



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

↳ Instituto de Ciências da Saúde

RESISTÊNCIA À TERAPÊUTICA COM ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE BMP 2 EM DOENTES HEMODIALISADOS

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 de Hematologia e
Imunohemoterapia

Joana Lopes Martins Coimbra

Novembro de 2011



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

↳ Instituto de Ciências da Saúde

RESISTÊNCIA À TERAPÊUTICA COM ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE BMP 2 EM DOENTES HEMODIALISADOS

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 de Hematologia e
Imunohemoterapia

Joana Lopes Martins Coimbra

Orientadores:

Professora Doutora Maria Alice dos Santos Silva G. Martins

Professor Doutor Elísio Manuel de Sousa Costa

Novembro de 2011

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract	IV
Lista de Abreviaturas	VI
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas.....	IX
Parte I - Introdução.....	1
1. Doença Renal Crónica.....	2
1.1 – Introdução	2
1.2 - <i>Terapêutica de Substituição</i>	4
1.2.1 - <i>Hemodiálise</i>	5
1.2.2 – <i>Diálise Peritoneal</i>	6
1.2.3 – <i>Hemodiafiltração Online</i>	8
1.2.4 – <i>Transplante Renal</i>	8
2 – Doença Renal Crónica associada a <i>Diabetes Mellitus</i>	10
3. Doença renal crónica e suas complicações.....	12
3.1. <i>Anemia no doente renal crónico</i>	12
3.1.1- <i>Terapêutica com Eritropoietina Humana Recombinante</i>	13
3.1.2- <i>Resistência à terapêutica com EPOhr</i>	13
3.2- <i>Inflamação</i>	15
3.3- <i>Ferro e seu metabolismo</i>	16
3.3.1.- <i>Regulação da absorção do ferro</i>	18
Parte II – Objectivos.....	23
1. Objectivo	24
Parte III – Metodologia	25
1. Material e métodos.....	26
1.1. Doentes.....	26
1.2. Ensaios	27
1.3. Análise Estatística	28
Parte IV – Resultados.....	29
Parte V – Discussão e Conclusões	38
Parte VI – Bibliografia	43

Agradecimentos

À Doutora Alice Santos Silva pela orientação, incentivo e exemplo de profissionalismo.

Ao Doutor Elísio Costa pela sua inesgotável paciência, disponibilidade, profissionalismo e capacidade de crítica construtiva e pela sua ajuda imprescindível na análise estatística deste trabalho. O meu muito Obrigado!

Ao Departamento de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela disponibilidade que me proporcionou, sem o qual não teria sido possível desenvolver esta dissertação.

A todos colaboradores e funcionários do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, com quem trabalhei, pelo ambiente descontraído e cientificamente estimulante que me proporcionaram.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e motivação com que sempre me acompanharam.

Ao Fábio pela paciência e encorajamento, durante todo este período, sem os quais não teria sido possível chegar ao fim.

Às minhas amigas de Mestrado, pelos momentos de entusiasmo partilhados.

Resumo

A anemia é uma das complicações mais frequentes nos doentes renais crónicos (DRC) em hemodiálise (HD). Esta anemia associa-se a défice de produção de eritropoietina (EPO) a nível renal, e consequente diminuição da produção de eritrócitos. A utilização da terapêutica com eritropoietina humana recombinante (EPOhr) no início dos anos 90 permitiu uma diminuição importante na prevalência de anemia nos DRC, melhorando a função cardíaca e consequentemente a qualidade de vida destes doentes. No entanto, existe uma grande variabilidade na resposta à terapêutica com EPOhr nestes doentes, em que cerca de 25% necessitam de doses elevadas e 5 - 10% não respondem a esta terapêutica. Os mecanismos subjacentes a esta resistência à terapêutica com EPOhr permanecem ainda por elucidar.

Neste trabalho foram estudadas as alterações associadas, com resistência à terapêutica com EPOhr com particular ênfase na inflamação, no metabolismo de ferro e na sua relação com as proteínas morfogénicas ósseas (BPM-2).

Setenta e dois indivíduos portugueses foram incluídos neste estudo: 48 doentes em HD e 24 controlos saudáveis. Treze dos doentes em HD utilizavam Cateter Venoso Central (CVC) e 35 usavam Fístula Artério-Venosa (FAV) como acesso vascular. A todos foi efectuado o hemograma completo, contagem de reticulócitos, e níveis circulantes de transferrina, ferritina, ferro, saturação da transferrina, receptor solúvel da transferrina (RsTf), Proteína C-Reactiva (PCR), interleucina 6 (IL-6) e BMP-2.

Quando comparados com os controlos, os doentes em HD apresentam diminuição na concentração de hemoglobina (Hb), no hematócrito, na contagem de eritrócitos, e na concentração de hemoglobina globular média (CHGM), como também, uma diminuição na contagem do número de reticulócitos, de linfócitos e de plaquetas e nos níveis séricos de ferro e de transferrina. Também foram encontrados em doentes em HD aumento dos níveis de ferritina, RsTf, PCR, IL-6 e BMP-2.

Doentes em HD usando CVC como acesso vascular apresentam um aumento dos níveis séricos de BMP-2, quando comparados com aqueles que utilizam FAV [55,3 (35,8-85,7) e 43,4 (24,9-55,3 pg / mL)], respectivamente. Foram encontradas nos doentes em HD, correlações negativas entre os níveis de BMP-2 e contagem de eritrócitos ($r = -0,390$, $p = 0,006$) e contagem do número de reticulócitos ($r = -0,305$, $p = 0,033$).

Os nossos resultados mostram que os níveis de BMP-2 estão aumentados nos doentes em HD, particularmente naqueles que utilizam CVC como acesso vascular. Adicionalmente, o aumento da BMP-2 parece interferir com a eritropoiese. Mais estudos serão necessários para esclarecer o papel da BMP-2 nos distúrbios da eritropoiese e BMP-2 como marcador de doença vascular em doentes em HD.

Abstract

Anemia is one of the most common complications in patients with Chronic Kidney Disease (CKD) on hemodialysis (HD). This anemia is associated with insufficient synthesis of erythropoietin (EPO) by the kidneys, causing a decrease in the production of red blood cells. The use of therapy with recombinant human erythropoietin (EPOhr) in the early 90's allowed a significant decrease in the prevalence of anemia in patients with CKD, significantly saving transfusion requirements. This therapy allowed an improvement of cardiac function and improving the quality of life of these patients. However, there is great variability in response to therapy EPOhr. About 25% of patients need high doses and 50-10% does not respond to EPOhr therapy. The mechanisms underlying resistance to EPOhr therapy remain controversial.

In this study, we evaluated associated specific alterations with particular emphasis in inflammation, iron metabolism parameters and their relation to bone morphogenetic proteins (BMP-2), in order to clarify the mechanisms of resistance to therapy EPOhr therapy of CDK patients in HD.

Seventy-three Portuguese individuals were enrolled in this study: 48 HD patients and 25 healthy controls. Fourteen HD patients used central venous catheter (CVC) and 34 arterio-venous fistula (AVF) as vascular access. Complete blood count, reticulocyte count, and circulating levels of transferrin, ferritin, iron, transferrin saturation, soluble transferrin receptor (s-TfR), C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6) and BMP-2, were evaluated for all patients and controls. When compared to healthy controls, HD patients showed significantly lower haemoglobin concentration, haematocrit, red blood cell counts and mean cell haemoglobin concentration; iron and transferrin serum levels, reticulocyte, lymphocytes and platelets counts. Increased mean cell haemoglobin, ferritin, TfR, CRP, IL-6 and BMP-2 were also found in HD patients. HD patients using CVC as vascular access presented an increased BMP-2 serum levels, when compared with those using AVF [55,3 (35,8-85,7) and 43,4 (24,9-55,3 pg/mL), respectively]. In HD patients, negative correlations were found between BMP-2 serum levels, and erythrocyte ($r=-0,390$; $p=0,006$) and reticulocyte counts ($r=-0,305$; $p=0,033$).

Our data show that BMP-2 is increased HD patients, particularly in those using CVC access for HD procedure; moreover, the rise in BMP-2 seems to negatively interfere with erythropoiesis. Further studies are needed to clarify the role of BMP-2 in the erythropoietic disturbances and to study BMP-2 as a marker of vascular disease in

HD patients, as it might provide a potential target to slow-down the accelerated course of HD associated vascular disease.

Lista de Abreviaturas

BMPs	Proteínas Morfogénicas Ósseas
BMP-2	Proteína Morfogénica Óssea 2
CVC	Cateter Venoso Central
CFU-E	Células Progenitoras de Eritróides
CHGM	Concentração da Hemoglobina Globular Média
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DCV	Doença Cardiovascular
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DRC	Doença Renal Crónica
DP	Diálise Peritoneal
DPCA	Diálise Peritoneal Contínua Ambulatória
DPCC	Diálise Peritoneal Cíclica Contínua
DPI	Diálise Peritoneal Intermitente
DMT1	Proteína Transportadora de Metais Bivalentes
ESA	Agentes Estimuladores de Eritropoiese
EPO	Eritropoietina
EPOhr	Eritropoietina Humana recombinante
FPN	Ferroportina
FAV	Fístula ArterioVenosa
Fe (III)	Ião Férrico
Fe (II)	Ião Ferroso
HAMP	Gene do Peptídeo antimicrobiano da Hecpidina (<i>Hepcidin Antimicrobiose Peptide</i>)
HH	Hemacromatose Hereditária
HD	Hemodiálise
HDF	Hemodiafiltração <i>Online</i>
Hb	Hemoglobina
HGM	Hemoglobina Globular Média
HPN	Hecpidina
HTA	Hipertensão Arterial
IRE	Índice de Resistência à Eritropoiétina

IPR	Índice de Produção de Reticulócitos
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IR	Insuficiência Renal
INF- γ	Interferão δ
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
LES	Lúpus Eritematoso Sistémico
NKI-KDOQI	Iniciativa da Fundação Renal para avaliar a Qualidade de Diálise (<i>Kidney Foundation Dialysis Outcomes Quality Initiative</i>)
PCR	Proteína C-Reactiva
PV	Prótese Vascular
RBC	Eritrócitos
RDW	Coefficiente da razão eritrocitária
RPD	Retinopatia Diabética
RsTf	Receptor solúvel da transferrina
Samd 4	Transdutor de Sinal
STAT3	Gene Transdutor de Sinal e activador da Transcrição 3 (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>)
ST	Saturação Total da Transferrina
Tf	Transferrina
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TGF – α	Factor de Crescimento Tumoral α
TGF- β	Factor de Crescimento Transformador β
TNF- α	Factor de Necrose Tumoral α
TR	Transplante Renal
VGM	Volume Globular Médio

Lista de Figuras

Figura 1: Regulação do Metabolismo de ferro por acção da Hepsidina	19
Figura 2: Vias envolvidas na regulação da Hepsidina	21
Figura 3: Níveis plasmáticos de BMP-2 no grupo controlo e no grupo de doentes em HD	32
Figura 4: Correlação entre a contagem de eritrócitos e níveis plasmáticos de BMP-2....	37
Figura 5: Correlação entre a contagem de reticulócitos e os níveis plasmáticos de BMP-2.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estádios da doença renal crónica.....	3
Tabela 2: Parâmetros hematológicos, marcadores do metabolismo de ferro, marcadores inflamatórios e níveis de BMP-2 no grupo controlos e no grupo de doentes em HD....	31
Tabela 3: Parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios no grupo controlo e no grupo de doentes em HD por tipo de acesso vascular.....	33
Tabela 4: Parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios no grupo controlo e no grupo de doentes em HD sensíveis e resistentes à terapêutica com EPOhr.....	35
Tabela 5: Parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios no grupo controlo e no grupo de doentes em HD diabéticos e não diabéticos.....	36

Parte I - Introdução

1. Doença Renal Crónica

1.1 – Introdução

A doença renal crónica (DRC) constitui um problema de Saúde Pública mundial. A sua prevalência e incidência têm aumentado de forma acentuada nos últimos anos. Segundo a Sociedade Portuguesa de Nefrologia, estima-se que em Portugal mais de 800 mil pessoas sofrem de DRC. Todos os anos são registados mais de 2000 novos casos de insuficiência renal crónica (IRC), existindo actualmente 16.000 doentes em diálise, e cerca de 2000 estão em lista de espera para transplante.

A DRC não está dependente da idade nem do sexo, embora a sua incidência seja maior nos adultos e idosos, ou seja, é uma patologia predominantemente geriátrica. A DRC é uma doença crónica, com uma evolução irreversível, acompanhada pela diminuição progressiva do número de nefrónios (unidades funcionais do rim) funcionais, comprometendo a homeostasia do organismo (Ribeiro, 2008). Decorrente da natureza evolutiva da doença, alguns nefrónios, permanecem intactos, enquanto outros são destruídos, ocorrendo assim hipertrofia nefrótica. Este processo adaptativo permite ao rim continuar a responder às necessidades do organismo até uma fase muito avançada de destruição do parênquima renal. Nesse processo o rim deixa de eliminar adequadamente substâncias resultantes do metabolismo e de sintetizar a EPO, apresentando o doente alterações persistentes, tais como azotemia, hipercalémia, acidose metabólica, hipocalémia, hiperfosfotémia, anemia, edemas, náuseas, vómitos, evoluindo para um quadro de síndrome urémico (Rebollo, 2001).

