

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
MÉDICAS: NEFROLOGIA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E DO ESTRESSE  
OXIDATIVO NOS PACIENTES EM HEMODIÁLISE CRÔNICA.**

**Tese apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências Médicas: Nefrologia.**

**Autor: Dr Marcelo Mazza do Nascimento**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto Manfro**

**Porto Alegre  
2003**

*“A consciência de minha ignorância, ao invés de por um termo às minhas investigações, é antes a própria causa de seu despertar”*

IMMANUEL KANT

*À Shirley e Tiago  
dedico este  
trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Ao amigo, Dr Bengt Lindholm, pela sua amizade, apoio financeiro e emocional, dada a mim e a minha família durante minha estada em Estocolmo, sem a qual meus estudos não poderiam ser realizados, os nossos mais profundos agradecimentos.

Ao Dr Miguel Carlos Riella, pelo seu exemplo de inteligência, liderança, pioneirismo, e estímulo constante á pesquisa, a oportunidade a mim oferecida de poder trabalhar no campo de Nefrologia desde 1994, em seu serviço, a minha gratidão.

Ao Dr Roberto Manfro, caro amigo, que desde de minha admissão no programa de doutorado, procurou de todas as formas me auxiliar na elaboração de nossos artigos e na conclusão de minha tese, os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao caro amigo, Dr Mohamed El Saied Suliman, que fez toda a análise de estresse oxidativo de nosso material levado à Suécia, que na minha iniciação na área de pesquisa, ensinou-me, por meio de sua retidão de caráter e conduta irretocáveis, o valor da pesquisa científica.

As minhas amigas e companheiras de trabalho, Margarete Mara Silva e Maria Aparecida Pachaly, que durante minha ausência do Brasil, ocuparam com brilhantismo as funções por mim anteriormente ocupadas, condição sem a qual nunca poderia ter saído do Brasil, a vocês também dedico esta tese.

Aos amigos, Tony Qrueshi e Elvia Garcia Lopez, pela demonstração de amizade e carinho o que tornou a nossa estada na Suécia, um período inesquecível de nossas vidas.

Ao Dr Peter Stenvinkel, que conheci no ano de 2000, e que nos introduziu na área de pesquisa, em especial na área de inflamação em uremia, pelo seu suporte intelectual e amizade, nossos agradecimentos.

Ao Dr Roberto Pecoits Filho, pelo seu auxílio na elaboração e desenvolvimentos dos artigos e a ajuda oferecida a mim e a minha família, quando da minha chegada à Suécia.

Ao Dr Marcelo Heinig, Luciana Renner, Melissa Nihi e Paulo Fraxino pela ajuda inestimável na coleta dos dados sem os quais este trabalho não seria realizado.

Ao Dr Bjorn Anderstannd pelo seu apoio técnico quando de minha passagem na fase de análise laboratorial de nosso trabalho.

A Dra Annette Brucchfeld, pelas profícuas horas de discussão em torno dos temas de estresse oxidativo e reposição de ferro que contribuíram em demasia para elaboração deste trabalho.

As enfermeiras e auxiliares de enfermagem do Hospital Evangélico de Curitiba Clínica Novo Mundo e Hospital Universitário Cajuru no nome das enfermeiras, Daisy Paschoal, Ana Paula Modesto e as auxiliares, Ceide Salzon e Celoni Zanardini pelo auxílio na coleta do material enviado a Suécia.

Ao laboratório GR no nome de seus proprietários que nos ajudaram com suporte técnico inestimável quando de minha coleta de amostras na fase realizada no Brasil.

As bioquímicas Ann-Christin Bragfors Helin e Monica Eriksson pela ajuda inestimável quando da análise de meu material na Suécia

Aos pacientes renais crônicos, a eles também dedico este estudo.

