o aparecimento de um estado inflamatório crónico, que se correlaciona com o grau de insuficiência renal. É a perda progressiva e irreversível da função renal, no qual o organismo não consegue manter o equilíbrio metabólico e hidroelectrolítico, que fatalmente termina em uremia (Galle, 2001).

A inflamação crónica é caracterizada por inflamação activa, com destruição tecidual e tentativa de reparação dos danos (cicatrização). Esta é sempre precedida pela inflamação aguda, em que se desenvolvem as fases inflamatórias com o intuito de eliminar o agente agressor. Esta é caracterizada por um infiltrado formado por células mononucleares (predominantemente macrófagos e linfócitos) com a presença de poucos neutrófilos. Esta limita-se à inflamação que persiste enquanto se mantém o mecanismo de agressão, acabando logo que ele cesse. Diferentes tipos de reacções inflamatórias crónicas podem ser caracterizados pela presença de células T, células B, plasmócitos ou macrófagos (King, 2007).

A activação da célula endotelial é um factor chave na mobilização de células inflamatórias. Quando as células inflamatórias aderem às células endoteliais activadas, migram entre elas e digerem através da membrana basal para começar a se moverem para o tecido. Durante este processo, os neutrófilos segregam mediadores inflamatórios adicionais que

resultam na mobilização de outras células inflamatórias assim como uma maior activação das células inflamatórias que já estão no local. Os macrófagos activados segregam vários mediadores da inflamação, os quais, quando não controlados, podem levar à destruição tecidual que é uma das características mais marcantes da inflamação crónica (Ley, 2007).

Os neutrófilos, são leucócitos polimorfonucleados que têm origem na medula óssea, e que permanecem no sangue periférico durante um curto espaço de tempo, perfazem cerca de 50 a 70% do número total de leucócitos e são células que não se conseguem multiplicar. As respostas inflamatórias graves podem recrutar células mielóides imaturas da medula óssea, e a presença de bastões e metamielócitos no sangue periférico é um sinal de inflamação aguda grave (como por exemplo, a pneumonia bacteriana).

Os mastócitos derivam de células-tronco hematopoiéticas e quando maduros sobrevivem meses ou anos nos tecidos vasculares. A sua maturação e a sua expressão são influenciadas por diversas citocinas como a IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$ . Podem ser activados por uma variedade de mediadores que conduzem a uma resposta inflamatória inicial, que provoca vasodilatação e edema. São células secretoras multifuncionais do sistema imune que participam na regulação da resposta imunológica com libertação dos mediadores químicos, após estímulo apropriado, e cuja principal característica é a presença de grânulos densos citoplasmáticos que contêm no seu interior uma estrutura de rede. A sua presença é encontrada tanto nas reacções inflamatórias agudas, como nas crónicas, e podem produzir citocinas que contribuem para a fibrose (Hsu, 2010).

Em várias revisões recentes sobre inflamação e doenças inflamatórias, os mastócitos nem sempre são mencionados ou, quando se referem a eles, apenas são listados como simples participantes. Esta omissão pode ocorrer simplesmente pelo facto dos mastócitos estarem em menor quantidade em lesões inflamatórias, quando comparadas com número de linfócitos e neutrófilos. Os mastócitos podem desempenhar um papel protector na imunidade inata, e um papel pró-inflamatório em certas circunstâncias (Kinet, 2007).

Os fenómenos da inflamação são mediados por substâncias químicas, cuja interacção é complexa. Estas substâncias são oriundas do plasma, dos leucócitos, das plaquetas, do endotélio e do tecido conjuntivo. A histamina é um mediador inflamatório que se encontra armazenada nos grânulos dos mastócitos e basófilos e é sintetizada dentro desses grânulos pela acção da descarboxilase histadina sobre o aminoácido histidina. Uma vez libertada a histamina pode actuar em quatro conhecidos receptores acoplados da proteína transmembrana G: o receptor da histamina H1 (H1R), o receptor da histamina H2, o receptor da histamina H3 e o receptor da histamina H4. Os receptores da histamina são expressos nos vários tipos celulares envolvidos no processo inflamatório incluindo linfócitos, derivados de monócitos, plaquetas, células dendríticas e queratinócitos. Na resposta tardia, o H1R medeia a resposta inflamatória crónica conseguindo suprimir a libertação de IL-12 e estimular a IL-10 conduzindo a uma resposta às células T "helper" 2. Ainda através do H1R contribui para a inflamação alérgica ao libertar IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, TNF- $\alpha$  das células endoteliais, monócitos e células mononucleadas (Bryce, 2006).

A documentação da existência de uma inflamação crónica na diabetes tem sido baseada principalmente no aumento das concentrações plasmáticas de proteína C reactiva (PCR), fibrinogénio, IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$ . A PCR é uma proteína de fase aguda que se encontra aumentada nos processos inflamatórios e infecciosos, que é sintetizada principalmente a nível hepático, sendo esta síntese regulada pela IL-6 e TNF- $\alpha$ . Desestabiliza a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), que reduz a libertação do óxido nítrico e aumenta a libertação da endotelina-1. Além disso, contribui directamente para um estado pró-inflamatório, aumentando a expressão do ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais; eleva também a expressão do MCP-1; a adesão de leucócitos e a captação da LDL-oxidada pelos macrófagos; aumenta a libertação, pelos monócitos, de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1b, IL-6 e TNF- $\alpha$ , e favorece a fagocitose e activação do complemento. O TNF- $\alpha$  é uma proteína de 54000 Da, e é um dos mediadores iniciais de resposta inflamatória à infecção, estimulando a cascata de mediadores vasoactivos e inflamatórios. É produzida por neutrófilos, macrófagos e adipócitos, e induz a produção de outras citocinas, tal como a IL-6, que regula a produção PCR (van der Oever IA, 2010).

É cada vez mais evidente que a inflamação crónica desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e progressão de várias doenças crónicas, incluindo neoplasia, DM2, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares e renais.

## **CAPÍTULO II – Objectivos**

Considerando o facto de DM2 assim, como a DR serem patologias muito frequentes na população sénior, e estarem associados com alterações eritropoiéticas e à presença de um processo inflamatório crónico, os objectivos deste trabalho são:

- Avaliar as alterações eritropoiéticas e inflamatórias em doentes com DR e/ou com DM2.
- Avaliar as alterações eritropoiéticas e inflamatórias associadas com a idade.
- Avaliar as correlações entre as alterações eritropoiéticas e, o grau de insuficiência renal e de inflamação, tanto em indivíduos normais, como com patologia associada.

### **CAPÍTULO III – Materiais e Métodos**

## 1. Amostras

Neste trabalho foram incluídos 588 indivíduos, dos quais 491 eram provenientes do internamento do Serviço de Medicina Interna – Hospital Santa Maria Maior, E.P.E., Barcelos, e 97 provenientes da consulta externa de Medicina, seleccionados durante o período de 01 de Setembro de 2009 a 01 de Setembro de 2010. Estes indivíduos foram divididos por quatro grupos:

- Grupo de doentes com DM2, constituído por 349 indivíduos, com idade média de  $78,36 \pm 7,70$  anos (sexo feminino:  $79,58 \pm 7,56$  anos; sexo masculino  $76,74 \pm 7,60$  anos);
- Grupo de DR, constituído por 69 indivíduos, com idade média de  $82,15 \pm 6,43$  anos (sexo feminino:  $82,69 \pm 5,73$  anos; sexo masculino  $81,08 \pm 7,68$  anos);
- Grupo de DR com DM2, constituído por 73 indivíduos, com idade média de  $80,53 \pm 6,58$  anos (sexo feminino:  $80,62 \pm 6,49$  anos; sexo masculino  $80,34 \pm 6,91$ );
- Grupo controlo, constituído por 97 indivíduos, com idade média de  $79,22 \pm 6,60$  anos (sexo feminino  $79,47 \pm 7,21$  anos; sexo masculino  $78,76 \pm 5,37$  anos). Este grupo controlo é constituído por indivíduos emparelhados por idade e sexo, com o grupo de doentes. Estes indivíduos não apresentavam marcadores de DR e/ou de DM, alterações nos parâmetros hematológicos, nem indicadores laboratoriais de inflamação.

Este trabalho teve parecer favorável da Comissão de Ética do Hospital Santa Maria Maior, E.P.E., Barcelos.

## 2. Determinações Analíticas

As amostras de sangue, com e sem anticoagulante, foram colhidas a todos os indivíduos incluídos no estudo. Em todos, para além de se registar a idade e o sexo, foi efectuado um hemograma completo, incluindo a contagem diferencial de leucócitos, contagem plaquetas e os índices hematimétricos, utilizando um aparelho automático CellDyn 3500 (Abbott Diagnostics, Califórnia, EUA). Foi utilizado o aparelho COBAS 6000 (Roche Diagnostics, Louisiana, United States) para a determinação dos níveis séricos de glicose (Glu3, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), ureia (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), creatinina (Crej 2, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), ferro (Iron, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), CTFF (UIBC, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), ferritina (Ferritin, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), transferrina (Transferrin, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), PCR (CRPLX, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), vitamina B12 (Vitamina B12, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e ácido fólico (Ácido Fólico, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). A determinação da velocidade de sedimentação (VS) foi efectuada utilizando os tubos de vácuo *SARSTEDT-Monovtte*<sup>®</sup> (método de Westergren).

### **3. Análise Estatística**

Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences, version 17.0 for Windows® XP*, Chicago Illinois USA). O teste de Kolmogorov – Smirnov foi usado na avaliação da normalidade das variáveis. Na comparação dos grupos foi usado o teste *one-way* ANOVA suplementado com o teste de Turkey HSD *pos-hoc*. As correlações entre variáveis foram efectuadas usando os testes de correlação Pearson ou de Spearman. O nível de significância considerado foi de  $p < 0.05$ .

## **CAPÍTULO IV – Resultados**

Os resultados foram analisados de duas maneiras: numa primeira abordagem tentamos verificar a existência de diferenças entre o grupo controlo e os três grupos de patologias, e numa segunda abordagem as diferenças, por sexo e/ou idades, em cada um dos grupos controlo e com patologia.

Na tabela 2 estão representados os dados obtidos no grupo controlo e nos grupos de doentes referentes aos dados hematológicos, à função renal, aos níveis de glicose, aos marcadores inflamatórios, ao metabolismo do ferro, doseamento da vitamina B12 e ácido fólico.

Quando comparado com os controlos, os doentes com DM2 (tabela 2) apresentam, como seria de esperar, um aumento significativo na concentração de glicose sérica, assim como, aumento nos marcadores inflamatórios (contagem de leucócitos totais e de neutrófilos, VS e PCR) e nos marcadores de insuficiência renal (ureia e creatinina). Os DR apresentam quando comparados com os controlos, aumento nos marcadores de insuficiência renal (ureia, creatinina) e dos marcadores inflamatórios (VS e PCR), diminuição na concentração da hemoglobina, hematócrito e na contagem de eritrócitos. Os DRC com DM2, quando comparados com os controlos, apresentam aumento significativo na concentração sérica de glicose, assim como, nos marcadores de insuficiência renal (ureia, creatinina) e inflamatórios (contagem de leucócitos totais e de neutrófilos, VS e PCR), assim como, diminuição significativa na concentração de hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos.