A DRC tem etiologias variáveis, podendo resultar de patologias que afectam directamente os rins, incluindo glomerulopatias, hipertensão arterial (HTA), doença cardiovascular (DCV), uropatia obstrutiva, infecção e nefropatia diabética (ND) sendo esta última uma das principais causas de DRC (Craig, 2005; Draibe, 2001).

Segundo a *National Kidney Foundation Disease Outcomes Quality Initiative* (NKI-KDOQI) a DRC é classificada em 5 estádios que variam de acordo com o grau de lesão renal (Abensur, 2010). Na tabela I está resumida a evolução, classificação e estadiamento da DRC.

Tabela 1: Estádios da doença renal crónica.

Estádios	Descrição	TFG (mL/min /1.73m ²)
1	Ligeira insuficiência renal com filtração normal ou ligeiramente aumentada	> 90
2	Ligeira diminuição da função renal com lesão renal (leve)	60-89
3	Diminuição moderada da função renal	30-59
4	Diminuição grave da função renal	15-29
5	Insuficiência renal com necessidade de terapêutica de substituição	<15

TFG= Taxa de Filtração Glomerular; Tabela Adaptada de Abensur, 2010.

Na fase terminal da DRC os doentes apresentam-se geralmente mais desnutridos, com anemia mais acentuada e com maior prevalência de HTA e de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Draibe, 2001). Estes factores são responsáveis pelo maior número de hospitalizações e por um aumento na mortalidade após início da terapêutica de substituição.

É fundamental considerar sempre que a DRC, uma vez estabelecida, tem evolução progressiva independentemente da etiologia.

1.2 - Terapêutica de Substituição

Nas últimas décadas, assistiu-se a um grande desenvolvimento no tratamento da DRC com inovações progressivas tanto ao nível das técnicas de diálise como ao nível do transplante renal (TR).

Os doentes que perderam a função renal e atingiram a fase terminal da doença têm actualmente várias alternativas terapêuticas disponíveis: tratamento dialítico, com opções de HD, diálise peritoneal (DP), hemodiafiltração *online* (HDF), e o TR.

O tratamento da DRC deve ser conservador (não dialítico) enquanto o doente puder manter os seus hábitos de vida. A eficiência do tratamento conservador envolve o controlo da HTA, restrição proteica da dieta, do potássio, do fósforo e do sódio (Draibe, 2001).

As doenças de base, incluindo a diabetes *mellitus* (DM), a ICC, o lúpus eritematoso sistémico (LES) ou outras, devem ser tratadas e controladas, para prevenir a progressão da DRC. Quando os sintomas da DRC progridem e não se consegue o controlo da doença com tratamento conservador pode optar-se por tratamento dialítico ou TR.

Os tratamentos dialíticos têm como objectivo melhorar a qualidade de vida do doente, a remoção de ureia e creatinina do sangue, manter a concentração adequada dos electrólitos e corrigir a acidose. Apesar de a diálise ser realizada com o objectivo de minorar a insuficiência, não consegue substituir a função hormonal nem a actividade metabólica do rim (Santos, 2003).

Para a realização do tratamento dialítico é necessário criar um acesso vascular que permita a circulação sanguínea entre o doente e o equipamento de diálise. Um adequado acesso vascular permite, não só um melhor resultado terapêutico como aumentar a sobrevida dos doentes (Santos, 2003). Trata-se de um requisito indispensável para a realização do tratamento de substituição, de extrema importância no sucesso da HD e na qualidade de vida do doente em diálise (Santos, 2003).

O primeiro acesso vascular usado foi o *Shunt* arteriovenoso de Scribner-Quintan em 1960, tendo sido considerado um marco muito importante na história da diálise, pois, permitiu, pela primeira, vez efectuar tratamento hemodialítico por períodos longos de tempo (ADRNP, 2006). No entanto, a trombose e a infecção eram complicações comuns, assim como a reduzida durabilidade do efeito obtido.

A criação de um acesso vascular permanente, a evolução das membranas de HD, a utilização do bicarbonato na solução dialisante e dos estimuladores da eritropoiese, assim como, novas técnicas como a hemodiafiltração *online* tornaram a diálise cada vez mais “biocompatível”.

1.2.1 - Hemodiálise

Pode considerar-se que a HD foi iniciada em 1830, quando o físico inglês Thomas Graham verificou que ao separar dois líquidos com substâncias dissolvidas por uma membrana celulósica, existia trocas entre os líquidos. Graham designou esta experiência por "Diálise" e as membranas com estas características "semipermeáveis" (ADRNP, 2006).

A primeira sessão de HD foi realizada em 1924 por George Haas, tendo uma duração de 15 minutos. A técnica foi posteriormente desenvolvida por Kolff e Berg que utilizaram o celofano como membrana de diálise. Foi aplicada a vários doentes crónicos que faleceram devido à não existência de acesso vascular permanente (ADRNP, 2006). Em 1945 é concretizado o primeiro grande êxito num caso de insuficiência renal aguda e em 1960, Belding Scribner juntamente com Dillard e Quintan, criaram um *Shunt* arteriovenoso externo, uma prótese com peças de *teflon*, que permitiu um acesso vascular mais prolongado.

A HD é um procedimento dialítico que tem como objectivo a remoção de solutos urémicos acumulados e o excesso de água. Restabelece o equilíbrio electrolítico e ácido-base do organismo, mediante o uso de uma máquina que substitui o rim. Os processos de difusão, convecção e ultrafiltração ocorrem através de uma membrana semipermeável, removendo as substâncias indesejáveis e fornecendo as substâncias que estão em défice como o cálcio e os bicarbonatos (Ronco, 2001; Mehta, 2001; Petroni, 2002). O fluxo constante do sangue de um lado da membrana e o uso de uma solução dialisante do outro, em contracorrente, permite a remoção dos produtos de degradação de um modo semelhante à da filtração glomerular. O doente insuficiente renal realiza habitualmente três sessões (três a quatro horas cada) por semana.

Para a realização desta terapêutica de substituição é necessário um acesso vascular que permita a circulação sanguínea entre o doente e a máquina de diálise. A FAV que consiste na anastomose de uma veia com uma artéria, é uma das técnicas mais

utilizadas na prática clínica. Foram desenvolvidos outros acessos vasculares, designadamente a prótese vascular e o CVC, mas a FAV continua a ser considerada como o acesso ideal para o doente com DRC em hemodiálise (Allonand, 2002; Pisoni, 2002; Costa, 2008) e a mais frequentemente usada em Portugal.

Apesar da FAV apresentar algumas desvantagens, como o risco de trombose arterial da fístula, de infecção, e de hipertensão venosa, é considerada o acesso vascular de eleição, porque apresenta durabilidade superior, menor número de infecções, de trombozes e de hospitalizações, e está associada a menor mortalidade quando comparada com os outros acessos vasculares alternativos (Schon, 2007).

1.2.2 – Diálise Peritoneal

A DP é um procedimento dialítico que utiliza o peritoneu como membrana semipermeável. O peritoneu é uma membrana muito vascularizada constituída por duas camadas: uma que reveste o interior das paredes da cavidade abdominal e outra que recobre a maior parte dos órgãos abdominais. Entre as duas camadas existe um espaço, denominado de cavidade abdominal. Para se efectuar a DP, deve-se em primeiro lugar, introduzir um cateter no interior da cavidade e através da mesma, vai-se introduzir uma determinada quantidade de solução de diálise que, deve ser deixada no seu interior por um período de tempo variável conforme o caso. Assim, o peritoneu funciona como uma membrana semipermeável permitindo a depuração do sangue. (NKUDIC, 2006). Este tipo de tratamento, deve ser repetido as vezes que forem necessárias, mediante a introdução de uma quantidade maior ou menor de solução de diálise.

A utilização do cateter de Tenckhoff, a introdução da DPCA (diálise peritoneal contínua ambulatoria) em 1978, os avanços na melhoria das soluções de diálise e o aparecimento da DP automática, transformaram a técnica DP numa alternativa válida e eficaz na terapêutica da insuficiência renal (Blagga, 2004).

A DPCA é um procedimento que pode ser realizado no domicílio e consiste na execução de trocas, que o doente pode realizar, de bolsas de diálise. A solução de diálise permanece na cavidade abdominal durante um período de quatro a cinco horas, durante o qual ocorre a osmose e difusão de solutos através da membrana peritoneal. O líquido é depois drenado e substituído por uma solução nova. O número de trocas de bolsa, a concentração de solução de diálise e o volume a infundir varia de caso para caso, de

acordo com a indicação médica (Ribeiro, 2009). É um tipo de auto-diálise e a maioria dos doentes faz quatro trocas diárias consecutivamente.

Para este tipo de diálise é necessário um cateter de silicone flexível com um ou dois “*cuffs*” de *dacron* – cateter de Tenckhoff. O implante do cateter é feito habitualmente por disseção cirúrgica ou por peritoneoscopia. Os “*cuffs*” fixam o cateter e impedem o desenvolvimento de infecções do peritoneu (Costa, 2003). A DPCA é indicada para doentes com ICC, doença cardíaca sistémica, DM, dificuldade de acesso vascular, e idosos com problemas cardiovasculares (Abensur, 2008; Ribeiro, 2009).

A diálise peritoneal cíclica contínua (DPCC) é um tipo de diálise idêntico à DPCA, mas em que o doente não necessita de realizar trocas diurnas de solução de diálise, melhorando assim a sua qualidade de vida. É um método contínuo, com trocas automáticas nocturnas, que consiste na realização de 6 a 8 ciclos de 1h-1h30.

A diálise peritoneal intermitente (DPI) é um tipo de diálise que é realizada nos hospitais com o recurso ao mesmo tipo de máquina de diálise utilizada na DPCC. Para a realização da DPI é necessário um cateter, rígido ou flexível, que deve estar posicionado na área pélvica para acesso à cavidade abdominal. A diálise é realizada em três etapas: infusão, permanência e drenagem da solução dialítica. As trocas são repetidas em períodos fixos de tempo, não devendo ser inferior a 30 minutos. Os tratamentos com DPI são mais demorados do que com DPCC, durando 36-42 horas por semana.

As principais complicações da DP incluem peritonite, infecção do túnel subcutâneo e do orifício de saída. A peritonite é causada por agentes bacterianos ou fúngicos. As principais manifestações são: turvação do líquido peritoneal, dores abdominais, febre, náuseas e vômitos (Abensur, 2008).

A infecção do túnel subcutâneo e do orifício de saída caracteriza-se pela presença de material purulento, calor em redor do orifício de saída do cateter, podendo associar-se com dor abdominal e febre. Como na peritonite, recomenda-se a administração imediata de antibioticoterapia.

Apesar da melhoria a nível dialítico e do cuidado do doente, a taxa de mortalidade anual de doentes renais em tratamento hemodialítico permanece elevada.

1.2.3 – Hemodiafiltração Online

Tem vindo a ser sugerido que as terapias suportadas por fenómenos convectivos representam modalidades promissoras e neste contexto a HDF é apelativa porque combina a ultrafiltração (*clearance* de solutos de maior peso molecular) com a difusão (remoção de solutos de menor peso molecular), ou seja, uma modalidade de diálise mais efectiva que aumenta o espectro de solutos a remover.

Durante a HDF, a utilização de um fluido dialítico ultrapuro e a utilização de fluido de substituição estéril em combinação com o uso de membranas sintéticas de alto fluxo, resulta numa optimização da biocompatibilidade do circuito extracorporeal (APIR, 2010).

Alguns estudos têm sugerido que a HDF se associa a tolerância e eficácia superiores, quando comparada com a HD convencional e de alto fluxo, podendo aumentar a longevidade do doente; a HDF *online* aumenta a estabilidade hemodinâmica intradialítica, o que facilita o tratamento de doentes idosos e de alto risco; a HDF pode melhorar a biocompatibilidade do sistema dialítico, reduzindo a bioactivação e o consequente efeito inflamatório.

Foi também descrito que a HDF *online* reduz os níveis sanguíneos dos produtos de glicosilação avançada que estão implicados nas complicações de longo termo em doentes hemodialisados (APIR, 2010).

1.2.4 – Transplante Renal

Os doentes escolhem este tipo de tratamento por várias razões: evitar a diálise, melhorar o seu bem-estar, e qualidade de vida (Bittencourt, 2004). O TR é um procedimento que envolve o transplante de um rim saudável de um dador vivo ou morto para um receptor com DRC a realizar diálise ou em fase pré-dialítica.

O TR é indicado em todos os doentes com DRC (1-70 anos), sem doenças neoplásicas ou doença cardiovascular sintomática. Para a realização do TR são necessários vários exames: provas de compatibilidade sanguínea e de histocompatibilidade (para evitar reacções que possam produzir perda da função do órgão) cruzada entre possíveis doadores e receptores (Bittencourt, 2004).

O TR é o melhor método de tratamento do doente insuficiente renal terminal, dado que melhora de forma significativa a sua qualidade de vida e em alguns doentes pode mesmo ser *life-saving*.