## SUMÁRIO

|  |             |
|--|-------------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>          | <b>viii</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>               | <b>x</b>    |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>               | <b>xii</b>  |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                   | <b>01</b>   |
| Referências.....                           | 20          |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                    | <b>29</b>   |
| <b>3 PRIMEIRO ARTIGO EM PORTUGUÊS.....</b> | <b>30</b>   |
| Resumo.....                                | 31          |
| Palavras Chave.....                        | 32          |
| Título de Cabeçalho.....                   | 33          |
| Introdução.....                            | 34          |
| Pacientes e Métodos.....                   | 35          |
| Resultados .....                           | 37          |
| Discussão.....                             | 40          |
| Agradecimentos.....                        | 45          |
| Referências.....                           | 46          |
| Tabela 1.....                              | 49          |
| Tabela 2.....                              | 50          |
| Tabela 3.....                              | 51          |
| Tabela 4.....                              | 52          |
| Tabela 5.....                              | 53          |
| Tabela 6.....                              | 54          |
| Legenda das figuras.....                   | 55          |
| Figura 1.....                              | 56          |
| Figura 2.....                              | 57          |
| Figura 3.....                              | 58          |
| <b>4 PRIMEIRO ARTIGO EM INGLÊS.....</b>    | <b>59</b>   |
| Abstract.....                              | 60          |
| Key words.....                             | 61          |
| Running title.....                         | 62          |
| Introduction.....                          | 63          |
| Subject and Methods.....                   | 63          |
| Results.....                               | 66          |
| Discussion.....                            | 68          |

|   |            |
|---|------------|
| Acknowledgements.....                     | 73         |
| References.....                           | 74         |
| Table 1.....                              | 77         |
| Table 2.....                              | 78         |
| Table 3.....                              | 79         |
| Table 4.....                              | 80         |
| Table 5.....                              | 81         |
| Table 6.....                              | 82         |
| Legends to Figures.....                   | 83         |
| Figure 1.....                             | 84         |
| Figure 2.....                             | 85         |
| Figure 3.....                             | 86         |
| <b>5 SEGUNDO ARTIGO EM PORTUGUÊS.....</b> | <b>87</b>  |
| Resumo.....                               | 88         |
| Palavras Chave.....                       | 89         |
| Título de Cabeçalho .....                 | 90         |
| Introdução .....                          | 91         |
| Pacientes e Métodos.....                  | 92         |
| Resultados.....                           | 94         |
| Discussão.....                            | 96         |
| Agradecimentos.....                       | 99         |
| Referências.....                          | 100        |
| Legendas das figuras.....                 | 103        |
| Tabela 1.....                             | 104        |
| Tabela 2.....                             | 105        |
| Tabela 3.....                             | 106        |
| Tabela 4 .....                            | 107        |
| Figura 1 .....                            | 108        |
| Figura 2 .....                            | 109        |
| <b>6 SEGUNDO ARTIGO EM INGLÊS.....</b>    | <b>110</b> |
| Abstract.....                             | 111        |
| Key words.....                            | 112        |
| Running title.....                        | 113        |
| Introduction.....                         | 114        |
| Subject and Methods.....                  | 114        |

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| Results.....                    | 116        |
| Discussion.....                 | 118        |
| Acknowledgements.....           | 121        |
| References.....                 | 122        |
| Legends to Figures.....         | 125        |
| Table 1.....                    | 126        |
| Table 2.....                    | 127        |
| Table 3.....                    | 128        |
| Table 4.....                    | 129        |
| Figure 1.....                   | 130        |
| Figure 2.....                   | 131        |
| <b>7 CONCLUSÕES FINAIS.....</b> | <b>132</b> |
| <b>8 ANEXOS.....</b>            | <b>133</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