Quando comparados com os doentes com DM2, os DR apresentam aumento significativo, na concentração de glicose sérica, nos marcadores de insuficiência renal (ureia e creatinina) e inflamatórios (contagem de leucócitos totais e de neutrófilos), assim como diminuição na concentração de hemoglobina, hematócrito e na contagem de eritrócitos. Os DR com DM2 quando comparado com os doentes com DM2, apresentam um aumento significativo nos marcadores de insuficiência renal (ureia e creatinina) e uma diminuição na concentração de hemoglobina, hematócrito e na contagem de eritrócitos (tabela 2).

Quando comparados com os DR, os DR com e sem DM2 associados, apresentam aumento significativo na concentração de glicose sérica, assim como, aumento nos marcadores inflamatórios (contagem de leucócitos totais e de neutrófilos) e diminuição na concentração de creatinina (tabela 2).

**Tabela 2.** Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico e marcadores inflamatórios nos diferentes grupos de patologias.

	Grupo Controlo (n=97)	Doentes com Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (n=349)	Doentes Renais (n=69)	Doentes Renais com Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (n=73)
<b>Dados hematológicos</b>				
Leucócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	7.07 (5.74-8.64)	9.50 (7.10 -12.50) <sup>a</sup>	7.63 (5.95-9.90) <sup>b</sup>	9.89 (7.81-13.40) <sup>a,c</sup>
Neutrófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	4.40 (3.60-5.95)	7.20 (5.00-10.35) <sup>a</sup>	5.10 (4.20-8.20) <sup>b</sup>	8.00 (5.55-11.80) <sup>a,c</sup>
Linfócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	1.50 (1.10-1.90)	1.10 (0.80±1.60)	1.10 (0.80-1.45)	1.00 (0.70-1.40)
Monócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.60 (0.50-0.70)	0.60 (0.40-0.80)	0.60 (0.40-0.70)	0.60 (0.30-0.90)
Eosinófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.10 (0.10-0.20)	0.00 (0.00-0.10) <sup>a</sup>	0.10 (0.00-0.20)	0.00 (0.00-0.20) <sup>a</sup>
Basófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.10 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)
Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L)	4.05 ± 0.61	3.97 ± 0.69	3.38 ± 0.64 <sup>a,b</sup>	3.60 ± 0.60 <sup>a,b</sup>
Hb (g/dL)	12.55 ± 2.12	12.10 ± 2.06	10.46 ± 1.82 <sup>a,b</sup>	11.19 ± 1.80 <sup>a,b</sup>
Hematócrito (%)	37.72 ± 6.27	36.51 ± 6.49	31.46 ± 5.50 <sup>a,b</sup>	33.59 ± 5.64 <sup>a,b</sup>
VGM (fl)	93.35 ± 7.40	92.05 ± 6.22	93.53 ± 7.07	93.50 ± 4.97
HGM (pg)	31.10 ± 2.97	30.54 ± 2.37	31.15 ± 2.63	31.21 ± 1.93
CHGM (g/dL)	33.28 ± 0.92	33.16 ± 0.86	33.04 ± 2.23	33.35 ± 1.13
RDW (%)	15.39 ± 2.37	15.47 ± 2.23	15.92 ± 2.12	15.62 ± 1.32
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	239.88 ± 98.25	254.56 ± 119.17	217.79 ± 94.60	231.06 ± 94.87
Reticulócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	52.90 (46.80-93.60)	56.50 (43.40-95.02)	46.05 (34.50-72.60)	62.10 (44.65-73.40)
<b>Função Renal e Glicose</b>				
Glicose (mg/dL)	95.64 ± 7.75	181.13 ± 60.19 <sup>a</sup>	96.27 ± 18.52 <sup>b</sup>	183.46 ± 66.93 <sup>a,c</sup>
Ureia (mg/dL)	33.00 (26.50-40.00)	49.00 (35.00-75.00) <sup>a</sup>	126.00 (94.00-164.00) <sup>a,b</sup>	126.00 (94.00-172.50) <sup>a,b</sup>
Creatinina (mg/dL)	0.74 ± 0.17	0.93 ± 0.35 <sup>a</sup>	2.79 ± 1.04 <sup>a,b</sup>	2.42 ± 0.93 <sup>a,b,c</sup>
<b>Metabolismo do ferro, vitamina B12 e ácido fólico</b>				
Ferro (µg/dL)	36.00 (25.00-55.00)	39.00 (28.00-35.00)	43.00 (30.00-58.00)	38.00 (27.00-53.00)
CTFF (µg/dL)	204.97 ± 76.14	199.04 ± 93.86	190.08 ± 76.32	172.80 ± 59.35
Ferritina (ng/mL)	329.13 (102.38-595.58)	350.00 (129.50-579.00)	377.99 (180.81-607.21)	299.95 (188.00-510.29)
Transferrina (mg/dL)	194.29 ± 65.55	182.77 ± 65.85	171.57 ± 66.16	169.85 ± 54.61
Saturação da Transferrina (%)	15.50 (9.31-21.75)	16.59 (11.41-27.93)	16.62 (13.53-24.42)	18.10 (12.18-26.57)
Vitamina B12 (pg/mL)	637.00 (221.00-958.25)	567.00 (304.75-941.50)	502.00 (248.00-1006.00)	763.00 (371.25-1048.25)
Ácido Fólico (ng/mL)	10.70 (5.85-20.00)	10.37 (5.05-15.48)	7.86 (4.88-13.88)	8.43 (4.22-17.67)
<b>Marcadores inflamatórios</b>				
VS (mm)	29.00 (12.00-48.00)	56.00 (30.00-73.50) <sup>a</sup>	64.00 (33.00-80.50) <sup>a</sup>	64.00 (41.00-91.00) <sup>a</sup>
PCR (mg/dL)	1.47 (0.29-2.55)	6.35 (2.25-17.97) <sup>a</sup>	4.92 (1.73-15.93) <sup>a</sup>	6.43 (2.68-14.60) <sup>a</sup>

Os resultados são apresentados como média, ± desvio padrão ou como mediana (intervalo inter-quartil); <sup>a</sup> p<0.05 vs controlos; <sup>b</sup> p<0.05 vs Diabetes *mellitus* tipo 2; <sup>c</sup> p<0.05 Doentes Renais. Abreviação: Hb = Hemoglobina; VGM = Volume globular médio; HGM = Hemoglobina globular média; CHGM = Concentração de hemoglobina globular média; RDW = *Red blood cells distribution*; CTFF = Capacidade total de fixação de ferro; PCR = Proteína C reactiva

Quando os grupos foram estratificados por sexo, verificamos que nos controlos os indivíduos do sexo masculino apresentam aumento significativo na contagem de monócitos, na concentração de creatinina e na PCR, quando comparados com os indivíduos do sexo feminino (tabela 3).

No grupo de DM2 os indivíduos de sexo masculino apresentam aumento significativo na concentração de hemoglobina, hematócrito e nos marcadores de insuficiência renal (ureia e creatinina) (tabela 3).

No grupo de DR os indivíduos de sexo masculino apresentam aumento significativo nos marcadores inflamatórios (leucócitos totais e de neutrófilos) (tabela 3).

No grupo de DR com DM2, os indivíduos de sexo masculino apresentam aumento significativo no ferro sérico e na saturação da transferrina (tabela 3).

Eritropoiese e inflamação em doentes com IR e/ou com DM2

**Tabela 3.** Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico e marcadores inflamatórios por grupos de patologia e género.