2 – Doença Renal Crónica associada a Diabetes Mellitus

A DM é uma doença crónica, multissistémica, que afecta um número crescente de indivíduos em todo o mundo. Nos países desenvolvidos a mortalidade do doente diabético com IRC é aproximadamente duas vezes superior à da população em geral.

A DM inclui um grupo de alterações metabólicas que têm em comum a hiperglicemia e que resultam de uma complexa interacção de factores genéticos e ambientais. Estima-se que cerca de 380 milhões de indivíduos desenvolverão DM em 2025, constituindo uma preocupante pandemia mundial (McGill, 2009). Estudos coordenados pelo grupo de Gardete Correia estimam que a prevalência da DM em Portugal é de 11,7 % sendo mais elevada nos homens (14,2%) (Correia, 2009). As complicações associadas a DM podem ser microvasculares (oculares, neuropáticas e nefropáticas) ou macrovasculares (doença coronária, arterial periférica, e cerebrovascular). No que respeita às complicações microvasculares, nomeadamente oculares, a mais comum e específica das microangiopatias crónicas da DM é a Retinopatia Diabética (RPD), sendo a principal causa de cegueira em todo mundo (Osorio, 2006; Waugh, 2007). A DM causa alterações estruturais na morfologia renal, designadamente do glomérulo, caracterizadas pelo espessamento da membrana basal glomerular e do mesângio devido à acumulação de matriz extracelular, e aumento do volume renal (Katz, 2002). As causas da nefropatia diabética (ND) são ainda desconhecidas. No entanto, alguns estudos sugerem que os mecanismos envolvidos incluem a hiperglicemia, a presença de complexos glicosilados na circulação e a activação de mediadores inflamatórios (Craig, 2005). A hiperglicemia é responsável pela hiperfiltração renal que induz o aumento da pressão capilar glomerular. Esta promove a proliferação celular que é regulada pela libertação do *Transforming Growth Factor α* (TGF- α) implicado na hipertrofia, na divisão celular e no processo de fibrose renal, através da estimulação da produção de colagénio e de fibronectina. Os produtos glicosilados resultantes da ligação da glicose a proteínas do rim também contribuem para a lesão renal através da estimulação de factores promotores de fibrose. A glomerulosclerose na diabetes é caracterizada pelo espessamento da membrana basal glomerular, esclerose mesangial difusa e nodular (nódulos de Kimmelstiel-Wilson), arteriolesclerose hialina, microaneurismas e alterações tubulares e intersticiais (Katz, 2002). A gravidade das lesões renais correlaciona-se com a taxa de filtração glomerular,

grau de albuminúria, duração da diabetes, grau de controlo da glicemia e de alguns factores genéticos (Katz, 2002; Caramori, 2002).

A anemia é cada vez mais reconhecida em doentes com IRC associada a DM (Stevens, 2003; Laville, 2004). Aproximadamente 40 % dos doentes diabéticos sofrem de nefropatia (Morrish, 2001; Gross, 2005). A anemia é mais frequente nos doentes diabéticos com nefropatia do que nos não diabéticos com insuficiência renal idêntica causada por outros factores (Thomas, 2005; Ravana, 2007). A redução da função renal correlaciona-se com os níveis de Hb nestes doentes. A diminuição da produção de eritrócitos na ND deve-se essencialmente à baixa concentração de eritropoietina (EPO) sérica resultante da diminuição da sua produção. É concomitante com a alteração inflamatória causada pela DRC que também interfere na absorção intestinal de ferro e na sua mobilização, provocando a anemia na ND (Wang, 2004).

3. Doença renal crónica e suas complicações

Como referido anteriormente, uma das principais complicações associadas à DRC é a anemia. Assim, dado os objectivos desta tese, neste ponto é feito uma revisão das principais causas, assim como dos mecanismos patofisiológicos associados à anemia na DRC.

3.1. Anemia no doente renal crónico

A associação entre a anemia e a DRC é conhecida há mais de 150 anos, sendo responsável por parte da sintomatologia do doente urémico.

A anemia é uma complicação frequente e importante na DRC associando-se a aumento da morbidade e mortalidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, considera-se que há anemia quando a Hb é <13 g/dl em homens e mulheres na pós-menopausa, e <12 g/dl em mulheres na pré-menopausa. Esta condição ocorre em cerca de 90% dos doentes com DRC e com TFG <25-30 ml/min (WHO, 2008).

A anemia é habitualmente hipocrómica e normocítica e resulta da inter-relação de diversos factores, salientando-se: eritropoiese diminuída, hemólise, hemorragia e inflamação (Price, 2010). A eritropoiese inadequada é a causa mais importante da anemia e resulta da redução da síntese de eritropoietina (EPO) pelo parênquima renal. Outros factores também contribuem, principalmente a deficiência absoluta ou funcional de ferro, a diminuição do tempo de vida dos eritrócitos e deficiências nutricionais eritropoiéticas, tais como de vitamina B12 e de folatos (WHO, 2008; Costa, 2008).

3.1.1- Terapêutica com Eritropoietina Humana Recombinante

A EPO é uma citocina essencial na regulação da eritropoiese, produzida no rim (90%) e fígado (10%) em resposta à hipoxia. Esta glicoproteína, que tem um peso molecular de 30-35 kDa e 165 aminoácidos, é muito glicosilada e actua como factor de crescimento nas células progenitoras eritroides (CFU-E) promovendo a sua proliferação e diferenciação, e inibindo a apoptose (Putten, 2008; Costa 2008).

A introdução da terapêutica com EPO humana recombinante (EPOhr) no início dos anos 90 permitiu uma diminuição importante da prevalência de anemia nestes doentes, reduzindo acentuadamente as necessidades transfusionais (Khankin, 2010). Esta terapêutica, permitiu uma melhoria da função cardíaca e conseqüente melhoria da qualidade de vida destes doentes (Khankin, 2010).

3.1.2-Resistência à terapêutica com EPOhr

Na DRC a eritropoiese está diminuída, condicionada por uma resposta medular inadequada devido à baixa secreção de EPO, à diminuição da resposta da medula óssea à EPO, e à diminuição da eritropoiese decorrente da menor disponibilidade em ferro (Li, 2010).

Segundo alguns autores, uma das explicações para esta resposta medular inadequada à terapêutica com EPOhr, resulta da activação de células inflamatórias, com libertação de citocinas inflamatórias (Ex: IL-1 e IL-6), do factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), e do interferão gama (INF- γ) que inibem a proliferação e diferenciação dos precursores eritróides. A NKF-KDOQI recomenda que o valor adequado de Hb em doentes submetidos a tratamento com agentes estimuladores de eritropoiese (ESA) seja de 11-12 g/dl. No entanto, este valor não é alcançado em muitos dos doentes, mesmo com doses elevadas de ESA (Kanbay, 2010).

A baixa capacidade de resposta à EPO é um factor de risco associado com mortalidade. Tanto a incapacidade de se alcançar o valor adequado de Hb, como a administração de doses elevadas de ESA, estão associados com risco aumentado de ICC, enfarte do miocárdio ou acidente vascular cerebral. (Kanbay, 2010).

A NKF-DOQI define “resistência à terapêutica com EPOhr” quando se verifica pelo menos uma das três condições: diminuição significativa nos níveis de Hb com dose

constante de ESA, aumento significativo da dose de ESA necessária para manter o nível de Hb, ou incapacidade para aumentar o nível de Hb para valores > 11 g/dl com dose equivalente de darbopoietina α de 1,5 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{semana}$ (Kanbay, 2010).

O "índice de resistência à eritropoietina" (IRE) é um método alternativo, considerado por alguns autores como o melhor marcador do grau de resistência à ESA. Um valor de IRS > 0,02 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{semana}$ indica resistência à ESA. O tempo do IRE pode ser importante para aferir o grau de resposta a estes agentes (Kanbay, 2010).

3.2- Inflamação

A inflamação é uma resposta a vários estímulos agressivos, como lesão tecidual causada por infecção ou dano físico. É um processo complexo que envolve a participação de varias células e moléculas, e pode ter intensidade e duração diferentes.

A DRC é considerada uma situação inflamatória que induz a libertação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α , a IL-1, a IL-6 e o IFN- γ , que são produzidas por diferentes células, incluindo leucócitos, fibroblastos e células endoteliais. (Kushner, 1999). Estas citocinas, estão associadas a alterações sistémicas induzindo, o aumento de proteínas da fase aguda, como a Proteína C reactiva (PCR) e o fibrinogénio, assim como uma diminuição da albumina e da transferrina (Cooper, 2003; Smrzova, 2005).

As causas para a resposta inflamatória exacerbada em DRC em HD não estão ainda bem esclarecidas. Existem, no entanto, várias fontes possíveis, incluindo contaminação bacteriana do dialisador, incompatibilidade com a membrana do dialisador e infecção do acesso vascular. No entanto, o procedimento de diálise pode ser apenas parcialmente responsável pela resposta inflamatória, porque mesmo doentes com insuficiência renal que ainda não estão em diálise, apresentam aumento de marcadores inflamatórios, que aumentam ainda mais após início do tratamento de HD regular, sugerindo que a doença por si só desencadeia uma resposta inflamatória (Macdougall, 2002; Schindler, 2002; Costa, 2008).

Durante a resposta inflamatória, a mobilização de ferro, dos locais de armazenamento no sistema retículo-endotelial, é inibida, comprometendo a proliferação e diferenciação de células progenitoras eritroides, reduzindo, portanto, a eritropoiese (Macdougall, 2002).

A resistência à EPOhr pode dever-se à activação de linfócitos T e de monócitos, que condicionam a produção aumentada de citocinas pro-inflamatórias. Estas citocinas, por sua vez, podem agir localmente, antagonizando a acção da EPOhr a nível celular, causando resistência à terapêutica com EPOhr.

3.3- Ferro e seu metabolismo

O ferro é um elemento essencial para a homeostasia celular. Nos mamíferos está presente em proteínas de armazenamento de ferro e na Hb e mioglobina e em algumas enzimas. As células do organismo, requerem ferro em diferentes processos metabólicos, nomeadamente o transporte de oxigénio, a síntese de DNA e o transporte de electrões (Li, 2010).

O ferro utilizado pelo organismo provém da dieta. Uma dieta normal contém 13-18 mg de ferro dos quais apenas 1-2 mg são absorvidos por dia no epitélio duodenal (Figueiredo, 2010). A quantidade de ferro absorvida é regulada pelas necessidades do organismo, sendo, no entanto, limitada.

A solicitação da absorção de ferro pelo organismo promove uma maior expressão de proteínas envolvidas neste processo, como a proteína transportadora de metal divalente (DMT-1) e a ferroportina (FPT) (Grotto, 2008). Estas proteínas são responsáveis pelo transporte de ferro, nas células, estando o ferro na forma de Fe (II). A transformação de Fe (III) em Fe (II) é mediada pela redutase citocromo b duodenal ou Dcytb. O Fe (II) liga-se à membrana dos enterócitos e à proteína transportadora do heme 1 (HCP-1) incorporando assim o ferro para o meio intracelular.

O Fe (II) absorvido pode seguir duas vias; é incorporado na ferritina, ou deslocado para a membrana basolateral do enterócito (Grotto, 2008). Aí, o [Fe (II)] é oxidado [Fe (III)], por acção da hefestina, sendo posteriormente captado por uma glicoproteína de 80 kDa, a transferrina (Tf) via receptores da Tf e gene da hemocromatose humana (HFE). A Tf é sintetizada no fígado, retina e cérebro, transportando ferro, até aos locais de síntese de hemoproteínas ou para armazenamento (Grotto, 2008).

A entrada do ferro nas células é iniciada pela sua ligação ao receptor solúvel da transferrina (RsTf), presente na superfície de diferentes tipos de células. O RsTf é um homodímero transmembranar constituído de duas subunidades idênticas ligadas por pontes dissulfureto. Cada subunidade apresenta um domínio C-terminal extracelular, um domínio transmembranar e um pequeno domínio N-terminal citoplasmático. (Grotto 2010).

A ligação entre o RsTf e a Tf é facilitada pelo pH de 7,4 e só depois desta ligação se inicia a captação de ferro pelas células.

No citosol, está presente a proteína da hemacromatose que vai formar um complexo com o RsTf e a Tf. O complexo que se forma vai ser acidificado por bombas de H⁺ (ATP dependentes) que diminuem o pH para 5,5. Esta modificação no pH induz modificações nas moléculas da Tf-Fe (II) e do RsTf permitindo a libertação de ferro para o citoplasma.

Como mencionado anteriormente, a proteína DMT1 é essencial para o fluxo de ferro do endossoma para o citoplasma. Uma vez que o ferro libertado pela Tf está na forma Fe (III) e a DMT1 tem grande afinidade para o Fe (II), o ferro é então reduzido a Fe(II) por uma ferro-reductase STAT3 que é responsável pela redução do ferro libertado pela Tf, que será então transferido para o citosol pela DMT1 (Grotto 2010; Collins, 2008). Assim, o ferro pode ser armazenado, incorporado na ferritina, (células não eritroides) ou ser utilizado na síntese de outras proteínas que contêm ferro, nomeadamente para a síntese de Hb (células eritroides).