Sexo	Grupo Controlo		Doentes com Diabetes Mellitus tipo 2		Doentes Renais		Doentes Renais com Diabetes Mellitus tipo 2	
	Feminino (n=63)	Masculino (n=34)	Feminino (n= 200)	Masculino (n=149)	Feminino (n=46)	Masculino (n=23)	Feminino (n=50)	Masculino (n=23)
<b>Dados hematológicos</b>								
Leucócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	7.05 (5.61-8.88)	7.34 (5.96-8.53)	9.70 (7.47-12.57)	9.02 (6.74-12.50)	6.62 (5.81-8.53)	9.58 (6.60-12.70) <sup>a</sup>	10.15 (8.15-13.65)	8.83 (7.04-13.30)
Neutrófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	4.60 (3.40-6.20)	4.30 (3.70-5.82)	7.35 (5.12-9.87)	7.10 (4.70-11.00)	4.75 (3.95-6.75)	7.60 (5.00-10.20) <sup>a</sup>	8.20 (5.57-11.82)	7.50 (5.00-11.80)
Linfócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	1.50 (1.10-2.00)	1.35 (1.07-1.82)	1.20 (0.80-1.67)	1.10 (0.70-1.60)	1.20 (0.80-1.60)	1.10 (0.80-1.40)	1.00 (0.77-1.60)	0.90 (0.70-1.10)
Monócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.50 (0.40-0.60)	0.65 (0.57-0.72) <sup>a</sup>	0.60 (0.40-0.80)	0.50 (0.40-0.70)	0.60 (0.40-0.70)	0.60 (0.40-0.70)	0.60 (0.27-0.90)	0.60 (0.40-0.90)
Eosinófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.10 (0.10-0.20)	0.20 (0.10-0.22)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.10 (0.00-0.20)	0.10 (0.00-0.20)	0.00 (0.00-0.20)	0.10 (0.00-0.10)
Basófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.10 (0.00-0.10)	0.10 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)
Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L)	4.01±0.64	4.11±0.55	3.92±0.68	4.05±0.70	3.32±0.55	3.50±0.78	3.60±0.62	3.58±0.59
Hb (g/dL)	12.30±2.08	13.01±2.14	11.86±2.00	12.43±2.00 <sup>a</sup>	10.18±1.45	11.03±2.33	11.20±1.81	11.16±1.84
Hematócrito (%)	37.13±6.22	38.81±6.31	35.84±6.22	37.42±6.74 <sup>a</sup>	30.77±4.53	32.83±6.97	33.79±5.71	33.14±5.58
VGM (fl)	92.76±7.19	94.45±7.76	91.63±6.64	92.60±5.59	93.20±6.13	94.19±8.76	93.83±4.98	92.79±4.96
HGM (pg)	30.80±2.91	31.67±3.04	30.38±2.56	30.76±2.08	30.86±2.21	31.72±3.31	31.17±1.96	31.28±1.90
CHGM (g/dL)	33.17±33.20	33.49±0.83	33.13±0.90	33.20±0.80	32.75±2.62	33.63±0.93	33.22±1.21	33.63±0.87
RDW (%)	15.46±2.26	15.26±2.59	15.39±1.98	15.58±2.54	15.83±1.76	16.09±2.74	15.61±1.36	15.64±1.26
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	235.22±82.27	248.52±123.48	263.25±122.90	242.89±113.32	221.41±104.51	210.56±72.38	227.26±87.53	239.34±110.84
Reticulócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	52.90 (36.4081.90)	72.70 (51.80-93.60)	53.80 (43.10-109.02)	60.30 (44.70-74.67)	39.60 (33.00-76.00)	52.50 (30.70-68.00)	62.10 (41.70-73.00)	91.40 (43.40-139.40)
<b>Função Renal e Glicose</b>								
Glicose (mg/dL)	96.28±8.20	94.47±6.80	185.65±64.62	175.07±53.28	93.36±19.77	102.08±14.40	185.92±74.39	178.13±47.86
Ureia (mg/dL)	33.00 (23.00-39.00)	33.00 (28.50-43.25)	46.50 (33.00-69.00)	53.00 (37.00-79.50) <sup>a</sup>	127.50 (91.75-166.00)	118.00 (94.00-159.00)	115.00 (93.75-147.75)	152.00 (109.00-183.00)
Creatinina (mg/dL)	0.66±0.15	0.87±0.13 <sup>a</sup>	0.84±0.30	1.04±0.37 <sup>a</sup>	2.69±0.97	3.00±1.16	2.19±0.77	2.90±1.07 <sup>a</sup>
<b>Metabolismo do ferro, vitamina B12 e ácido fólico</b>								
Ferro (µg/dL)	31.50 (25.00-55.00)	38.00 (31.00-50.00)	41.00 (27.75-69.00)	38.00 (28.50-61.00)	43.00 (30.00-55.00)	42.00 (20.50-65.50)	35.00 (27.00-44.50)	46.00 (31.50-125.00) <sup>a</sup>
CTFF (µg/dL)	201.75±73.08	214.00±87.71	196.90±73.86	203.79±128.65	195.92±75.62	170.37±80.48	165.40±56.17	195.00±66.49
Ferritina (ng/mL)	329.13 (98.00-674.00)	333.69 (164.00-1347.25)	373.02 (129.75-579.25)	542.00 (113.30-580.00)	407.74 (149.27-607.21)	316.94 (189.09-700.98)	274.35 (188.00-437.35)	454.46 (150.98-604.46)
Transferrina (mg/dL)	194.18±64.97	194.60±70.67	185.95±65.43	175.43±67.11	178.88±68.60	146.87±53.66	165.24±46.12	182.66±75.30
Saturação da Transferrina (%)	15.59 (9.31-21.81)	14.83 (8.87-19.58)	16.20 (11.15-28.83)	17.72 (11.71-24.02)	16.662 (12.42-24.42)	19.10 (15.59-27.11)	15.50 (11.83-21.99)	27.63 (17.82-41.51) <sup>a</sup>
Vitamina B12 (pg/mL)	615.50 (266.75-944.75)	744.50 (164.00-1347.25)	572.50 (295.50-950.00)	542.00 (323.50-984.00)	627.00 (318.00-1186.50)	351.50 (213.50-554.50)	784.00 (486.00-1067.00)	569.00 (250.50-1173.50)
Ácido Fólico (ng/mL)	9.55 (5.43-20.00)	11.28 (8.57-19.52)	8.21 (5.51-13.29)	7.28 (4.30-15.94)	8.84 (4.88-18.59)	6.63 (4.90-10.37)	8.43 (3.97-15.74)	8.25 (4.39-18.68)
<b>Marcadores inflamatórios</b>								
VS (mm)	28.00 (13.50-34.75)	43.00 (5.50-51.50)	56.00 (34.00-70.00)	57.00 (28.00-76.50)	69.00 (42.00-84.75)	52.00 (29.00-78.00)	64.00 (41.00-85.00)	71.00 (24.50-98.00)
PCR (mg/dL)	1.49 (0.39-2.37)	0.96 (0.21-3.76) <sup>a</sup>	6.28 (2.14-16.55)	6.47 (2.28-19.50)	4.51 (1.33-15.73)	6.64 (3.96-16.49)	5.98 (1.98-18.69)	7.89 (2.93-13.96)

Os resultados são apresentados como média, ± desvio padrão ou como mediana (intervalo inter-quartil); <sup>a</sup> p<0.05 vs feminino. Abreviação: Hb = Hemoglobina; VGM = Volume globular médio; HGM = Hemoglobina globular média; CHGM = Concentração de hemoglobina globular média; RDW = *Red blood cells distribution*; CTFF = Capacidade de fixação de ferro; VS = Velocidade de sedimentação; PCR = Proteína C reactiva

## Eritropoiese e inflamação em doentes com IR e/ou com DM2

Não foram encontradas diferenças significativas, nos parâmetros avaliados, no indivíduos controlo do sexo feminino quando estratificados por idade. No entanto, nos indivíduos do sexo masculino com idade superior a 80 anos (tabela 4) encontramos um aumento significativo na contagem de leucócitos totais e de neutrófilos, e diminuição na contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e, na concentração sérica de vitamina B12, quando comparado os que apresentam idade inferior a 80 anos (tabela 4).

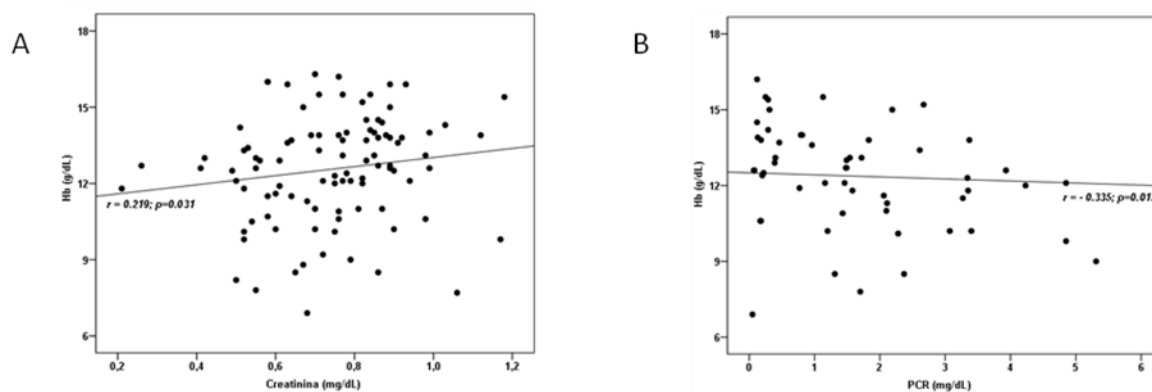
**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico e marcadores inflamatórios nos indivíduos controlos, estratificado por sexo e idade.

Sexo	Feminino		Masculino	
	Idade ( $\leq$ 80 anos) (n=32)	Idade ( $>$ 80 anos) (n=31)	Idade ( $\leq$ 80 anos) (n=20)	Idade ( $>$ 80 anos) (n=14)
<b>Dados hematológicos</b>				
Leucócitos ( $\times 10^9/L$ )	6.36 (5.21-8.85)	7.75 (6.37-8.88)	6.76 (5.38-7.66)	8.27 (6.23-9.68) <sup>a</sup>
Neutrófilos ( $\times 10^9/L$ )	4.05 (3.07-6.10)	4.80 (3.70-6.20)	4.00 (3.30-4.62)	5.75 (3.97-7.02) <sup>a</sup>
Linfócitos ( $\times 10^9/L$ )	1.55 (1.20-1.85)	1.50 (1.00-2.00)	1.50 (1.20-2.07)	1.15 (0.97-1.60)
Monócitos ( $\times 10^9/L$ )	0.50 (0.40-0.60)	0.60 (0.50-0.70)	0.60 (0.50-0.70)	0.70 (0.60-0.80)
Eosinófilos ( $\times 10^9/L$ )	0.10 (0.10-0.20)	0.10 (0.00-0.20)	0.20 (0.10-0.30)	0.10 (0.00-0.20)
Basófilos ( $\times 10^9/L$ )	0.00 (0.00-0.10)	0.10 (0.00-0.10)	0.10 (0.00-0.10)	0.10 (0.00-0.10)
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	3.90 $\pm$ 0.62	4.14 $\pm$ 0.65	4.33 $\pm$ 0.52	3.79 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>
Hb (g/dL)	11.85 $\pm$ 1.95	12.77 $\pm$ 2.14	13.89 $\pm$ 1.99	11.76 $\pm$ 1.70 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	35.76 $\pm$ 5.78	38.54 $\pm$ 6.44	41.41 $\pm$ 5.91	35.10 $\pm$ 4.98
VGM (fl)	92.29 $\pm$ 8.76	93.25 $\pm$ 5.22	95.69 $\pm$ 7.27	92.70 $\pm$ 8.37
HGM (pg)	30.66 $\pm$ 3.55	30.94 $\pm$ 2.11	32.11 $\pm$ 2.93	31.05 $\pm$ 3.18
CHGM (g/dL)	33.15 $\pm$ 1.02	331.8 $\pm$ 0.90	33.52 $\pm$ 0.91	33.46 $\pm$ 0.74
RDW (%)	15.38 $\pm$ 2.65	15.55 $\pm$ 1.82	15.34 $\pm$ 2.53	15.15 $\pm$ 2.77
Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	238.96 $\pm$ 100.06	231.35 $\pm$ 60.11	254.65 $\pm$ 141.37	239.78 $\pm$ 96.72
Reticulócitos ( $\times 10^9/L$ )	52.90 (46.80-63.00)	63.40 (26.00-100.08)	93.60 (93.60-93.60)	NE
<b>Função Renal</b>				
Glicose (mg/dL)	97.62 $\pm$ 6.69	94.90 $\pm$ 9.43	94.55 $\pm$ 5.15	94.35 $\pm$ 8.86
Ureia (mg/dL)	29.50 (20.00-36.00)	33.00 (28.00-40.00)	31.50 (27.50-42.50)	36.50 (28.00-45.00)
Creatinina (mg/dL)	0.63 $\pm$ 0.16	0.70 $\pm$ 0.14 a)	0.85 $\pm$ 0.12	0.89 $\pm$ 0.14
<b>Metabolismo do ferro, vitamina B12 e ácido fólico</b>				
Ferro ( $\mu$ g/dL)	32.00 (24.50-55.00)	31.50 (23.50-70.50)	38.00 (25.50-56.50)	41.00 (26.00-252.75)
CTFF ( $\mu$ g/dL)	207.85 $\pm$ 79.83	195.64 $\pm$ 68.10	231.60 $\pm$ 105.09	196.40 $\pm$ 74.09
Ferritina (ng/mL)	199.11 (136.42-255.25)	442.79 (73.34-697.00)	499.38 (208.63-602.71)	219.97 (62.01-388.81)
Transferrina (mg/dL)	213.42 $\pm$ 66.83	173.46 $\pm$ 58.41	180.00 (170.00-280.00)	173.20 $\pm$ 52.75
Saturação da Transferrina (%)	15.46 (8.48-20.51)	17.27 (10.18-25.33)	15.48 (8.53-22.71)	13.08 (8.44-20.99)
Vitamina B12 (pg/mL)	610.00 (204.00-779.00)	653.00 (359.00-965.00)	1341.00 (536.00-1597.00)	192.00 (57.00-744.50) <sup>a</sup>
Ácido Fólico (ng/mL)	14.81 (7.29-20.00)	6.14 (5.22-10.78)	11.28 (8.57-19.52)	11.57 (5.30-17.96)
<b>Marcadores inflamatórios</b>				
VS (mm)	28.00 (19.00-38.50)	28.00 (12.00-34.00)	10.00 (3.50-52.00)	50.00 (36.00-52.00)
PCR (mg/dL)	1.49 (0.39-2.52)	1.43 (0.29-2.37)	0.37 (0.12-1.44)	4.85 (0.81-5.31)

Os resultados são apresentados como média,  $\pm$  desvio padrão ou como mediana (intervalo inter-quartil); <sup>a</sup>p<0.05 vs idade  $\leq$  80 anos. Abreviação: Hb = Hemoglobina; VGM = Volume globular médio; HGM = Hemoglobina globular média; CHGM = Concentração de hemoglobina globular média; RDW = *Red blood cells distribution*; CTFF = Capacidade total de fixação de ferro; VS = Velocidade de sedimentação; PCR = Proteína C reactiva.

No grupo controlo, encontramos uma correlação significativa entre a idade e a transferrina ( $r=-0.350$ ;  $p=0.034$ ); entre a hemoglobina e a PCR ( $r=-0.335$ ;  $p=0.012$ ), e com a creatinina ( $r=0.219$ ;  $p=0.031$ ); e entre a VS e a hemoglobina HGM ( $r=-0.444$ ;  $p=0.030$ ), a

concentração da hemoglobina globular média (CHGM) ( $r=-0.228$ ;  $p=0.025$ ), e a glicose ( $r=-0.478$ ;  $p=0.018$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Correlação significativa entre a hemoglobina e a creatinina (A) e entre a concentração de hemoglobina e a PCR (B), no grupo controlo.

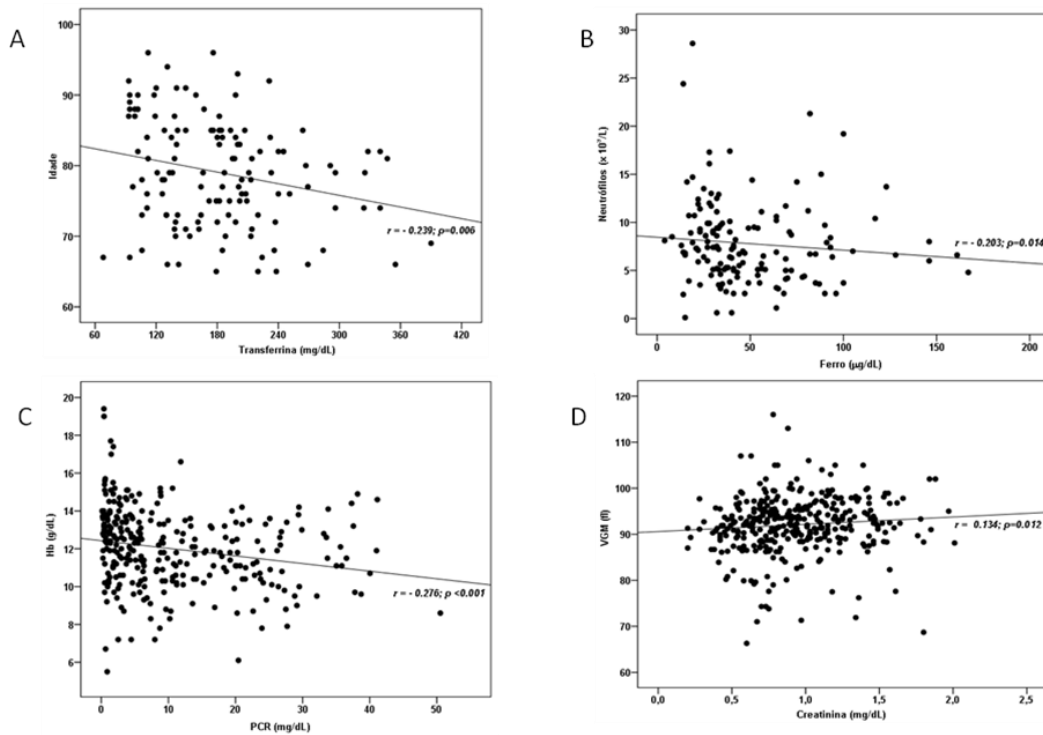
No grupo de doentes com DM2, os indivíduos do sexo feminino com idade superior a 80 anos apresentam aumento significativo na contagem de neutrófilos e nos marcadores de insuficiência renal (ureia e creatinina), quando comparados com os que apresentam idade inferior a 80 anos. Os indivíduos do sexo masculino com idade superior a 80 anos apresentam aumento significativo nos marcadores de insuficiência renal (ureia e creatinina) e no RDW, e uma diminuição significativa na concentração de hemoglobina (tabela 5).

**Tabela 5.** Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico, marcadores inflamatórios nos doentes com DM2, estratificado por sexo e idade.

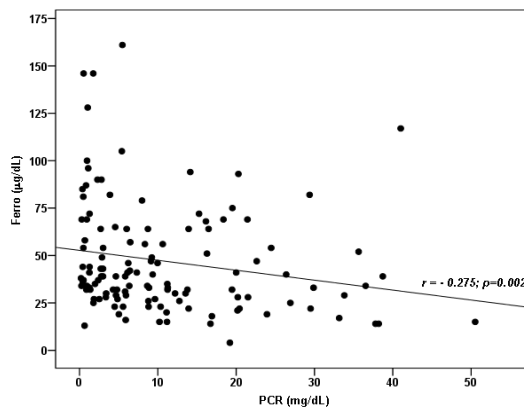
Sexo	Feminino		Masculino	
	Idade ( $\leq$ 80 anos) (n=112)	Idade ( $>$ 80 anos) (n=88)	Idade ( $\leq$ 80 anos) (n=100)	Idade ( $>$ 80 anos) (n=49)
<b>Dados hematológicos</b>				
Leucócitos ( $\times 10^9/L$ )	8.73 (7.26-11.82)	10.55 (8.15-13.27)	8.86 (6.64-12.17)	10.20 (7.29-13.40)
Neutrófilos ( $\times 10^9/L$ )	6.60 (4.60-9.37)	8.30 (6.10-10.67) <sup>a</sup>	6.90 (4.30-10.70)	7.20 (5.25-11.45)
Linfócitos ( $\times 10^9/L$ )	1.25 (0.90-1.80)	1.10 (0.70-1.50)	1.10 (0.80-1.67)	0.90 (0.60-1.45)
Monócitos ( $\times 10^9/L$ )	0.60 (0.40-0.80)	0.60 (0.40-0.90)	0.60 (0.40-0.70)	0.50 (0.30-0.80)
Eosinófilos ( $\times 10^9/L$ )	0.05 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.17)	0.00 (0.00-0.10)
Basófilos ( $\times 10^9/L$ )	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	3.95 $\pm$ 0.72	3.87 $\pm$ 0.64	4.12 $\pm$ 0.67	3.80 $\pm$ 0.74
Hb (g/dL)	11.92 $\pm$ 2.01	11.78 $\pm$ 1.99	12.68 $\pm$ 2.08	11.92 $\pm$ 2.05 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	36.01 $\pm$ 6.27	35.62 $\pm$ 6.19	38.11 $\pm$ 6.81	36.03 $\pm$ 6.46
VGM (fl)	91.30 $\pm$ 7.04	92.06 $\pm$ 6.11	92.77 $\pm$ 5.79	92.27 $\pm$ 5.18
HGM (pg)	30.28 $\pm$ 2.78	30.51 $\pm$ 2.27	30.85 $\pm$ 2.09	30.57 $\pm$ 2.05
CHGM (g/dL)	33.14 $\pm$ 0.87	33.12 $\pm$ 0.95	33.24 $\pm$ 0.77	33.12 $\pm$ 0.85
RDW (%)	15.39 $\pm$ 2.04	15.38 $\pm$ 1.91	15.29 $\pm$ 2.49	16.19 $\pm$ 2.54 <sup>a</sup>
Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	256.21 $\pm$ 107.51	272.21 $\pm$ 140.21	253.24 $\pm$ 119.25	221.77 $\pm$ 97.92
Reticulócitos ( $\times 10^9/L$ )	63.70 (43.10-134.45)	50.05 (38.02-96.50)	56.00 (33.00-98.70)	64.60 (52.80-66.50)
<b>Função Renal e Glicose</b>				
Glicose (mg/dL)	187.29 $\pm$ 67.26	183.56 $\pm$ 61.42	178.81 $\pm$ 55.66	167.44 $\pm$ 47.70
Ureia (mg/dL)	43.00 (29.25-58.75)	52.00 (38.00-80.75) <sup>a</sup>	47.50 (35.00-69.25)	72.00 (43.00-100.00) <sup>a</sup>
Creatinina (mg/dL)	0.80 $\pm$ 0.27	0.89 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.97 $\pm$ 0.36	1.18 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>
<b>Metabolismo do ferro e nutrientes hematopoiéticos</b>				
Ferro ( $\mu$ g/dL)	42.50 (28.00-69.00)	38.00 (26.25-67.75)	37.00 (29.25-62.75)	38.00 (26.50-64.00)
CTFF ( $\mu$ g/dL)	212.94 $\pm$ 77.59	178.78 $\pm$ 65.61 <sup>a</sup>	212.74 $\pm$ 152.64	189.58 $\pm$ 79.17
Ferritina (ng/mL)	375.65 (90.16-545.55)	363.71 (193.32-619.50)	353.18 (156.00-736.50)	273.16 (103.05-551.78)
Transferrina (mg/dL)	199.20 $\pm$ 67.00	170.12 $\pm$ 60.55 <sup>a</sup>	179.08 $\pm$ 68.96	170.18 $\pm$ 66.21
Saturação da Transferrina (%)	15.64 (11.56-25.89)	16.20 (10.08-32.73)	17.47 (10.85-26.58)	357.40 (13.50-20.96)
Vitamina B12 (pg/mL)	623.00 (321.50-1005.50)	496.00 (272.50-778.50)	585.00 (334.50-1102.00)	357.50 (274.50-1030.25)
Ácido Fólico (ng/mL)	8.41 (6.26-13.17)	7.70 (5.02-16.43)	6.82 (4.09-16.60)	8.90 (4.57-15.38)
<b>Marcadores inflamatórios</b>				
VS (mm)	58.00 (35.50-78.25)	52.00 (34.00-68.00)	59.00 (28.00-77.50)	49.00 (27.00-77.00)
PCR (mg/dL)	5.63 (1.60-15.42)	7.98 (2.56-18.58)	6.93 (2.45-19.88)	6.47 (21.9-18.26)