3.3.1.- Regulação da absorção do ferro

Os macrófagos, enterócitos e os hepatócitos desempenham um papel crucial na homeostasia de ferro. A absorção de ferro é modulada pelo péptido hepcidina (HPN), que é considerado actualmente, o regulador central da homeostasia do ferro no organismo (Deicher, 2004).

A hepcidina (HPN) é um peptídeo codificado pelo gene “*hepcidin antimicrobial peptide*” (HAMP) (Krause, 2000), é constituída por 25 aminoácidos e é sintetizada principalmente a nível hepático.

O mecanismo de acção da HPN depende da sua interacção com a ferroportina (FPN), uma proteína de membrana, expressa na superfície dos macrófagos, hepatócitos, enterócitos e células placentárias. (De Domenico, 2007). A interacção entre a HPN e a FPN, induz a degradação do endossoma bloqueando o transporte de ferro pela FPN. Quando os níveis de transferrina sérica estão elevados, a síntese de hepcidina é estimulada e desta forma, inibe a absorção intestinal de ferro, a libertação de ferro pelos macrófagos, e o seu transporte através da placenta (Ganz, 2005). Por outro lado, quando os níveis de transferrina sérica estão diminuídos, a produção de HPN é suprimida, aumentando assim a absorção intestinal em ferro, assim como a sua libertação pelos macrófagos. (Nemeth, 2004).

A expressão da HPN é estimulada pela sobrecarga de ferro e inflamação e, em contrapartida, a sua síntese está inibida na deficiência de ferro, na hipóxia, no aumento da eritropoiese, de eritropoietina e na anemia (Fig.1) (Ganz, 2006).

O estímulo da expressão da HPN, em resposta à inflamação e/ou infecção, é em parte mediado pela citocina IL-6, limitando a biodisponibilidade de ferro para as células. (Wrighting, 2006). Na inflamação crónica, esse estímulo é contínuo e resulta em alterações na homeostase do ferro levando à anemia da inflamação (Ganz, 2004).

Um segundo modo de regulação da hepcidina depende interacção do promotor do gene de HPN com a via Smad/ BMP que será explicado no ponto 3.5.

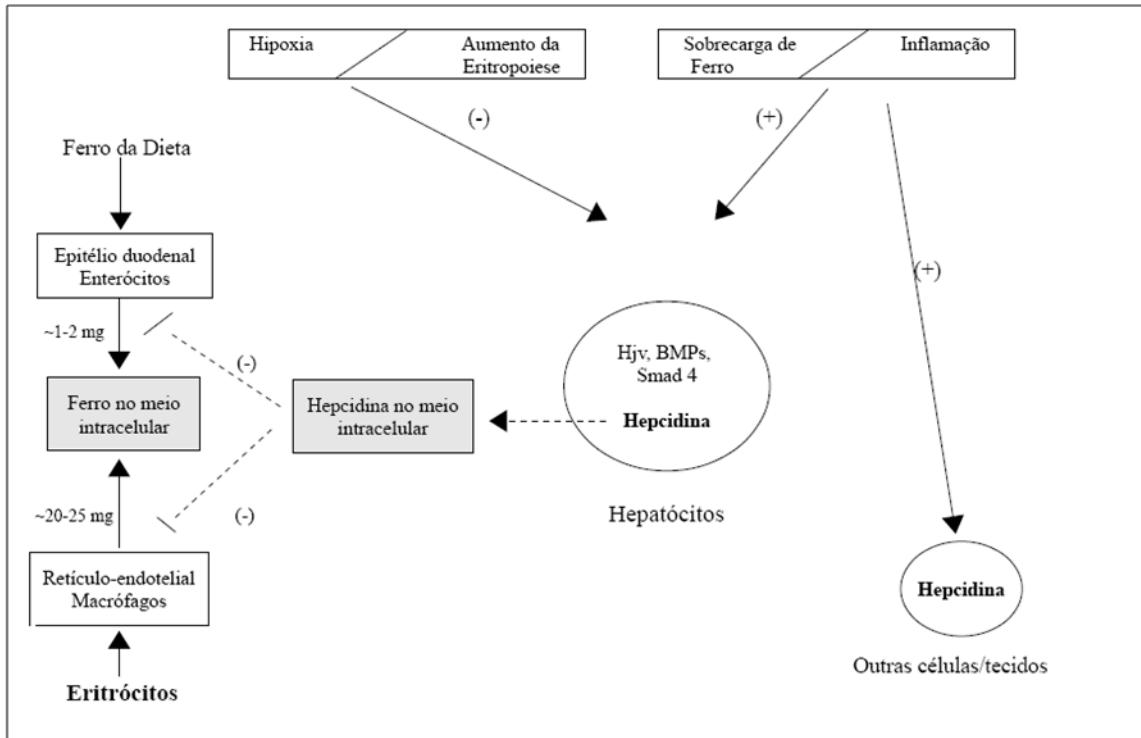


Figura 1: Esquema representativo da regulação pela hepcidina do ferro no organismo. (Adaptado de Collins, 2008)

3.4. Inflamação e Metabolismo de Ferro

A resposta inflamatória interfere na acção da EPO, na absorção intestinal de ferro, e na mobilização de ferro pelo organismo.

Durante o processo inflamatório a HPN aumenta devido a um mecanismo que é independente do metabolismo de ferro e da actividade eritropoiética. A citocina pró-inflamatória IL-6, que como referido anteriormente está aumentada durante os processos inflamatórios, é um activador da HPN (Nemeth, 2004; Wrighting, 2003).

A IL-6 é uma citocina com múltiplas actividades biológicas, constituída por 212 aminoácidos, com um peso molecular de 22.000-30.000 Da, codificada por um gene localizado no cromossoma 7. A IL-6 activa a via STAT3, que interage com o promotor do gene *HAMP*. No entanto, para a activação de STAT3 é necessária a acção de Smad4 para que ocorra a expressão do gene *HAMP*. Estes mecanismos indicam que a HPN pode ser um mediador patológico da anemia das doenças crónicas (Kemman, 2008; Piperno, 2009).

3.5. Proteínas Morfogénicas Ósseas e Metabolismo de Ferro

As BMP's são glicoproteínas de baixo peso molecular pertencentes à família do TGF- β , de estrutura dimérica, com duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfito, podendo ser homodiméricas (duas cadeias idênticas) ou heterodiméricas (duas cadeias diferentes) (Pouliot, 2003).

As BMP's estão envolvidas na morfogénese, desenvolvimento e homeostasia celular (regulação da proliferação, apoptose, e diferenciação) e na remodelação da matriz extracelular (Canalis, 2010). Além de relacionadas com o tecido ósseo, são proteínas morfogénicas multicelulares, com amplo espectro de actividades biológicas em diversos tipos celulares, incluindo monócitos, células epiteliais, células mesenquimatosas e células neuronais (Canalis, 2010). O aumento dos níveis de ferro promove a activação das BMP's, que se vão ligar a receptores específicos na superfície celular, designadamente a hemojuvelina (HJV). Esta ligação causa a fosforilação de receptores R-Smads que dimerizam com a Smad4. O heterodímero formado (R-Smad/Smad 4) desloca-se para o núcleo activando a transcrição do gene *HAMP* (Ganz,

2006). A HJV parece actuar como regulador positivo da expressão de HPN. No entanto, mutações no gene HJV associadas com hemocromatose hereditária têm capacidade de gerar sinais via BMP's que induzem a expressão de HPN. Alguns estudos descrevem que a anulação do sinal BMP/TGFβ no fígado de ratos resulta em níveis baixos de HPN e em sobrecarga de ferro.

Recentemente Dalfino *et al* (Dalfino, 2010) descreveram pela primeira vez um aumento dos níveis séricos de BMP-2 em doentes com DRC, assim como uma correlação entre as concentrações séricas da TFG e BMP-2, sugerindo que o aumento de BMP-2 está directamente associado com lesões renais (Dalfino, 2010).

Estes resultados suportam a hipótese de que a função renal pode influenciar a síntese/ou metabolismo da BMP-2.

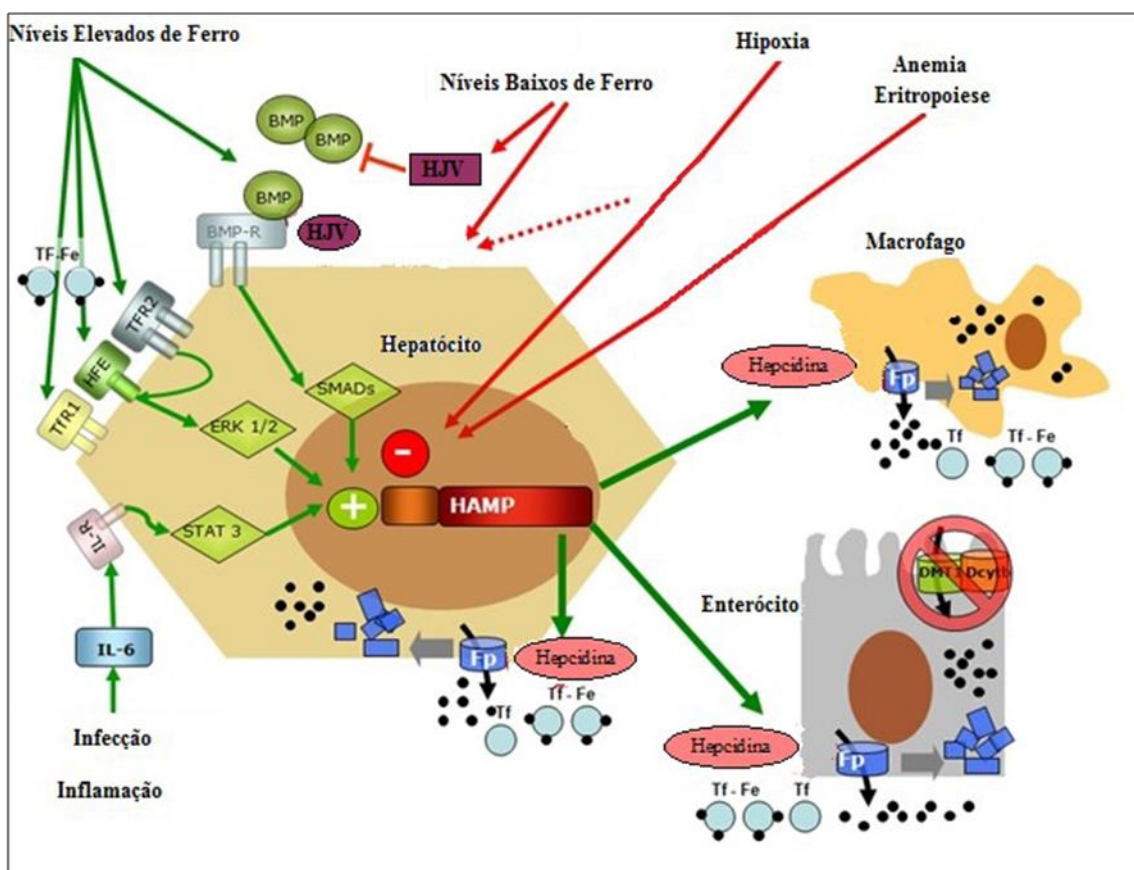


Figura 2: Vias envolvidas na regulação da Hespídina. (Adaptado de Mariani, 2009)

A interleucina (IL-6) estimula a síntese de hepcidina através da activação de STAT; proteínas morfogénicas do osso (BMP's) estimulam a expressão genética da hepcidina através de uma via dependente de hemojuvelina (HJV), receptores de BMP (R-BMP) e activação de SMAD. As vias activas de regulação (actividade eritropoética, regulação do metabolismo de ferro e regulação da inflamação)

controlam em conjunto a produção de hepcidina nos hepatócitos. A transferrina também estimula a expressão genética da hepcidina através de uma via dependente do receptor solúvel de transferrina (R_sTf), proteína HFE e activação de SMAD. A eritropoietina tem um efeito inibidor na expressão de hepcidina através da inibição do receptor da eritropoietina (R-EPO), de STAT e de SMAD.

Parte II – Objectivos

1. Objectivo

Como foi descrito anteriormente, as BMP's parecem ter um papel importante na regulação da expressão do gene da HPN. Esta última tem um papel importante na regulação da absorção e mobilização de ferro no organismo. Uma vez que os doentes sob terapêutica de HD e de EPOhr, apresentam uma deficiência funcional em ferro, que se acentua no caso dos doentes resistentes á terapêutica com EPOhr que apresentam também um processo inflamatório mais acentuado, tornou-se importante avaliar os níveis de BMP-2 em DRC sob terapêutica de HD e de EPOhr, a fim de clarificar o seu papel na IRC, na inflamação e na resistência à terapêutica com EPOhr.

Com esse objectivo, avaliamos diferentes marcadores de insuficiência renal, marcadores inflamatórios, o metabolismo de ferro e níveis plasmáticos de BMP-2

Parte III – Metodologia

1. Material e métodos

1.1. Doentes

Foram incluídos neste trabalho setenta e dois indivíduos, 48 com DRC em hemodiálise [20 homens e 28 mulheres, com idade média (\pm DP) de 64,0 (\pm 15,9 anos)] e 24 indivíduos saudáveis [14 homens e 10 mulheres, com idade média (\pm DP) de 34,5 (\pm 11,6 anos)].

As causas da insuficiência renal no grupo de doentes foram as seguintes: diabetes *mellitus* tipo II (n=16), síndrome nefrótica crónica (n= 7), doença renal hipertensiva (n= 5), doenças renais túbulo intersticiais (n=1), uropatia obstrutiva (n=1), sequelas de tuberculose (n=1), amiloidose (n=1) e causa indeterminada (n=16).

Todos os doentes estavam sob terapêutica hemodialítica três vezes por semana, com duração média de 3-5 horas por sessão. Em média estes doentes estavam em terapêutica hemodialítica há 36 meses. Utilizaram-se dialisadores de alto fluxo de polissulfona classe-FX (Fresenius Medical Care, Ba Homburg Alemanha); 35 dos doentes usavam como acesso vascular FAV e 13 CVC.

Catorze doentes foram classificados como resistentes e 34 como sensíveis à terapêutica com EPOhr. A classificação dos doentes como sensíveis ou resistentes à terapêutica com EPOhr foi efectuada de acordo com as recomendações europeias para boas práticas clínicas, que definem resistência à EPOhr: doentes que para atingir os níveis de Hb entre 11 e 12 g/dl necessitam de doses de EPOhr superiores a 300 UI Kg/semana de epoetina beta ou de 1.5 μ g/Kg/semana de darbopoietina α . A dose média (\pm DP) de EPOhr nos doentes sensíveis à EPOhr foi de 0,33 (\pm 0,36) μ g /kg/semana e nos doentes resistentes foi de 2,07 (\pm 0,39) μ g /Kg/ semana.

Além da terapêutica com EPOhr, todos os doentes estavam sob terapêutica profiláctica com ferro e ácido fólico, de acordo com as recomendações do guia europeu de boas práticas clínicas, para evitar deficiências nutricionais e favorável a acção da de eritropoietina.

Não observámos diferença estatisticamente significativa entre os doentes resistentes e sensíveis à EPOhr quanto à idade, sexo, peso corporal, altura, índice de massa corporal e tempo de diálise; também, não se verificou diferença estatisticamente significativa entre o número de doentes que usavam FAV e CVC como acesso vascular, nem entre os que tinham e os que não tinham diabetes *mellitus* tipo II.

Foram excluídos deste estudo os doentes com cancro, patologias hematológicas, doenças auto-imunes e infecções agudas.

Todos os doentes deram o seu consentimento informado para participar neste estudo.

Voluntários saudáveis (14 homens e 10 mulheres), com valores hematológicos e bioquímicos normais, sem qualquer história de doença renal ou inflamatória, foram utilizados como grupo controlo. Este grupo, foi emparelhado, na medida do possível, por idade e sexo com o grupo de doentes em HD.

1.2. Ensaios

Foram colhidas amostras de sangue (com e sem EDTA) no grupo controlo em jejum e nos doentes imediatamente antes da sessão de HD.

A contagem de eritrócitos, hematócrito, concentração de Hb, índices hematimétricos [volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e RDW] foram efectuadas num contador automático (Sysmex K1000, Sysmex, Hamburgo, Alemanha).

A contagem de reticulócitos foi efectuada ao microscópio em esfregaços de sangue periférico após coloração supravital com azul-de-metileno novo (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA). O índice de produção de reticulócitos (IPR) foi calculado para medir a produção efectiva de eritrócitos, corrigido para o grau de anemia e para a libertação prematura dos reticulócitos pela medula óssea. A concentração sérica de ferro foi determinada por método colorimétrico (ferro, Randox Laboratories, Crumlin, Reino Unido) e a ferritina e a transferrina foram determinadas por imunoturbidimetria (ferritina e transferrina sérica, Randox Laboratories, Crumlin, Reino Unido). A saturação da transferrina (ST) foi calculada pela fórmula: $ST (\%) = 70,9 \times \text{concentração sérica de ferro (em } \mu\text{g/dl)} / \text{concentração de transferrina sérica (mg/dl)}$.

Foram usados imunoensaios para determinar os níveis séricos do receptor solúvel da transferrina (Human sTfR, Quantikine IVD, In Vitro Diagnostic, R & D Systems, Min-Nápolis, Minnesota, EUA). A proteína C-reactiva (PCR) foi determinada por turbidimetria (Tina-quant® C-reactive protein high sensitive assay, Roche Diagnostics, Basel, Suíça) e os níveis séricos de IL-6 foram determinados por ELISA (Human IL-6 High Sensitivity ELISA, eBioscience).

Os níveis de BMP2 foram determinados por ELISA (Quantikine, R&D Systems, Minnesota, EUA).

1.3. Análise Estatística

Os dados foram analisados com recurso ao programa estatístico SPSS, versão 17.0. O teste de Kolmogov-Smirnov foi usado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis. Os resultados obtidos são apresentados como média (\pm DP) quando a variável seguia distribuição normal e como mediana (intervalo interquartil) quando a variável seguia uma distribuição normal. As comparações entre grupos foram efectuadas utilizando o teste *t*-Student quando a variável tinha distribuição normal ou o teste de Mann-Whitney *U* quando a variável não tinha distribuição normal. Os testes de correlação foram efectuados utilizando o teste de Pearson ou de Spearman consoante a variável tinha ou não tinha distribuição normal. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Parte IV – Resultados

Os resultados obtidos foram analisados de duas formas: a) diferenças entre o grupo de controlo e o grupo de doentes em HD; b) diferenças nos diferentes parâmetros, por tipo de acesso vascular, por classificação de resistentes ou sensíveis à terapêutica com EPOhr e por associação ou não com diabetes *mellitus* tipo II.

Na tabela 2 estão representados os resultados obtidos no grupo controlo e no grupo de doentes em HD referentes aos dados hematológicos, ao metabolismo do ferro, aos marcadores inflamatórios e aos níveis plasmáticos de BMP2.

Os doentes em HD apresentam diminuição significativa na concentração de Hb, no hematócrito, na CHGM, e na contagem de eritrócitos e reticulócitos, e um aumento do VGM. Os doentes apresentam ainda diminuição significativa na contagem de linfócitos e de plaquetas; aumento da razão de neutrófilos/linfócitos, dos marcadores inflamatórios (PCR e IL-6), e alterações no metabolismo do ferro (aumento significativo da concentração sérica de ferritina e do RsTf, e diminuição do ferro e de transferrina) quando comparados com o grupo controlo. Os níveis plasmáticos de BMP2 eram significativamente superiores nos doentes em HD (Figura 3).

Tabela 2: Parâmetros hematológicos, marcadores do metabolismo de ferro, marcadores inflamatórios e níveis de BMP-2 no grupo controlos e no grupo de doentes em HD.

	Controlos (n=24)	Doentes em HD (n=48)
Hb(g/dL)	14,94 ± 0,88	11,95 ± 1,79 ^a
Hematócrito (%)	44,32 ± 2,85	37,38 ± 5,35 ^a
RBC (x10 ¹² /L)	4,90 ± 0,46	3,93 ± 0,56 ^a
VGM (fL)	88,25 ± 11,95	95,03 ± 5,86 ^b
HGM (pg)	30,62 ± 1,61	30,39 ± 2,44
CHGM (g/dL)	33,75 ± 0,47	32,05 ± 1,48 ^a
RDW (%)	15,00 (14,80-15,50)	15,91 (13,67-17,90)
Reticulócitos (x10 ⁹ /L)	61,09 ± 32,01	43,40 ± 27,77 ^b
IPR	1,21 ± 0,62	0,92 ± 0,60
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	6,55 ± 1,15	6,46 ± 2,13
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	3,98 (3,16-4,90)	3,81 (2,97-4,91)
Linfócitos (x10 ⁹ /L)	1,96 ± 0,37	1,45 ± 0,65 ^a
Monócitos (x10 ⁹ /L)	0,18 ± 0,13	0,45 ± 0,20
Eosinófilos (x10 ⁹ /L)	0,18 (0,08- 0,22)	0,15 (0,08-0,31)
Basófilos (x10 ⁹ /L)	0,005 (0,003-0,008)	0,025 (0,011-0,040) ^a
Neutrófilos/Linfócitos	1,72 ± 0,11	4,05 ± 0,34 ^a
Plaquetas	242,00 (211,25-283,75)	151,50 (130,75-196,00) ^a
Marcadores do Metabolismo do Ferro		
Ferro (µg/dL)	54,50 (43,25-70,75)	32,00 (26,50-51,00) ^a
Ferritina (ng/mL)	103,06 ± 61,86	415,50 ± 166,00 ^a
Transferrina (mg/dL)	312,17 ± 44,47	172,14 ± 36,74 ^a
Saturação Transferrina	14,23 ± 2,71	13,32 ± 4,75
RsTf (nmol/L)	12,82 (11,06-15,25)	20,97 (15,16-38,27) ^a
Marcadores Inflamatórios e Níveis de BMP2		
PCR (mg/dL)	0,68 (0,42-1,47)	6,14 (2,68-17,23) ^a
IL-6 (pg/mL)	0,42 (0,27-0,59)	3,19 (1,23-4,69) ^a
BMP-2 (pg/mL)	26,49 (18,58-34,26)	46,41 (31,17-62,62) ^a

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão ou como mediana (intervalo interquartil); ^a p < 0,001, vs Controlos; ^b p < 0,05, vs Controlos.

Hb: Hemoglobina; RBC: Red Blood Cells, VGM: Volume Globular Médio, HGM: Hemoglobina Globular Média, CHGM: Concentração da Hemoglobina Globular Média, RDW: *Red blood cells distribution*, IPR: Índice de Produção de Reticulócitos, RsTf= Receptor solúvel da transferrina.

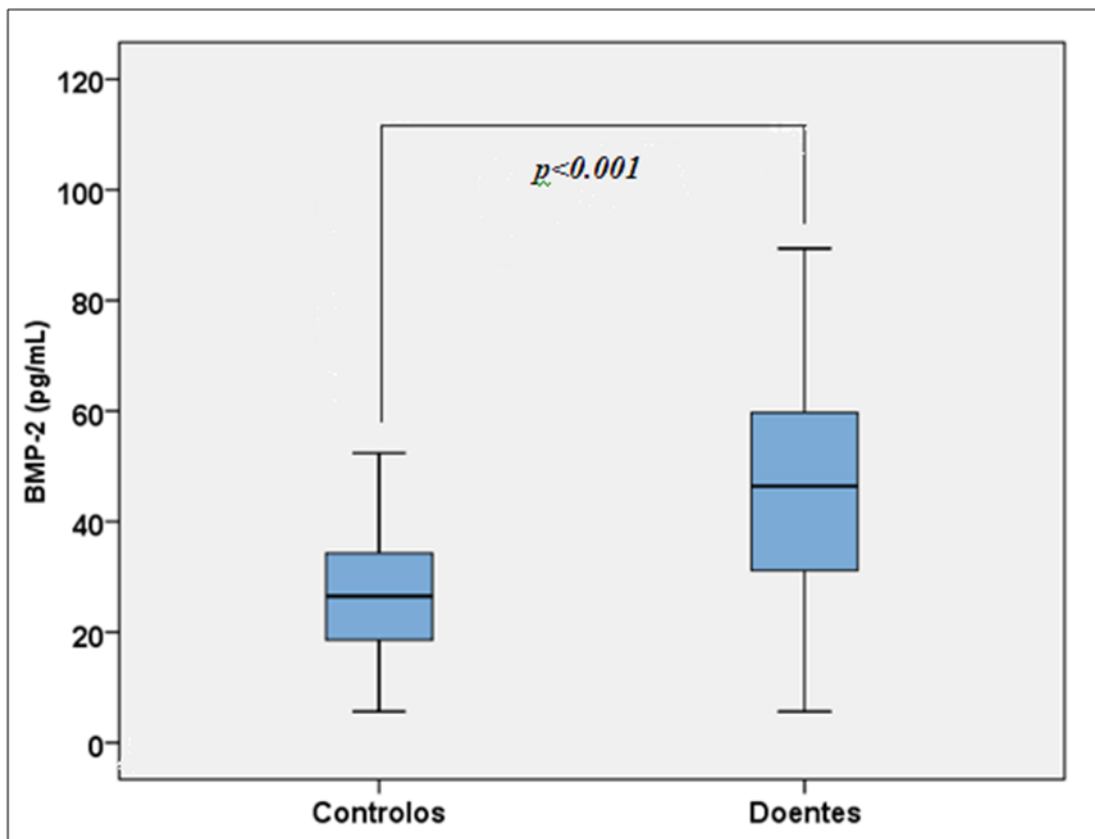


Figura 3: Níveis plasmáticos de BMP-2 no grupo controlo e no grupo de doentes em HD.

Na tabela 3 estão representados os dados hematológicos, marcadores do metabolismo de ferro, marcadores inflamatórios e níveis plasmáticos de BMP-2 nos doentes, de acordo com o tipo de acesso vascular.