Os resultados são apresentados como média,  $\pm$  desvio padrão ou como mediana (intervalo inter-quartil); <sup>a</sup> p<0.05 vs idade  $\leq$  80 anos  
 Abreviação: Hb = Hemoglobina; VGM = Volume globular médio; HGM = Hemoglobina globular média; CHGM = Concentração de hemoglobina globular média; RDW = *Red blood cells distribution*; CTFF = Capacidade total de fixação de ferro; PCR = Proteína C reactiva

No grupo de doentes com DM2, encontramos uma correlação significativa entre a idade e a contagem de neutrófilos ( $r=0.187$ ;  $p<0.001$ ), a concentração de hemoglobina ( $r=-0.119$ ;  $p=0.026$ ); a creatinina ( $r=0.118$ ;  $p<0.028$ ); e a transferrina ( $r=-0.239$ ;  $p=0.006$ ); entre a contagem de neutrófilos e o ferro sérico ( $r=-0.203$ ;  $p=0.014$ ); entre a hemoglobina e a PCR ( $r=-0.276$ ;  $p<0.001$ ); entre o volume globular médio (VGM) e a creatinina ( $r=0.134$ ;  $p=0.012$ ), a PCR ( $r=-0.142$ ;  $p=0.016$ ), o ferro sérico ( $r=0.188$ ;  $p=0.023$ ), e a saturação da transferrina ( $r=0.224$ ;  $p=0.011$ ); entre a HGM e o ferro sérico ( $r=0.211$ ;  $p=0.010$ ), a saturação da transferrina ( $r=0.245$ ;  $p=0.005$ ). Encontramos também uma correlação significativa entre o ferro sérico e a PCR ( $r=-0.275$ ;  $p=0.002$ ); e entre o RDW e o ferro sérico ( $r=-0.166$ ;  $p=0.044$ ) (figura 6 e 7).



**Figura 6.** Correlação significativa entre: (A) idade e a transferrina; (B) contagem de neutrófilos e o ferro sérico; (C) concentração de Hb e a PCR; (D) VGM e a creatinina, nos doentes com DM2.



**Figura 7.** Correlação significativa entre o ferro sérico e a PCR, nos doentes com DM2.

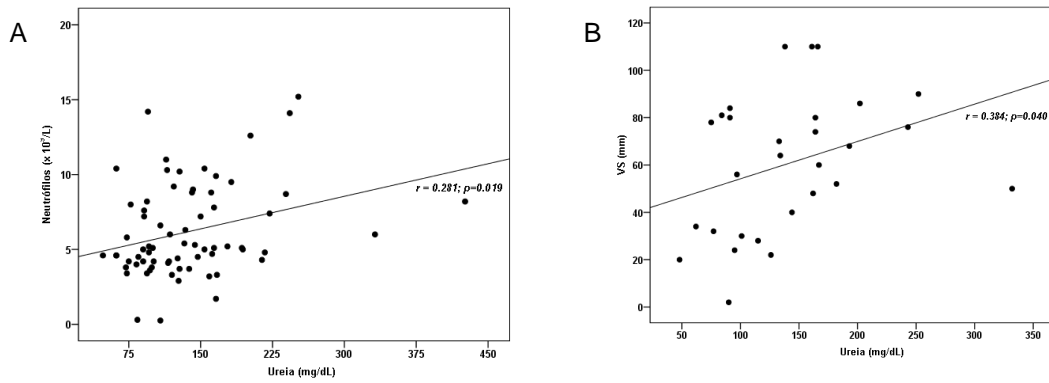
Foram encontradas diferenças significativas na concentração de glicose sérica, nos DR do sexo feminino com idade superior a 80 anos e, um aumento na contagem de eosinófilos nos do sexo masculino com idade superior a 80 anos (tabela 6).

**Tabela 6.** Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico e marcadores inflamatórios nos DR, estratificados por sexo e idade.

Sexo	Feminino		Masculino	
	Idade ( $\leq$ 80 anos) (n=12)	Idade ( $>$ 80 anos) (n=34)	Idade ( $\leq$ 80 anos) (n=11)	Idade ( $>$ 80 anos) (n=12)
<b>Dados hematológicos</b>				
Leucócitos ( $\times 10^9/L$ )	6.82 (5.94-7.79)	6.62 (5.64-8.99)	8.72 (6.01-13.40)	10.00 (7.70-12.62)
Neutrófilos ( $\times 10^9/L$ )	4.90 (4.37-5.37)	5.46 (3.80-7.25)	6.30 (4.20-11.00)	8.18 (6.00-10.02)
Linfócitos ( $\times 10^9/L$ )	1.25 (1.00-1.77)	1.15 (0.80-1.60)	1.10 (0.80-1.30)	1.10 (0.80-1.40)
Monócitos ( $\times 10^9/L$ )	0.50 (0.35-0.67)	0.60 (0.40-0.70)	0.60 (0.40-0.70)	0.55 (0.42-0.70)
Eosinófilos ( $\times 10^9/L$ )	0.10 (0.00-0.17)	0.10 (0.00-0.20)	0.00 (0.00-0.10)	0.15 (0.10-0.20) <sup>a</sup>
Basófilos ( $\times 10^9/L$ )	0.00 (0.00-0.10)	0.05 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)
Eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ )	3.17 $\pm$ 0.67	3.37 $\pm$ 0.51	3.54 $\pm$ 0.94	3.47 $\pm$ 0.63
Hb (g/dL)	9.80 $\pm$ 1.97	10.31 $\pm$ 1.23	11.48 $\pm$ 2.79	10.62 $\pm$ 1.85
Hematócrito (%)	29.76 $\pm$ 6.02	31.13 $\pm$ 3.93	34.27 $\pm$ 8.38	31.51 $\pm$ 5.41
VGM (fl)	94.70 $\pm$ 7.52	92.67 $\pm$ 5.59	96.56 $\pm$ 5.26	92.01 $\pm$ 10.85
HGM (pg)	31.17 $\pm$ 2.52	30.76 $\pm$ 2.12	32.35 $\pm$ 1.76	31.14 $\pm$ 4.28
CHGM (g/dL)	31.57 $\pm$ 4.89	33.17 $\pm$ 0.83	33.49 $\pm$ 0.47	33.75 $\pm$ 1.22
RDW (%)	16.17 $\pm$ 1.94	15.71 $\pm$ 1.71	15.84 $\pm$ 1.35	16.32 $\pm$ 3.63
Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	218.33 $\pm$ 81.18	222.50 $\pm$ 112.66	199.27 $\pm$ 64.63	220.91 $\pm$ 80.22
Reticulócitos ( $\times 10^9/L$ )	61.20 (37.5793.45)	39.00 (54.00-92.00)	37.45 (22.40-52.50)	54.00 (39.00-82.00)
<b>Função Renal e Glicose</b>				
Glicose (mg/dL)	79.50 $\pm$ 22.40	98.26 $\pm$ 16.47 <sup>a</sup>	102.18 $\pm$ 17.01	102.00 $\pm$ 12.32
Ureia (mg/dL)	138.50 (70.50-166.75)	126.50 (91.75-14.50)	108.00 (91.00-142.00)	125.00 (104.50-176.25)
Creatinina (mg/dL)	2.90 $\pm$ 0.95	2.61 $\pm$ 0.98	3.09 $\pm$ 1.27	2.92 $\pm$ 1.09
<b>Metabolismo do ferro e nutrientes hematopoiéticos</b>				
Ferro ( $\mu$ g/dL)	37.00 (27.00-44.00)	45.50 (30.25-62.50)	42.00 (21.25-66.50)	46.00 (19.00-65.50)
CTFF ( $\mu$ g/dL)	185.71 $\pm$ 380.67	199.50 $\pm$ 77.89	190.00 $\pm$ 107.63	173.50 $\pm$ 59.18
Ferritina (ng/mL)	422.00 (193.40-726.22)	393.49 (130.57-448.92)	494.46 (167.81-969.32)	316.94 (217.18-393.51)
Transferrina (mg/dL)	182.50 $\pm$ 68.55	177.85 $\pm$ 70.27	146.25 $\pm$ 69.44	147.50 $\pm$ 43.54
Saturação da Transferrina (%)	15.74 (11.42-17.78)	17.64 (12.80-27.91)	19.10 (15.70-27.23)	19.05 (12.69-27.11)
Vitamina B12 (pg/mL)	502.00 (341.00-999.00)	750.50 (237.50-1380.00)	455.00 (248.00-528.00)	224.00 (182.00-634.00)
Ácido Fólico (ng/mL)	7.55 (4.43-16.26)	10.05 (4.88-19.63)	6.63 (5.05-12.46)	6.56 (3.92-10.27)
<b>Marcadores inflamatórios</b>				
VS (mm)	50.00 (30.50-80.00)	79.00 (54.00-92.00)	69.00 (18.50-77.00)	50.00 (30.00-84.00)
PCR (mg/dL)	3.65 (1.24-6.70)	5.36 (1.18-17.29)	8.97 (3.65-17.27)	4.70 (3.46-14.65)

Os resultados são apresentados como média,  $\pm$  desvio padrão ou como mediana (intervalo inter-quartil); <sup>a</sup> p<0.05 vs idade  $\leq$  80 anos  
 Abreviação: Hb = Hemoglobina; VGM = Volume globular médio; HGM = Hemoglobina globular média; CHGM = Concentração de hemoglobina globular média; RDW = *Red blood cells distribution*; CTFF = Capacidade total de fixação de ferro; VS = Velocidade de sedimentação; PCR = Proteína C reactiva; NE = não efectuado

Nos DR, encontramos uma correlação significativa entre a contagem de neutrófilos e a ureia ( $r=0.281$ ;  $p=0.019$ ); entre o VGM e a VS ( $r=-0.526$ ;  $p=0.003$ ); entre a HGM e o RDW ( $r=-0.330$ ;  $p=0.006$ ); entre o RDW e a ureia ( $r=0.237$ ;  $p=0.050$ ), e a CTFF ( $r=-0.360$ ;  $p=0.034$ ); e entre a VS e a ureia ( $r=0.384$ ;  $p=0.040$ ) (figura 8).



**Figura 8.** Correlação significativa entre a contagem de neutrófilos e a ureia (A); entre os valores de VS e ureia, no grupo de doentes com DR.

Os DR com DM2 do sexo feminino com idade superior a 80 anos apresentam aumento significativo na concentração de ferritina, diminuição na contagem de reticulócitos e na concentração de transferrina quando comparados com os doentes com idade inferior a 80 anos. Nos doentes do sexo masculino não se encontraram diferenças significativas entre os que apresentam idade superior a 80 anos, com os que apresentam idade inferior a 80 anos (tabela 7).

**Tabela 7.** Parâmetros hematológicos, função renal e glicose, marcadores do metabolismo de ferro, vitamina B12 e ácido fólico e marcadores inflamatórios nos DR com DM2, estratificado por sexo e idade.

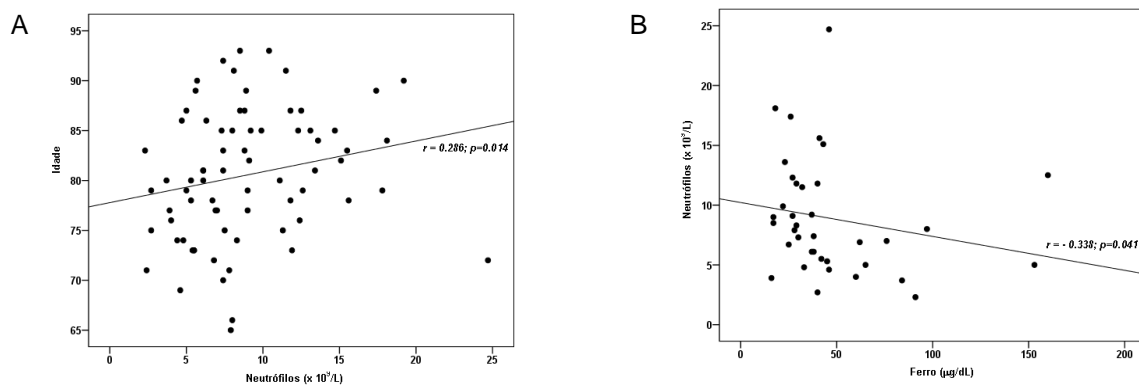
Sexo	Feminino		Masculino	
	Idade (≤ 80 anos) (n=26)	Idade (> 80 anos) (n=24)	Idade (≤ 80 anos) (n=11)	Idade (> 80 anos) (n=12)
<b>Dados hematológicos</b>				
Leucócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	8.90 (7.71-11.50)	12.00 (9.73-14.57)	8.69 (5.28-12.80)	9.51 (7.53-16.82)
Neutrófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	6.95 (5.22-9.52)	9.00 (7.40-12.90)	6.80 (3.70-11.30)	8.40 (5.80-13.17)
Linfócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	1.00 (0.77-1.72)	0.95 (0.72-1.27)	0.90 (0.70-1.40)	0.80 (0.47-1.10)
Monócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.60 (0.27-0.70)	0.65 (0.22-1.07)	0.70 (0.50-1.00)	0.45 (0.40-0.82)
Eosinófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.10 (0.00-0.20)	0.00 (0.00-0.17)	0.10 (0.00-0.10)	0.05 (0.00-0.17)
Basófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.00)
Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L)	3.58±0.69	3.62±3.55	3.65±0.55	3.52±0.65
Hb (g/dL)	11.01±2.05	11.42±1.52	11.53±1.84	10.83±1.84
Hematócrito (%)	33.23±6.53	34.39±4.73	34.18±5.31	32.20±5.89
VGM (fl)	92.86±4.09	94.88±5.70	93.51±4.82	92.13±5.21
HGM (pg)	30.83±1.64	31.54±2.23	31.55±1.99	31.04±1.87
CHGM (g/dL)	33.22±1.30	33.21±1.15	33.55±0.80	33.71±0.97
RDW (%)	15.55±1.18	15.67±1.55	15.37±0.93	15.89±1.51
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	227.23±93.72	227.29±82.30	238.90±132.83	239.75±92.36
Reticulócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	72.80 (72.00-73.60)	48.40 (21.60-52.20) <sup>a</sup>	91.40 (43.40-139.40)	NE
<b>Função Renal</b>				
Glicose (mg/dL)	196.11±82.66	174.87±64.16	171.45±42.77	184,25±53,23
Ureia (mg/dL)	111.50 (86.00-159.00)	117.50 (102.75-145.75)	157.00 (90.00-176.00)	142.50 (117.25-210.50)
Creatinina (mg/dL)	2.27±0.96	2.11±0.49	2.93±1.05	2.88±1.12
<b>Metabolismo do ferro, vitamina B12 e ácido fólico</b>				
Ferro (µg/dL)	41.00 (29.00-60.00)	29.00 (22.50-38.00)	43.00 (28.75-74.50)	97.00 (31.50-156.50)
CTFF (µg/dL)	181.06±56.90	152.00±50.84	162.00±62.06	221.40±63.18
Ferritina (ng/mL)	221.98 (89.52-302.19)	362.71 (266.46-911.75) <sup>a</sup>	626.95 (62.78-1463.00)	448.92 (229.49-498.50)
Transferrina (mg/dL)	185.30±47.62	143.50±34.28 <sup>a</sup>	147.00±62.04	211.20±78.50
Saturação da Transferrina (%)	17.43 (11.45-23.78)	13.35 (11.74-21.53)	26.54 (15.53-30.28)	33.06 (14.52-54.95)
Vitamina B12 (pg/mL)	744.00 (486.00-992.00)	852.50 (347.50-1912.75)	820.00 (359.00-1527.00)	465.00 (140.75-1086.50)
Ácido Fólico (ng/mL)	8.90 (4.05-20.00)	7.38 (3.75-15.06)	19.03 (3.11-20.00)	5.22 (4.50-14.46)
<b>Marcadores inflamatórios</b>				
VS (mm)	69.00 (46.50-87.50)	56.00 (24.00-88.50)	92.00 (16.00-100.00)	NE
PCR (mg/dL)	3.89 (1.77-20.04)	8.91 (3.74-20.00)	5.75 (2.75-14.90)	12.46 (3.34-13.97)

Os resultados são apresentados como média, ± desvio padrão ou como mediana (intervalo inter-quartil); <sup>a</sup> p <0.05 vs idade ≤ 80 anos

Abreviação: Hb = Hemoglobina; VGM = Volume globular médio; HGM = Hemoglobina globular média; CHGM = Concentração de hemoglobina globular média; RDW = *Red Blood cells distribution*; CTFF = Capacidade total de fixação de ferro; VS = Velocidade de sedimentação; PCR = proteína C reactiva

Nos DR com DM2, encontramos uma correlação significativa entre a idade e a contagem de neutrófilos ( $r=0.286$ ;  $p=0.014$ ); e o ferro sérico ( $r=-0.338$ ;  $p=0.041$ ), e a saturação da transferrina ( $r=-0.363$ ;  $p=0.035$ ); e entre a PCR e o ferro sérico ( $r=-0.450$ ;  $p=0.013$ ) (figura 9).

## Eritropoiese e inflamação em doentes com IR e/ou com DM2



**Figura 9.** Correlação significativa entre a idade e a contagem de neutrófilos (A); e entre a contagem de neutrófilos e o ferro sérico (B), nos DR com DM2.

## **CAPÍTULO V – Discussão e Conclusão**

Neste trabalho foram avaliadas alterações eritropoiéticas e inflamatórias em doentes com DR e/ou com DM2. Foram ainda avaliadas as alterações associadas ao género e à idade, tanto no grupo controlo, como nos 3 grupos de doentes.

### **Alterações associadas com doença renal**

Os nossos DR apresentam uma diminuição da concentração da hemoglobina, do hematócrito e na contagem de eritrócitos, à qual se associa um aumento do processo inflamatório. A diminuição dos parâmetros hematológicos nestes doentes poderá estar relacionada com a diminuição na produção renal de EPO e/ou com o aumento do processo inflamatório.

De acordo com o descrito previamente por muitos autores (Klahr, 2003, Rao M, 2007), a DR tem vindo a ser associada com aumento dos níveis séricos de proteínas de fase aguda, tais como a PCR, dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente a IL-6, dos componentes do sistema de complemento e dos marcadores de disfunção endotelial. Este aumento no processo inflamatório descrito na literatura nos DR, e que nós confirmamos neste trabalho, poderá justificar a diminuição da hemoglobina nestes doentes. Pois como é sabido, o aumento do processo inflamatório, nomeadamente pelo aumento dos níveis de IL-6, está associado a um aumento nos níveis de hepcidina, que por sua vez inibe a absorção intestinal do ferro e diminui a sua libertação pelos macrófagos (Fuchs D, 1991), condicionando uma diminuição da quantidade de ferro disponível para a eritropoiese.

Por outro lado, o declínio da função renal tem vindo também a ser associado com diminuição da produção de EPO pelo rim (Sonmez, 2010). Esta diminuição de EPO condiciona inevitavelmente diminuição na resposta à hipoxia, e conseqüentemente diminuição da eritropoiese.

A anemia associada com a diminuição da função renal é um problema clínico significativo principalmente nos indivíduos seniores, a qual se associa aumento da morbilidade e da mortalidade, associada principalmente a doença cardiovascular (Barbagallo, 2004). A anemia é uma característica comum nos DR, e é uma complicação de etiologia multifactorial. Tratamento com agentes estimuladores de eritropoiese foi um marco na nefrologia moderna, que teve vantagem inquestionável nos DR. No entanto, estudos recentes têm mostrado que a correcção da anemia na DR dos estádios 3-4 pode ser prejudicial (Sonmez, 2010).

Nos nossos DR, não se encontrou correlação entre os parâmetros hematológicos e os marcadores inflamatórios, com excepção da correlação entre o VGM e a VS. Estes resultados poderão estar relacionados com o facto dos nossos doentes renais nos estádios 3 e 4, e como tal, o grau de inflamação ser baixo.

### **Alterações associadas com diabetes *mellitus* tipo 2**

O grupo de doentes com DM2 apresentam, quando comparados com o grupo controlo, alterações na função renal e aumento no processo inflamatório.

A DM2 está entre as doenças crónicas mais comuns que afecta sobretudo indivíduos idosos, quanto mais a população envelhece maior é a proporção de doentes com DM2 e consequentemente as suas complicações se expendem. Tem vindo a ser associado com alterações micro e macrovasculares, sendo esta última a principal causa de mortalidade nestes doentes (El Oudi M, 2010).

O aumento do processo inflamatório nestes doentes tem vindo a ser descrito na literatura, através de vários estudos mostrando que a PCR e algumas citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e TNF- $\alpha$ , estão elevados, tal como encontramos também no nosso grupo de doentes. As causas deste aumento no processo inflamatório são diversas e ainda não estão totalmente esclarecidas; no entanto, a obesidade, a resistência à insulina e a disfunção endotelial são causas identificadas nestes doentes (Golbidi, 2011).