Os doentes que usam CVC como acesso vascular apresentam diminuição significativa de HGM e de CHGM e um aumento significativo no RDW quando comparados com doentes que usam FAV. Apresentam também diminuição significativa da concentração de ferritina e aumento significativo do RsTf. Os níveis plasmáticos de BMP2 foram significativamente superiores nos doentes que utilizam CVC como acesso vascular quando comparados com os doentes que usam FAV.

Tabela 3: Parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios no grupo controlo e no grupo de doentes em HD, por tipo de acesso vascular.

	Controlo (n=24)	FAV (n=35)	CVC (n=13)
Dose EPOhr	-	0,75±0,87	1,14±0,90
Hb(g/dL)	14,94 ± 0,88	11,95±1,77 ^a	11,92±1,92 ^a
Hematócrito (%)	44,32 ± 2,85	36,78±5,03 ^a	38,85±6,00 ^a
RBC (x10 ¹² /L)	4,90 ± 0,46	3,86±0,54 ^a	4,14±0,56 ^a
VGM (fL)	88,25 ± 11,95	95,41±5,52 ^a	94,07±6,76
HGM (pg)	30,62 ± 1,61	31,07±2,10	28,62±2,43 ^{a b}
CHGM (g/dL)	33,75 ± 0,47	32,47±1,42 ^a	31,01±1,06 ^{a b}
RDW (%)	15,00 (14,80-15,50)	14,30 (13,60-16,465)	17,90 (14,35-20,25) ^{a b}
Reticulocitos (x10 ⁹ /L)	61,09 ± 32,01	42,20±27,28 ^a	46,38±29,77
IPR	1,21 ± 0,62	0,90±0,60	0,98±0,64
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	6,55 ± 1,15	6,50±2,21	6,34±1,95
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	3,98 (3,16-4,90)	3,82 (3,07-4,93)	3,48 (2,64-4,88)
Linfócitos (x10 ⁹ /L)	1,96 ± 0,37	1,43±0,61 ^a	1,50±0,75 ^a
Monócitos (x10 ⁹ /L)	0,18 ± 0,13	0,47±0,21	0,41±0,20
Eosinófilos (x10 ⁹ /L)	0,18 (0,08- 0,22)	0,16 (0,10-0,30)	0,13 (0,07-0,40)
Basófilos (x10 ⁹ /L)	0,005 (0,003-0,008)	0,021 (0,011-0,038)	0,035 (0,011-0,058)
Neutrófilos/Linfócitos	1,72 ± 0,11	2,75 ± 1,80	2,30 ± 2,27
Plaquetas	242,00 (211,25-283,75)	146,00 (130,50-167,00) ^a	193,00 (153,50-262,00)
Marcadores do Metabolismo do Ferro			
Ferro (µg/dL)	54,50 (43,25-70,75)	37,00 (28,00-54,00)	27,00 (19,50-32,25) ^a
Ferritina (ng/mL)	103,06 ± 61,86	461,27 ± 157,06 ^a	301,00±132,21 ^{a b}
Transferrina (mg/dL)	312,17 ± 44,47	171,65 ± 30,56 ^a	173,35±59,40 ^a
Saturação transferrina	14,23 ± 2,71	13,32 ± 4,75	8,77 ± 1,26
RsTf (nmol/L)	12,82 (11,06-15,25)	20,15 (13,74-27,93) ^a	37,44(22,05-56,78) ^{a b}
Marcadores Inflamatórios e Níveis Plasmáticos de Proteína Morfogenética do Osso			
PCR (mg/dL)	0,68 (0,42-1,47)	4,96 (2,31-16,94) ^a	10,45 (5,28-20,74) ^a
IL-6 (pg/mL)	0,42 (0,27-0,59)	2,20 (1,18-4,44) ^a	2,65 (1,23-5,87) ^a
BMP-2 (pg/mL)	26,49 (18,58-34,26)	43,40 (24,92-55,32)	55,31 (35,78-85,65) ^{a b}

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão ou como mediana (intervalo interquartil); ^a p < 0,05 vs Controlos ; ^b p < 0,05, vs FAV.

Hb: Hemoglobian; RBC: Red Blood Cells; VGM: Volume Globular Médio; HGM: Hemoglobina Globular Média; CHGM: Concentração da Hemoglobina Globular Média; RDW: *Red blood cells distribution*; IPR:Índice de Produção de Reticulócitos; RsTf: Receptor Solúvel da Transferrina.

Na tabela 4 estão representados os dados hematológicos, marcadores do metabolismo de ferro, marcadores inflamatórios e níveis plasmáticos de BMP-2 do grupo de doentes resistentes e sensíveis à terapêutica com EPOhr.

Os doentes resistentes à terapêutica com EPOhr apresentam diminuição significativa na concentração da Hb, da HGM, da CHGM e no número de linfócitos, e aumento significativo no RDW quando comparados com os doentes sensíveis à terapêutica com EPOhr. Relativamente aos parâmetros relacionados com o do metabolismo de ferro verificou-se que os doentes resistentes à EPOhr apresentam diminuição significativa dos níveis de ferro, e aumento significativo do RsTf quando comparados com os doentes sensíveis à terapêutica com EPOhr.

Na tabela 5 estão representados os dados hematológicos, marcadores do metabolismo de ferro, marcadores inflamatórios e níveis plasmáticos de BMP-2, nos grupos de doentes diabéticos e não diabéticos.

O grupo de doentes diabéticos apresenta aumento na contagem de plaquetas quando comparado com o grupo de doentes não diabéticos. Não foram encontradas diferenças significativas nos dados hematológicos, nos marcadores do metabolismo do ferro e inflamatórios, nem nos níveis plasmáticos de BMP-2, entre estes dois grupos.

Foram ainda avaliadas correlações entre as diferentes variáveis em estudo, tendo-se verificado, uma correlação negativa estatisticamente significativa entre os níveis plasmáticos de BMP-2 e a contagem de eritrócitos no grupo de doentes em HD ($r = -0,372$; $p = 0,006$) e no total de indivíduos estudados ($r = 0,572$; $p < 0,001$) (Fig.4). Observou-se também uma correlação negativa estatisticamente significativa entre o número absoluto de reticulócitos e os níveis de BMP-2 no grupo de doentes em HD ($r = -0,305$; $p = 0,033$) e no total de indivíduos estudados ($r = -0,349$; $p < 0,001$) (Fig.5).

Tabela 4: Parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios no grupo controlo e no grupo de doentes em HD , sensíveis e resistentes à terapêutica com EPOhr.

	Controlo (n=24)	Sensíveis (n=34)	Resistentes (n=14)
Dose EPOhr (µg/kg/semana)	-----	0.33±0.36	2.07±0.39
Hb(g/dL)	14.94 ± 0.88	12.42±1.70 ^a	10.86±1.53 ^{a b}
Hematócrito (%)	44.32 ± 2.85	38.22±5.37 ^a	35.46±4.93 ^a
RBC (x10 ¹² /L)	4.90 ± 0.46	4.00±0.54 ^a	3.78±0.58 ^a
VGM (fL)	88.25 ±11.95	95.58.±5.54 ^a	93.76±6.54
HGM (pg)	30.62 ± 1.61	31.00±2.32	29.19±6.54 ^b
CHGM (g/dL)	33.75 ± 0.47	32.54±1.27 ^a	30.95±1.34 ^{a b}
RDW (%)	15.00 (14.80-15.50)	14.00 (13.60-16.38)	17.15 (14.98-18.85) ^{a b}
Reticulócitos (x10 ⁹ /L)	61.09 ± 32.01	43.41±25.78	43.37±32.81
IPR	1.21 ± 0.62	0.92±0.55	0.92±0.71
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	6.55 ± 1.15	6.68±2.32	5.92±1.48
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	3.98 (3.16-4.90)	3.78 (2.93-5.04)	4.09 (2.96-4.53)
Linfócitos (x10 ⁹ /L)	1.96 ± 0.37	1.59±0.64 ^a	1.12 ±0.54 ^{a b}
Monócitos (x10 ⁹ /L)	0.18 ± 0.13	0.48±0.21	0.38±0.18
Eosinófilos (x10 ⁹ /L)	0.18 (0.08- 0.22)	0.15 (0.100-0.322)	0.13 (0.06-0.23)
Basófilos (x10 ⁹ /L)	0.005 (0.003-0.008)	0.023 (0.011-0.040)	0.031 (0.011-0.042)
Neutrófilos/Linfócitos	1.72 ± 0.11	2.17 ± 0.14	4.05 ±0.34
Plaquetas	242.00 (211.25-283.75)	148.50 (128.75-184.75) ^a	171.50 (142.00-228.75) ^a
Marcadores do Metabolismo de Ferro			
Ferro (µg/dL)	54.50 (43.25-70.75)	37.00 (28.75-55.00)	24.00 (15.00-30.00) ^{a b}
Ferritina (ng/mL)	103.06 ± 61.86	434.80±147.66 ^a	371.76±200.31 ^a
Transferrina (mg/dL)	312.17 ± 44.47	174.00±36.86 ^a	167.93±37.40 ^a
Saturação transferrina	14.23 ± 2.71	20.97 ± 13.95	13.97 ± 4.75
RsTf (nmol/L)	12.82 (11.06-15.25)	20.73 (14.16-27.83) ^a	41.26 (17.22-47.87) ^{a b}
Marcadores Inflamatórios e Níveis Plasmáticos de Proteína Morfogénica do Osso			
PCR (mg/dL)	0.68 (0.42-1.47)	5.46 (2.27-17.08) ^a	9.73 (2.97-27.75) ^a
IL-6 (pg/mL)	0.42 (0.27-0.59)	2.15 (1.06-4.60) ^a	3.40 (1.24-4.93) ^a
BMP-2 (pg/mL)	26.49 (18.58-34.26)	43.40 (30.39-53.11) ^a	55.32 (34.25-66.95) ^a

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão ou como mediana (intervalo interquartil); ^a p < 0.05 vs Controlos; ^b p < 0.05, vs Sensíveis

Hb: Hemoglobina; RBC: Red Blood Cells; VGM: Volume Globular Médio; HGM: Hemoglobina Globular Média; CHGM: Concentração da Hemoglobina Globular Média; RDW: *Red blood cells distribution*; IPR: Índice de Produção de Reticulócitos; RsTf: Receptor solúvel da transferrina.

Tabela 5: Parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios no grupo controlo e no grupos de doentes em HD diabéticos e não diabéticos .

	Controlo (n=24)	Doentes HD Não Diabéticos (n=32)	Doentes HD Diabéticos (n=16)
Dose EPOhr($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$)		0.84 \pm 0.86	0.89 \pm 0.95
Hb(g/dL)	14.94 \pm 0.88	12.10 \pm 1.94 ^a	11.65 \pm 1.50 ^a
Hematócrito (%)	44.32 \pm 2.85	37.63 \pm 5.83 ^a	36.90 \pm 4.41 ^a
RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	4.90 \pm 0.46	3.93 \pm 0.60 ^a	3.94 \pm 0.50 ^a
VGM (fL)	88.25 \pm 11.95	95.70 \pm 5.72	93.78 \pm 6.10 ^a
HGM (pg)	30.62 \pm 1.61	30.90 \pm 2.55	29.51 \pm 2.01
CHGM (g/dL)	33.75 \pm 0.47	32.15 \pm 1.50 ^a	31.87 \pm 1.47 ^a
RDW (%)	15.00 (14.80-15.50)	14.85 (13.77-17.20)	15.40 (13.53-19.33)
Reticulócitos ($\times 10^9/\text{L}$)	61.09 \pm 32.01	44.0 \pm 29.01	42.38 \pm 25.90
IPR	1.21 \pm 0.62	0.94 \pm 0.64	0.88 \pm 0.54
Leucócitos($\times 10^9/\text{L}$)	6.55 \pm 1.15	6.28 \pm 1.76	6.83 \pm 2.75
Neutrófilos($\times 10^9/\text{L}$)	3.98 (3.16-4.90)	3.88 (3.15-4.90)	3.37 (2.71-5.40)
Linfócitos($\times 10^9/\text{L}$)	1.96 \pm 0.37	1.34 \pm 0.46 ^a	1.65 \pm 0.88
Monócitos($\times 10^9/\text{L}$)	0.18 \pm 0.13	0.46 \pm 0.19	0.42 \pm 0.22
Eosinófilos($\times 10^9/\text{L}$)	0.18 (0.08- 0.22)	0.18 (0.08-0.33)	0.14 (0.08-0.24)
Basófilos ($\times 10^9/\text{L}$)	0.005 (0.003-0.008)	0.024 (0.011-0.042)	0.02(0.012-0.040)
Neutrófilos/Linfócitos	1.72 \pm 0.11	4.04 \pm 0.34	2.12 \pm 0.08
Plaquetas	242.00 (211.25-283.75)	144.50 (128.50-152.00) ^a	232.50 (174.00-307.75) ^b
Marcadores do metabolismo de Ferro			
Ferro ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	54.50 (43.25-70.75)	33.00 (27.25-50.25) ^a	31.00 (21.50-52.50)
Ferritina (ng/mL)	103.06 \pm 61.86	412.64 \pm 169.73 ^a	420.88 \pm 163.72 ^a
Transferrina (mg/dL)	312.17 \pm 44.47	174.75 \pm 30.11 ^a	167.23 \pm 47.48 ^a
Saturação Transferrina	14.23 \pm 2.71	13.32 \pm 4.75	17.44 \pm 8.95
RsTf (nmol/L)	12.82 (11.06-15.25)	21.00 (16.42-40.18) ^a	17.30 (13.69-37.44) ^a
Marcadores Inflamatórios e Níveis Plasmáticos de Proteína Morfogénica do Osso			
PCR (mg/dL)	0.68 (0.42-1.47)	5.56 (2.68-14.66) ^a	7.00(2.65-29.10) ^a
IL-6 (pg/mL)	0.42 (0.27-0.59)	2.36 (1.15-4.43) ^a	2.65 (1.25-6.08) ^a
BMP-2 (pg/mL)	26.49 (18.58-34.26)	43.40 (25.70-57.52) ^a	49.40 (35.80-69.80) ^a

Os resultados são apresentados como media \pm desvio padrão ou como mediana (intervalo interquartil) ; ^a p < 0.05 vs Controlos ; ^b p < 0.05, vs Diabéticos

Hb: Hemoglobina; RBC: Red Blood Cells; VGM: Volume Globular Médio; HGM: Hemoglobina Globular Média; CHGM: Concentração da Hemoglobina Globular Média; RDW: *Red blood cells distribution*; IPR: Índice de Produção de Reticulócitos; RsTf: Receptor Solúvel da Transferrina.