Nos indivíduos com DM2, o aumento da idade parece estar relacionada com aumento da inflamação (correlação positiva entre a idade e a contagem de neutrófilos, e negativa entre a idade e a transferrina), com a diminuição da função renal (correlação positiva entre a idade e a concentração de creatinina), e com diminuição na concentração da hemoglobina (correlação negativa entre a idade e a concentração de hemoglobina). A diminuição da concentração de hemoglobina nestes doentes poderá também estar relacionada com o aumento do processo inflamatório. Efectivamente encontramos correlações significativas entre a contagem de neutrófilos e o ferro sérico; entre a hemoglobina e a PCR; entre o VGM e a PCR e, a saturação da transferrina; entre a HGM, e o ferro sérico e a saturação da transferrina; e entre o ferro sérico, e a PCR e o RDW.

### **Alterações associadas com doença renal e com diabetes *mellitus* tipo 2**

A diabetes é a causa mais comum de DR no mundo ocidental; presente em quase dois terços de todos os doentes com insuficiência renal (Navarro, 2008). A lesão renal provocada pela diabetes é a chamada de nefropatia diabética. A incidência de nefropatia diabética está a aumentar, por um lado devido ao número crescente de casos de DM2 e por outro pela maior esperança de vida destes doentes, graças às medidas de intervenção adoptadas (Remuzzi, 2002). As causas exactas da nefropatia diabética ainda são desconhecidas; no entanto, estudos sugerem que alguns dos mecanismos envolvidos incluem a hiperglicemia, a presença em circulação de complexos glicosilados e o aumento do processo inflamatório (Cooper, 1998), que condicionam alterações na histologia renal (Thomas, 2004).

Os nossos DR com DM2 apresentaram diminuição na concentração da hemoglobina, no hematócrito e na contagem de eritrócitos, quando comparados com o grupo controlo e ao grupo de doentes com DM2. Nos parâmetros inflamatórios apenas encontramos diferença

estatisticamente significativa entre os 3 grupos de doentes na contagem de neutrófilos, sugerindo que o grau de inflamação é significativamente superior no grupo de DM2, particularmente quando associado a DR. Estes resultados vêm de encontro ao descrito por Dalla Vestra e et al. (2005), que mostraram que os indivíduos com DM2 e com nefropatia diabética manifestam níveis elevados de exposição diversificada de fase aguda marcadores de inflamação e citocinas pró-inflamatórias, incluindo PCR e IL-6 que foram maiores em indivíduos com membrana glomerular.

Nos nossos DR com DM2, o aumento da idade parece estar relacionada com aumento da inflamação (correlação positiva entre a idade e a contagem de neutrófilos e negativa entre a idade e o ferro sérico). Este processo inflamatório está muito mais exacerbado nos DR com DM2 do sexo masculino.

### **Alterações associadas com género e idade nos indivíduos controlo**

Os indivíduos controlo do sexo masculino apresentaram diminuição na contagem de eritrócitos e na concentração da hemoglobina, quando comparados com os indivíduos com idade inferior a 80 anos. Efectivamente, tem vindo a ser descrito na literatura aumento da prevalência de anemia com a idade, sendo mais acentuada após os 80 anos (Barbagallo, 2004). A correlação negativa entre a concentração de hemoglobina e a PCR, assim como o aumento do número de neutrófilos totais e a correlação negativa entre a idade e a concentração de transferrina, sugere que este declínio da hemoglobina associado com a idade poderá estar relacionado com o aumento do processo inflamatório associado com aumento de idade (Barbagallo, 2004).

**Em conclusão**, os nossos resultados demonstram que tanto os DR como os doentes com DM2 apresentam alterações eritropoiéticas, que poderão estar associadas com aumento no processo inflamatório. Mais estudos serão necessários para esclarecer a origem do processo inflamatório, nestes doentes e a sua influência no prognóstico e prognóstico da DR e de DM2.

## **CAPÍTULO VII - Bibliografia**

**Abensur H. (2010).** Deficiência de ferro na doença renal crónica. *Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia* 32: 95-98.

**Afman LA, Van Der Put NMJ, Thomas CMG, Trijbels JMF, Blom HJ. (2001).** Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. *QJM: An International Journal of Medicine* 94: 159-166.

**Agarwal SK, Srivastava RK. (2009).** Chronic kidney disease in Índia: challenges and solutions. *Nephron Clinical - Practice* 111:197-203.

**Akihiko Y, Ken'ichi A. (1996).** The Erythropoietin Receptor and Signal Transduction, *The Oncologist* 1: 337-339.

**Al-Sheikh M, Moradkhani K, Lopez M, Wajcman H, Préhu C. (2008).** Disturbance in the HIF-1 $\alpha$  pathway associated with erythrocytosis: Further evidences brought by frameshift and nonsense mutations in the prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2) gene. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*; 40: 160-165.

**American Diabetes Association. (2007).** Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 30: S42-47.

**Anderson J, Frazer DM, McLaren GD. (2009).** Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol*; 25:129-35.

**Atkins RC, Zimmet P. (2010).** Diabetic kidney disease: act now or pay later. *Nephrology Dialysis Transplant* 25: 331-333.

**Baer AN, Dessypris EN, Krantz SB. (1990).** The pathogenesis of anemia in rheumatoid arthritis: a clinical and laboratory analysis. *Seminars Arthritis Rheumatism* 14:209-223.

**Barbagallo M, Bellavia G, Dominguez LJ, Galioto A, Ferlisi A, Putignano E, Belvedere M, Costanza G, Sciacca AD. (2004).** Anemia e declino funzionale nell'anziano. *G Gerontology* 52: 283-289.

**Barrios MF, Hernández Irma G, Défaix Gómez HG du. (1999).** Vitamina B12: Metabolismo y aspectos clínicos de su deficiência. *Rev Cubana Hematologia Inmunologia Hemoterapia* 15: 159-74.

**Brody, T. (1994).** Vitamins. In *Nutritional Biochemistry*. Edited by Brody, T. Academic Press, San Diego, Califórnia: 355–484.

**Bryce PJ, Mathias CB, Harrison KL, Watanabe T, Geha RS, Oettgen HC. (2006).** The H1 histamine receptor regulates allergic lung responses, *Journal Clinic Investigation* 116: 1624-1632.

**Brzezinska A, Winska P, Balinska M. (2000).** Cellular aspects of folate and antifolate membrane transport. *Acta Biochimica Polonica* 47: 735-749.

**Byts N, Sirén AL. (2009).** Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent. *Experimental Translational Stroke Medicine* 21: 1-4.

**Calle MC, Fernandez ML. (2010).** Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutrition Research Practice* 4: 259-269.

**Carmel R. (2002).** Measuring and interpreting holo-transcobalamin (holo-transcobalamin II). *Clinical Chemistry* 48: 407-9.

**Choudhary N, Ahlawat RS. (2008).** Interleukin-6 and C-reactive protein in pathogenesis of diabetic nephropathy: new evidence linking inflammation, glycemic control, and microalbuminuria. *Iranian Journal of Kidney Diseases* 2:72-9.

**Chung J, Wessling-Resnick (2003).** Molecular mechanisms and regulation of iron transport. *Critica Reviews Clinical Laboratory Sciences* 40: 151-82.

**Cooper ME. (1998).** Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet* 352: 213-9.

**Correia G. (2009).** Resultados do estudo da prevalência da diabetes em Portugal. *Anamnesis* 18: 10 – 11.

**Czeize, AE. (1996).** Ácido fólico: Vitaminas na gravidez e na primeira infância. *Anais Nestlé* 53: 22-9.

**Dali-Youcef N, Andrès E. (2009).** An update on cobalamin deficiency in adults. *QJM: An Internacional Journal of Medicine* 102: 17-28.

**Douglas B. Cines, Eleanor S. Pollak, Clayton A. Buck, et al. (1998).** Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 91: 3527-3561.

**Douglas MR, Morrison KE, Salmon M, Buckley CD. (2002).** Why does inflammation persist: a dominant role for the stromal microenvironment? In *Expert Reviews Molecular Medicine* 4: 1-18.

Eritropoiese e inflamação em doentes com IR e/ou com DM2

**Ebert BL, Bunn HF. (1999).** Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 94: 1864-1877.

**Eckardt KU. (2000).** Pathophysiology of renal anemia. *Clinical Nephrology*, 53: S2-8.

**Eddy AA. (2005).** Progression in chronic kidney disease. *Advances in Chronic Kidney Disease* 12: 353-65.

**El Oudi M, Aouni Z, Ouertani H, Mazigh C, Machghoul. (2010).** Effect of lipopenic and hypotensive treatment on homocysteine levels in type 2 diabetics. *Journal of Vascular Health and Risk Management* 6: 327-332.

**Elliott S, Pham E, Macdougall IC. (2008).** Erythropoietins: a common mechanism of action, *Experimental Hematology* 36: 1573-1584.

**Fauci, Braunwald et al (2008).** *Harrison's: Principles of Internal Medicine*. In: The Metabolic Syndrome (Eckel R, ed), 1509-1514.

**Felli N, Pedini F, Romania P, Biffoni M, Morsilli O, Castelli G, Santoro S, Chacarella S, Sorrentino A, Peschle C, Marziali G. (2009).** MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica* 94: 479-86.

**Forssén KM, MSc, Jägerstad MI, Wigertz K, Witthöft CM. (2000).** Folates and Dairy Products: A Critical Update. *Journal of the American College of Nutrition* 19: 100S–110S.

**Fried W. (2009).** Erythropoietin and erythropoiesis. *Experimental Hematology* 37: 1007-15.

**Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Dierich MP, Wachter H. (1991).** Immune activation and the anaemia associated with chronic inflammatory disorders. *European Journal Haematology* 46: 65-70.

**García RP, Benítez PR, Dall C, Gómez AP, Valderrabano CF. (2001).** Preocupante incremento de la diabetes como causa de insuficiencia renal terminal. Evaluación del tratamiento sustitutivo. *Anales Medicina Interna* 18:175-180.

**Grotto, Helena ZW. (2010).** Fisiologia e metabolismo do ferro. *Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia* 32: 8-17.

**Henry, JB. (1999).** Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 19ª ed. São Paulo: Manole Ltda, 26: 621-4.

**Herbert V, Colman N, & Jacob E. (1980).** Folic acid and vitamin B12. In: *Modern Nutrition in Health and Disease*. 6<sup>th</sup>. Edited by Goodhart R.S. and Shils M.E. Lea & Febiger, Philadelphia: 229–259.

**Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J. (2003).** Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *American Journal Clinical Nutrition* 78: 131-6.

**Hoffbrand AV, Pettit FE, Moss PAH. (2006).** Essential Haematology. 5th ed. Oxford (UK): Blackwell Publishing; Hypochromic anaemias and iron overload 3: 28-43.

**Hsu CL, Neilsen CV, Bryce PJ. (2010).** IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation. *PLoS One* 5: 11944.

**IDF Diabetes Atlas, International Diabetes Federation (2009)** [Cited: Outubro 25, 2011.] <http://www.worlddiabetesfoundation.org/composite-58.htm>

**Kinet JP. (2007).** The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. *Immunological Reviews* 217: 5-7.

**King, TC. (2007).** Inflamação, Mediadores Inflamatórios e Doença Mediada pelo Sistema Imune. In: Patologia. *Série Elsevier* 21-61.

**Klahr S, Morrissey J. (2003).** Progression of chronic renal disease. *American Journal Kidney Disease* 2003; 41: S3-7.

**Klee GG. (2000).** Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B (12) and folate. *Clinical Chemistry* 46: 1277-83.

**Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. (2008).** Body iron metabolism and pathophysiology or iron overload. *International Journal Hematology* 88: 7-15.

**Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. (2007).** Selective modulation of the erythropoietic and tissue-protective effects of erythropoietin: Time to reach the full therapeutic potential of erythropoietin. *Biochemica et Biophysica Acta* 1776: 1-9.

**Lenz O, Fornoni A. (2006).** Chronic kidney disease care delivered by US family medicine and internal medicine trainees: results from an online survey. *BMC Medicine* 4: 30-9.

**Lloyd-Wright Z, Hvas AM, Møller J, Sanders TA, Nexø E. (2003).** Holotranscobalamin as an indicator of dietary vitamin B12 deficiency. *Clinical Chemistry* 49: 2076-8.

**Mahajan A, Tabassum R, Chavali S, Dwivedi OP, Bharadwaj M, Tandon N, Bharadwaj D. (2009).** High-sensitivity C-reactive protein levels and type 2 diabetes in urban North Indians. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism* 94: 2123-7.

**Mahan, LK, Escott-Sutmp S. (1998).** Krause: Alimentos Nutrição e Dietoterapia. 9ª ed. São Paulo, Editora Roca.

**Maiese K, Li F, Chong ZZ. (2005).** New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA* 293: 90-5.

**Malekmakan L, Haghpanah S, Pakfetrat M, Malekmakan A, Khajehdehi P. (2009).** Causes of chronic renal failure among Iranian Hemodialysis patients. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* 20: 501-4.

**McClellan W, Aronoff SL, Bolton WK, Hood S, Lorber DL, Tang KL, Tse TF, Wasserman B, Leiserowitz M. (2004).** The prevalence of anaemia in patients with chronic kidney disease. *Current Medicine Research & Opinion* 20: 1501-10.

**McNulty H. (1995).** Folate requirements for health in different population groups. *British Journal of Biomedical Science* 52: 110-9.

**Means RTJr, Krantz SB. (1992).** Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* 80: 1639-1647.

**Means RTJr. (1999).** Advances in the anemia of chronic disease. *International Journal Hematology* 70: 7-12.

**Melnikov VY, Molitoris BA. (2008).** Improvements in the diagnosis of acute kidney injury. *Saudi Journal of Kidney Diseases Transplantation* 19: 537-44.

**Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. (2009).** An update on iron physiology. *World Journal Gastroenterology* 15: 4617-26.

**Nasser, C. Nobre C, Mesquita S, Ruiz JR, Carlos HR, Prouvot L, Yacubian EMT. (2005).** Semana da conscientização sobre a importância do ácido fólico. *Journal Epilepsy and Clinical Neurophysiology* Dezembro 11: 199-203.

**Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. (2007).** Role of erythropoietin in the brain. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 64: 159-171.

**Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, Fujiwara Y, Barker JE, Fleming MD. (2005).** Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nature Genetics* 37: 1264-9.

**Okada Y, Takahashi A, Ohmiya H, Kumasaka N, kamatani Y, Hosono N, Tsunoda T, Matsuda K, Tanaka T, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K, kamatani N. (2011).** Genome-wide association study for C-reactive protein levels identified pleiotropic associations in the IL6 locus. *Human Molecular Genetics* 20: 1224-31

**Percy MLJ (2007).** Genetically heterogeneous origins of idiopathic erythrocytosis. *Hematology* 12: 131-139.

**Pietrangelo A. (2004).** The ferroportin disease. *Blood Cells Molecules Diseases* 32: 131-8.

**Powers A. (2008).** Diabetes Mellitus. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al, editors. *Harrison's principles of internal medicine. 17a ed. New York (NY): McGraw Hill, 2275-2304.*

**Raj SM, Howson JM, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Field SF, Stevens HE, Tood JA. (2009).** No association of multiple type 2 diabetes loci with type 1 diabetes. *Diabetologia* 52: 2109-16.

**Rao M, Wong C, Kanetsky P, Girndt M, Stenvinkel P, Reilly M, Raj DS. (2007).** Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular diseases. *Kidney International* 72: 549-56.

**Real JMF, Pickup JC. (2008).** Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology Metabolic* 19: 10-6.

**Gorczyński R, Jacqueline Stanley. (1999).** Inflammation. In: *Clinical Immunology. Landes Bioscience. Austin, Texas, U.S.A. 191-210.*

**Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenti P. (2002).** Clinical practice: nephropathy in patients with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 346: 1145-51.

**Rodrigues C. (2011).** Doença Renal Crónica: [Online] Um em cada 10 portugueses sofre de doença renal crónica. [Cited: Abril 2, 2011.]

[http://medicosdeportugal.saude.sapo.pt/utentes/doencas\\_urologicas/doenca\\_renal\\_cronica\\_um\\_em\\_cada\\_10\\_portugueses\\_sofre\\_de\\_doenca\\_renal\\_cronica](http://medicosdeportugal.saude.sapo.pt/utentes/doencas_urologicas/doenca_renal_cronica_um_em_cada_10_portugueses_sofre_de_doenca_renal_cronica)

**Romão Jr, Egidio J, Canziani ME, Barretti P. (1999).** Anemia na insuficiência renal crónica: novas tendências. *Jornal Brasileiro Nefrologia* S1-S10.

**Romão Jr, Egidio J. (2004).** Doença renal crónica: definição, epidemiologia e classificação. *Jornal Brasileiro Nefrologia* 26: 1-3.

**Romão Jr, Egidio J. (2006).** Insuficiência renal crónica. In: Cruz J, Praxedes JN, Cruz HMM. *Nefrologia*. Editora Sarvier; São Paulo: 248-266.

**Rosert J, Eckardt KU. (2005).** Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrology Dialysis Transplant* 20: 1025-8.

**Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. (2001).** Proinflammatory actions of angiotensins. *Current Opinion in Nephrology Hypertension* 10: 321-9.

**Said HM, Mohammadkhani R. (1993).** Folate transport in intestinal brush border membrane: involvement of essential histidine residue (s). *Biochemical Journal* 290: 237–240.

**Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, Mckie AT. (2005).** Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122: 789-801.

**Shu XO, Long J, Cai Q, Qi L, Xiang YB, Cho YS, Tai ES, Li X, Lin X, Chow WH, Go MJ, Seielstad M, Bao W, Li H, Cornelis MC, Yu K, Wen W, Shi J, Han BG, Sim XL, Liu L, Qi Q, Kim HL, Ng DP, Lee JY, Kim YJ, Li C, Gao YT, Zheng W, Hu FB. (2010).** Identification of new genetic risk variants for type 2 diabetes. *PLoS Genetics* 6: 1001127.

**Skovgaard K, Mortensen S, Boye M, Poulsen KT, Campbell FM, Eckersall PD, Heegaard PM. (2009).** Rapid and widely disseminated acute phase protein response after experimental bacterial infection of pigs. *Veterinary Research* 40: 23.

**Sonmez A, Yilmaz MI, Saglam M, Kilic S, Eyileten T, Uckaya G, Caglar K, Oguz Y, Vural A, Yenicesu M, Kutlu M, Kinalp C, Zoccali C. (2010).** The relationship between hemoglobin levels and endothelial functions in diabetes mellitus. *Clinical Journal of the American Society Nephrology* 5: 45-50.

**Spivak JL. (2000).** The blood in systemic disorders. *Lancet* 355: 1707-1712.

**Steinberg, SE. (1984).** Mechanisms of folate homeostasis. *Am. J. Physiol.* 246: G312–G 324.

**Stevens DC. (2010).** Cytokines. In: *Clinical Immunology & Serology* 3<sup>th</sup> ed. Philadelphia 72-80.

**Stites DP, Terr AI, Parslow TG. (1997).** Inflammation *Prentice-Hall International Inc* 9<sup>th</sup> ed. U.S.A: 182-195.

**Thomas S, Rampersad M. (2004).** Anaemia in diabetes. *Acta Diabetologia* 41: S13-7.

**Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. (1996).** Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Journal American College Cardiology* 27: 1201-6.

**Tsakiris D. (2000).** Morbidity and mortality reduction associated with the use of erythropoietin. *Nephron* 85: 2-8.

**Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, Rothenberg SP, Fedosov SN, Sundrehagen E, Orning L. (2002).** Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. *Clinical Chemistry* 48: 526-32.

**van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. (2010).** Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators of Inflammation* 2010: 792393.

**Vannucchi H., Jordão Jr AA. (1998).** Vitaminas hidrossolúveis. In: Dutra-de-Oliveira, JE, Marchini JS. *Ciências Nutricionais*. São Paulo: Sarvier 191-207.

**Wakai K, Nakai S, Kikuchi K, Iseki K, Miwa N, Masakane I, Wada A, Shinzato T, Nagura Y, Akiba T. (2004).** Trends in incidence of end-stage renal disease in Japan, 1983-2000: age-adjusted and age-specific rates by gender and cause. *Nephrology Dialysis Transplant* 19: 2044-52.

**Weiss G. (1999).** Iron and anemia of chronic disease. *Kidney International* 69:12-17.

**Weiss G. (2000).** Advances in the diagnosis and management for the anemia of chronic disease. *Hematology* 42-45.

**Wellen K, Hotamisligil GS. (2005).** Inflammation, stress, and diabetes. *Journal Clinical Investigation* 115: 1111-9.

Eritropoiese e inflamação em doentes com IR e/ou com DM2

**Wickrema A, Barbara K. (2009).** Molecular Basis of Hematopoiesis. In: *Molecular Biology of Erythropoiesis* Springer Science Business Media, LLC: 73-94.

**Wijayanti N, Katz N, Immenschuh. (2004).** Biology of heme in health and disease. *Current Medicinal Chemistry* 11: 981-6.

**WHO, World Health Organization. (2008).** World wide prevalence of anaemia 1993 2005. [Online] Who Global Database on Anaemia. [Cited: Novembro 2, 2010.] [http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf).

**Yoshimura A, Arai K. (1996).** Physician Education: The Erythropoietin Receptor and Signal Transduction. *Oncologist* 1: 337-339.

**Zhang AS, Enns CA. (2009).** Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 207-14.

**Zeyda M, Stulnig TM. (2009).** Obesity, inflammation, and insulin resistance a mini-review. *Gerontology* 55: 379-86.