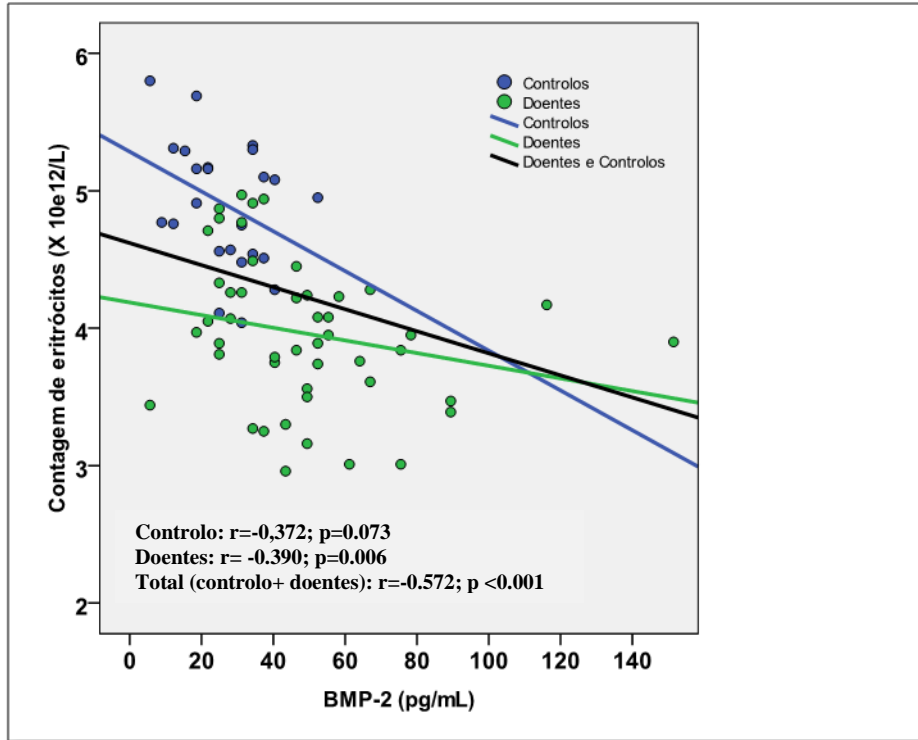


Figura 4: Correlação entre a contagem de eritrócitos e níveis plasmáticos de BMP-2.

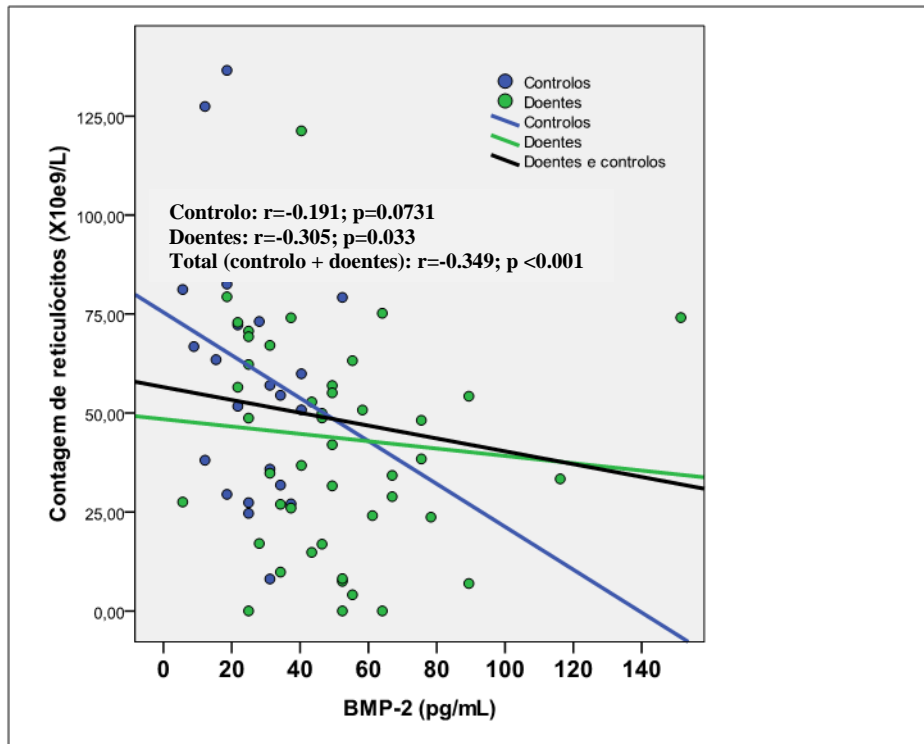


Figura 5: Correlação entre a contagem de reticulócitos e os níveis plasmáticos de BMP-2.

Parte V – Discussão e Conclusões

Neste estudo, foram avaliadas alterações sistémicas associadas com a resistência à terapêutica com EPOhr em doentes com DRC em HD, com particular ênfase na inflamação, no metabolismo de ferro e na sua relação com os níveis plasmáticos de BMP2. Os doentes com DRC em HD foram estratificados de acordo com o tipo de acesso vascular, resistentes e/ou sensíveis à terapêutica com EPOhr, e se eram diabéticos ou não diabéticos. Todos os parâmetros estudados nos DRC foram comparados com um grupo controlo.

DRC em hemodiálise

A anemia é uma complicação comum nos DRC em HD. Para compensar esta anemia, resultante principalmente de uma produção insuficiente de EPO pelo rim, é incluída actualmente a administração de EPOhr nos protocolos terapêuticos destes doentes (Iseki, 2007).

Neste trabalho, verificámos que os doentes com DRC em HD apresentavam uma diminuição da concentração de hemoglobina, do hematócrito, da contagem de eritrócitos, e hipocromia quando comparados com o grupo controlo (Tabela 2).

A hipocromia observada poderá estar relacionada com o processo inflamatório ou com alterações no metabolismo de ferro que estes doentes apresentam. Efectivamente, os nossos doentes em HD apresentaram, diminuição de transferrina, e aumento da PCR e da IL-6, corroborando a presença do processo inflamatório exacerbado nestes doentes.

As causas para esta resposta inflamatória nos doentes em HD não estão bem esclarecidas. Existem no entanto várias explicações possíveis, incluindo entre outras: a contaminação bacteriana do dialisador, a incompatibilidade com a membrana do dialisador e o tipo de acesso vascular.

O processo inflamatório tem também impacto no metabolismo do ferro, alternando a absorção e a mobilização do ferro do sistema reticuloendotelial, de que resulta uma diminuição da disponibilidade de ferro para a eritropoiese, inibindo a proliferação e diferenciação das células eritróides (Deicher, 2004;Mariani, 2009).

Os doentes em HD apresentaram aumento dos níveis séricos de ferritina e de RsTf, e diminuição de ferro e de transferrina. Estes resultados sugerem um défice funcional em ferro, o qual está de acordo com o previamente publicado (Dallalio, 2003; Weinstein, 2002).

Os doentes em HD que usam CVC como acesso vascular apresentam hipocromia e anisocitose (RDW aumentado) mais acentuada quando comparados com doentes em HD que usam FAV como acesso vascular (Tabela 3). Estas alterações poderão estar relacionadas com o aumento do processo inflamatório e/ou com a diminuição da disponibilidade de ferro para a eritropoiese. Efectivamente, os doentes que usam CVC como acesso vascular apresentaram tendência para um aumento da PCR, diminuição da ST e aumento do RsTf quando comparados com os doentes que usam FAV como acesso vascular. No entanto, o uso de CVC não deverá ser o único factor associado ao aumento do processo inflamatório, pois os doentes que utilizam FAV como acesso vascular também apresentam aumento dos marcadores inflamatórios (PCR, IL-6 e razão neutrófilos/linfócitos) quando comparados com o grupo controlo.

Os nossos resultados também evidenciam que os doentes em HD com CVC necessitam de doses maiores de EPOhr para atingir níveis adequados de Hb quando comparados com os doentes que usam FAV, o que sugere que o processo inflamatório mais exacerbado nestes doentes, poderá estar a influenciar negativamente a eritropoiese, implicando assim a necessidade de doses mais elevadas de EPOhr.

Alterações associadas com resistência à terapêutica com EPOhr

Os doentes resistentes à terapêutica com EPOhr apresentam diminuição na concentração de Hb, mesmo após administração de doses mais elevadas de EPOhr (Tabela 4). Esta anemia é hipocrómica (diminuição da HGM e da CHGM) e associa-se a anisocitose mais acentuada. Como todos os doentes estavam sob terapêutica profiláctica com ferro e ácido fólico, e os níveis séricos de ferro e de vitamina B12 estão dentro dos limites de normalidade, estas alterações parecem não estar associadas a deficiência nestes nutrientes eritropoiéticos. De facto, não verificámos diferenças estatisticamente significativas nos marcadores de metabolismo de ferro entre os dois grupos de doentes (sensíveis e resistentes), com excepção do RsTf que era mais elevado nos doentes resistentes à EPOhr (Tabela 4). O estímulo inflamatório exacerbado,

observado nos doentes com DRC resistentes à terapêutica com EPOhr, induz a libertação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, que podem ter efeito de supressão da eritropoiese. Estas citocinas pró-inflamatórias, particularmente a IL-6, estimulam a produção de hepcidina que inibe a absorção intestinal de ferro e a libertação do ferro pelos macrófagos (Dallalio, 2003; Wrighting, 2006).

Accção da BMP-2 na Doença Renal Crónica

O aumento dos níveis plasmáticos de BMP2 e a sua correlação com a função renal foram recentemente descritos em doentes com DRC (estádio II ou superior) (Dalfino, 2010). Na nossa série de doentes, observámos um aumento significativo nos níveis plasmáticos de BMP-2, em particular nos doentes que usam CVC como acesso vascular (Tabela 3).

Neste trabalho descrevemos pela primeira vez uma correlação negativa entre os níveis plasmáticos de BMP-2, e as contagens de eritrócitos e de reticulócitos, sugerindo que um aumento dos níveis de BMP-2 tem um impacto negativo na eritropoiese (Figura 4 e Figura 5) dos DRC.

O aumento dos níveis plasmáticos de BMP-2 poderão associar-se com um aumento da expressão de hepcidina (via não-inflamatória), como foi recentemente descrito em doentes com mieloma múltiplo (Ludwing, 2010). A hepcidina tem um papel importante no metabolismo de ferro pois restringe a absorção de ferro a nível intestinal e a sua libertação pelos macrófagos. A IL-6 é um activador de produção da hepcidina no entanto, a BMP-2 parece ser um activador da síntese da HPN ainda mais importante que a IL-6 nos doentes com mieloma múltiplo (Maes, 2006).

O aumento de BMP2 pode reduzir a produção de hepcidina, mas parece pouco provável que determine uma anulação completa da sua produção uma vez que esta também é estimulada pela via inflamatória. A inibição terapêutica de BMP-2 pode ser contra-indicada devido à sua importância na formação de osteoblastos, cartilagem e osso.

Segundo Ludwig a depleção de hepcidina por anticorpos neutralizantes, em combinação com agentes eritropoiéticos, restaura os níveis normais de Hb em modelos de ratos com anemia de doença crónica (Ludwing, 2010).

Em conclusão, neste trabalho confirmamos que a inflamação e o défice funcional em ferro, estão associados à resistência à terapêutica com EPOhr. Verificamos ainda que os níveis de BMP-2 estão aumentados nos DRC em HD, e que estes níveis poderão estar relacionados com a diminuição de eritropoiese nestes doentes.

Mais estudos serão necessários para que se compreenda a relação entre os níveis de BMP-2 e a eritropoiese, assim como a razão para o seu aumento nos doentes em HD que utilizam CVC como acesso vascular.

Parte VI – Bibliografia

- Abensur H. (2008).** Uso da diálise peritoneal em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva. *Revista Brasileira Hipertensão* 15: 162-165.
- Abensur H.(2010).** Deficiência de ferro na doença renal crónica. *Associação Brasileira de hematologia e hemoterapia* 32 : 84-88.
- ADRNP, Associação de Doentes Renais do Norte de Portugal. (2006).** Pioneiros da Diálise. *Associação dos Doentes Renais do Norte de Portugal*. [Online] Associação dos Doentes Renais do Norte de Portugal, 2006. [Cited: Abril 2, 2011.] <http://www.adrnp-sede.org.pt/pioneiros.html>.
- Allonand M, Robbin M. (2002).** Increasing arteriovenous fistulas in hemodialysis patients: Problems and solutions. *Kidney International* 62: 1109– 1124.
- Antao C, Gallego R, Caldeira J. (2007).** Complicações renais da diabetes mellitus. *Revista Portuguesa Clinica Geral* 23: 577-94.
- APIR, Associação Portuguesa de Insuficientes Renais. (2010).** *Nefrâmea*. [Online] Ano XXIX; nº 152; Setembro/Outubro 2010. [Cited: Abril 2, 2011.] http://www.apir.pt/up/ficheiros-bin2_ficheiro_pt_0309720001290080585-812.pdf.
- Blagga CR, Ingd TS, Berryc D, Kjllstransd CM. (2004) .** The History and Rationale of Daily and Nightly Hemodialysis Hemodialysis. *Contributions to Nephroogy* 145: 1-9.
- Bittencourt Z, Filho G, Mazzali M, Santos N. (2004).** Qualidade de vida em transplantados renais: importância do enxerto funcionante. *Revista Saúde Pública* 38: 732-734.
- Canalis E, Economides A, Gazzo E. (2010).** Bone morphogenetic proteins, their anatognist, and the sheleton. *Endocrine Reviews* 24:218-235.
- Caramori ML, Kim Y, Huang C, Fish AJ, Rich SS, Miller ME, et al. (2002).** Cellular basis of diabetic nephropathy: 1. Study design and renal structural-functional relationships in patients with long-standing type 1 diabetes. *Diabetes* 51: 506-13.
- Collins JF, Resnick MW, Knutson MD. (2008).**Hepcidin Regulation of Iron Transport. *Journal of Nutrition* 11:2284-2288.
- Cooper AC, Mikhail A, Lethbridge MW, Kemeny DM, Macdougall IC. (2003).** Increased expression of erythropoiesis inhibiting cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-10, and IL-13) by T cells in patients exhibiting a poor response to erythropoietin therapy. *J Am Soc Nephrol* 14:1776-84.

- Correia G. (2009).** Resultados do estudo da prevalência da diabetes em Portugal *Anamnesis* 18: 10 – 11, 26.
- Costa E, Lima M, Alves J et al. (2008).** Inflammation, T Cell Phenotype, and Inflammatory Cytokines in Chronic Kidney Disease Patients Under Hemodialysis and its Relationship to Resistance to Recombinant Human Erythropoietin Therapy. *Journal of Clinical Immunology* 28: 268- 275.
- Costa E, Pereira B, Pereira P et al (2008).** Role of Prohepcidin, Inflammatory Markers and Iron Status in Resistance to rhEPO Therapy in Hemodialysis Patients. *American Journal of Nephrology* 28: 677-683.
- Costa E, Rocha S, Pereira P et al (2008).** Cross-talk between inflammation, coagulation /fibrinolysis and vascular access in hemodialysis patients. *The Journal of Vascular Access* 9:00-00.
- Costa J, Neto O, Neto M. (2003).** Insuficiência Renal Crónica. *Medicina Ribeirão Preto* 36: 307-324.
- Craig K, William J, Riley S, Smith H et al. (2005).** Anemia and Diabetes in Absence of Nephropathy. *Diabetes Care* 28:1118-1123.
- Dalfino G, Simone S, Porreca S, Cosola C et al (2010).** Bone morphogenetic proteins-2 may represent the molecular link between oxidative stress and vascular stiffness in chronic disease. *Atherosclerosis* 211: 418-423.
- Dallaglio G, Fleury T, Meanst T. (2003).** Serum hepcidina in clinical specimens. *British Journal of Hematology* 122: 996-1000.
- De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. (2007).** Hepcidin regulation: ironing out the details. *Journal Clinic Investigation* 117:1755-1758.
- Deicher R, Horl W. (2004).** Hepcidin: a molecular link between inflammation and anaemia. *Nephrol Dial Transplant* 19: 521-524.
- Draibe S, Cendroroglo M. (2001).** Tratamento conservador da insuficiência renal crónica. *Revista Diagnóstico & Tratamento* 6: 17-23.
- Figueiredo M. (2010).** Impacto da inflamação na regulação do ferro e deficiência funcional de ferro. *Associação Brasileira de hematologia e hemoterapia* 32: 18-21.
- Ganz T. (2003).** Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anaemia of inflammation. *Blood* 102:783-788.
- Ganz T. (2005).** Hepcidin- a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 18:171-82.

- Ganz T. (2006).** Heparin and Its Role in Regulating Systemic Iron Metabolism. *The American Society of Hematology* 507: 29-35.
- Ganz T, Nemeth E. (2006).** Iron imports. IV. Heparin and regulation of body iron metabolism *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:199 –203
- Grotto H. (2008).** Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia* 30: 390-397.
- Grotto H. (2010).** Fisiologia e metabolismo de ferro. *Associação Brasileira de hematologia e hemoterapia* 32: 8-17.
- Gross JL, Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. (2005).** Diabetic nephropathy diagnosis, prevention and treatment. *Diabetes Care* 28:164-176.
- Iseki K, Kchagura K. (2007).** Anemia as a risk factor for chronic kidney disease. *Kidney International* 107:4-9.
- Junior J. (2007).** A doença renal crônica: Do diagnóstico ao tratamento. *Prática Hospitalar* 52: 183-187.
- Junior J, Canziani M, Barreti P. (1999).** Anemia na insuficiência renal crônica: novas tendências. *Jornal Brasileiro de Nefrologia.* (3): 1-10.
- John A. (2007).** Screening for type 2 diabetes: literature review and economic modeling. *Health Technology Assessment* 11.
- Kanbay M, Perazella M, Kasapogly B, Koroglu M, Lovic A. (2010).** Erythropoiesis stimulatory Agent – Resistant Anemia in Dialysis Patients. Review of causes and Management. *Blood Purification* 29:1-12.
- Katz A, Caramori ML, Sisson-Ross S, Groppoli T, Basgen JM, Mauer M. (2002).** An increase in the cell component of the cortical interstitium antedates interstitial fibrosis in type 1 diabetic patients. *Kidney International* 61: 2058-2066.
- Kemma E, Tjalsma H, Willems H, Swinkels D. (2008).** Heparin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologia* 93: 90-97.
- Khankin E, Mutter W, Tamez H, Yuan H, Karumanchi S, Thadhani R. (2010).** Soluble erythropoietin receptor contributes to erythropoietin resistance in End-Stage renal disease. *Plos One* 5: e9246.
- Laville M. (2004).** Anaemia Correction in Diabetes trial. New strategies in anaemia management. *Acta Diabetol.* 41:18-22.

- Li H, Ginzburg Y. (2010).** Crosstalk between iron metabolism and erythropoiesis. *Advances in Hematology Article ID 605435.*
- Ludwing H. (2010).** BMP-2: A culprit for anemia in myeloma. *Blood* 116: 3383-3384.
- Mariani R, Trombini P, Pozzi M, Piperno A. (2009).** Iron Metabolism in Thalassemia and Sicke Cell Disease. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Disease* 1.
- Maes K, Nemeth E, Roodman, et al. (2010).** In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood* 116:3635-3644.
- Macdougall IC, Cooper AC. (2002).** Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 17 (Suppl 11): 39-43.
- Mehta RL, McDonald B, Cabral FB, Pahl M, Pascual MTA, Farkas A (2001).** A randomized clinical trial of continuous versus intermittent dialysis for acute renal failure. *Kidney international* 60: 1154-1163.
- McGill M, McGuire H. (2009).** The IDF framework for diabetes education – current status and future prospects. *Diabetes Voice* 54: 20-23.
- Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. (2001).** Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 44: 14-21.
- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. (2004).** IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal Clinical Investigation.* 113:1271-1276.
- Nicolas, G, Chauvet C, Viatte L, et al. (2002).** The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *The Journal Clinical Investigation* 110:1037-1044.
- NKUDIC, National Kidney & Urologic Diseases. Information Cleringhouse. (2006).** Treatment Methods for Kidney Failure: Peritoneal Dialysis. [Online] National Institute of diabetes and digestive and Kidnet Diseases. [Cited: Fevereiro2, 2011.] <http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/peritoneal/>.
- Osorio LI, Rizo MPW, Barada DLH. (2006).** Factores de riesgo asociados a la retinopatía diabética en pacientes diabéticos tipo II. *Revista Cubana Medicina General Integral* 22.

- Pak M Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. (2006).** Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. 108: 3730–3735.
- Petroni K, Cohen N (2002).** Continuous Renal Replacement Therapy: Anesthetic Implications *International Anesthesia Research Society* 94:1288– 1297.
- Piperno A, Mariani R, Trombini P, Girelli D. (2009).** Hepcidin modulation in human diseases: From research to clinic *World Journal of Gastroenterology*. 15: 538–551.
- Pisoni R, Young E, Dykstra D, Greenwood R, Hecking E, Gillespie B, Wolfe R, Goodkin D, Held. (2002).** Vascular access use in Europe and the United States: results from the DOPPS. *Kidney International*, 61:305-316.
- Pouliot F, Blais A, Labrie C. (2003).** Overexpression of a Dominant negative type II Bone morphogenetic protein receptor inhibits the growth of human breast cancer cells. *Cancer Research* 63:277-281.
- Putten K, Braan B, Jie K, Gaillard C. (2008).** Mechanisms of Disease: erythropoietis resistance in patients with both heart and kidney failure. *Nature Clinical Practice Nephrology* 4: 47-57.
- Price E, Schrier S. (2010).** Unexplained Aspects of Anemia of Inflammation. *Advances of hematology* vol. 2010:Article ID 508739.
- Ravana R, Spiro JR, Mathieson PW, Smith R. (2007).** Impact of diabetes on haemoglobin levels in renal disease. *Diabetologia* 50:26-31.
- Rebollo P, Ortega F, Baltasar JM, Álvarez F, Navascués A, Álvarez J. (2001).** Is the loss health-related quality of life during renal replacement therapy lower in elderly patients than in younger patients? *Nephrology Dialysis Transplant* 16: 1675-1680.
- Ribeiro R, Oliveira G, Ribeiro D, Bertolin D, Cesarino C, Lima L, Oliveira S. (2008).** Caracterização e etiologia da insuficiência renal crónica em unidade de nefrologia do interior do Estado de São Paulo. *Acta Paulista de enfermagem* 21:207-211.
- Ribeiro D, Marques S, Kusumota L, Ribeiro R. (2009).** Processo de cuidar do idoso em Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua no domicílio. *Acta Paulista de enfermagem* 22: 761-766.
- Ronco C, Bellano R, Zaccaria R. (2001).** Continuous renal replacement therapy in critically ill patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 16:67-72.
- Santos C, Pitta G. (2003).** Fistula Arteriovenosa para hemodiálise. Angiologia e cirurgia vascular. guia ilustrado *UNCISAL/ECMAL & LAVA* 1-10.

- Schindler R, Senf R, Frei U. (2002).** Influencing the inflammatory response of hemodialysis patients by cytokine elimination using large-pore membranes. *Nephrol Dial Transplant* 17: 17-9.
- Schon D, Blume SW, Niebauer K, Hollenbeak CS, Lissovoy G. (2007).** Increasing the Use of Arteriovenous Fistula in Hemodialysis: Economic Benefits and Economic Barriers. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2:268 –276.
- Smrzova J, Balla J, Bárány P. (2005).** Inflammation and resistance to erythropoiesis-stimulating agents- what do we know and what needs to be clarified? *Nephrol Dial Transplant* 20 (Suppl 8): viii2-7.
- Stevens PE, O'Donoghue DJ, Lameire NR.(2003).** Anaemia in patients with diabetes: unrecognized, undetected and untreated? *Curr Med Res Opin* 19:395-401.
- Thomas MC, Cooper MF, Tsalanandris C. (2005).** Anemia with impaired erythropoietin response in diabetes patients. *Archives of Internal Medicine* 165:466-69.
- Wang X, Peesapati SK, Renedo MF, Muktan S. (2004).** Hemoglobin A1c levels in non-diabetic patients with end-stage renal disease (ESRD) receiving hemodialysis. *Journal of Endocrinological Investigation* 27:733-735.
- Waugh N, Scotland G, McNamee P, Gillett M, Brennan A, Goyder E, Williams R, John A.(2007).** Screening for type 2 diabetes: literature review and economic modeling. *Health Technology Assessment* II(17).
- Weinstein D, Roy C, Fleming M et al. (2002).** Inappropriate expression of hepcidina is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 100: 3776-3781.
- 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.
- Wrighting D, Andrews N. (2006).** Interleukin-6 induces hepcidina expression through STAT3. *Blood* 108: 3284- 3289.