Alb-s: albumina sérica

ALT: alanina aminotransferase

Cl Cr: clearance de creatinina

DAC: Doença arterial coronariana

DCV: Doença cárdiovascular

DP: diálise peritoneal

DM: diabetes mellitus

EO: estresse oxidativo

ERO: espécies reativas de oxigênio

FNT  $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

HD: hemodiálise

HDL: lipoproteína de baixa densidade

HCV: hepatite C

PCR: proteína C reativa

PCRs: proteína C reativa de alta sensibilidade

FRR: função renal residual

IRC: insuficiência renal crônica

IL-6: interleucina 6

LDL-ox: lipoproteína de alta densidade oxidada



PFGAs: produtos finais da glicação avançada

RL: radicais livres

ROC: receiver operating characteristics curve

SOD: superóxido dismutase

TIVF: terapêutica intravenosa com ferro

## LISTA DE FIGURAS

|  |            |
|--|------------|
| <b>PRIMEIRO ARTIGO EM PORTUGUÊS 1.....</b>   | <b>30</b>  |
| <b>Figura 1:</b> Curva ROC em relação ao PCR como fator preditor de mortalidade.....   | <b>56</b>  |
| <b>Figura 2:</b> Distribuição dos níveis de PCR em 65 pacientes ocasionalmente inflamados (nível de detecção da PCR foi de 3,2mg/l.....                    | <b>57</b>  |
| <b>Figura 3:</b> Curva de sobrevivência em pacientes sem elevação (Grupo 1), com elevação ocasional (Grupo 2) e persistente elevação (Grupo 3) da PCR..... | <b>58</b>  |
| <b>PRIMEIRO ARTIGO EM INGLÊS 1.....</b>  | <b>59</b>  |
| <b>Figure 1:</b> Receiver operating characteristics (ROC) curve for CRP as a predictor of death.....   | <b>84</b>  |
| <b>Figure 2:</b> Distribution of CRP levels in 65 occasionally inflamed patients (the detection level of CRP was 3.2 mg/l) .....                           | <b>85</b>  |
| <b>Figure 3:</b> Survival of patients with no (Group 1), occasional (Group 2) and persistent (Group 3) elevation of serum CRP.....                         | <b>86</b>  |
| <b>SEGUNDO ARTIGO EM PORTUGUÊS 2.....</b>  | <b>87</b>  |
| <b>Figura 1:</b> Níveis de pentosidina plasmática em 115 pacientes em HD subdivididos em três grupos de acordo com os tercís de ferritina                  | <b>108</b> |
| <b>Figura 2:</b> Conteúdo de pentosidina de acordo com a sorologia de HCV.....   | <b>109</b> |
| <b>SEGUNDO ARTIGO EM INGLÊS 2.....</b>   | <b>110</b> |
| <b>Figure 1:</b> Plasma pentosidine levels in 115 HD patients subdivided in three groups according to tertiles of ferritin.....                            | <b>130</b> |
| <b>Figure 2:</b> The pentosidine content according to HCV serology.....  | <b>131</b> |

## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRO ARTIGO EM PORTUGUÊS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1-</b> Dados clínicos e laboratoriais em 180 pacientes em hemodiálise ao final do período basal.....   | 49 |
| <b>Tabela 2-</b> PCR inicial versus PCR ao final do período basal (6 meses depois)   | 50 |
| <b>Tabela 3-</b> Comparação clínica e laboratorial de acordo com o estado nutricional basal em 159 pacientes. Desnutrição foi definida como SGA classe B ou C..... | 51 |
| <b>Tabela 4-</b> Dados clínicos e laboratoriais nos três grupos subdivididos de acordo com os níveis de PCR.....   | 52 |
| <b>Tabela 5-</b> Análise multivariada proporcional de Cox dos fatores de risco prevendo mortalidade.....   | 53 |
| <b>Tabela 6-</b> Dados Clínicos e laboratoriais basais nos sobreviventes e não sobreviventes.....  | 54 |

### PRIMEIRO ARTIGO EM INGLÊS

|  |    |
|--|----|
| <b>Table 1-</b> Clinical and laboratory data in 180 hemodialysis patients at the end of the baseline period..... | 77 |
| <b>Table 2-</b> Initial CRP versus CRP at the end of the baseline period (6 months later).....                   | 78 |
| <b>Table 3-</b> Clinical and laboratory comparison according to baseline nutritional status in 159 patients..... | 79 |
| <b>Table 4-</b>  | 80 |
| <b>Table 5-</b> Cox proportional hazards multivariate analysis of factors predicting mortality.....              | 81 |
| <b>Table 6-</b> Baseline clinical and laboratory data in survivors and non-survivors                             | 82 |

### SEGUNDO ARTIGO EM PORTUGUÊS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 1-</b> Características clínicas e bioquímicas e níveis de pentosidina plasmática em 115 pacientes em hemodiálise.....                  | 104 |
| <b>Tabela 2-</b> Características clínicas e dialíticas de acordo com a sorologia HCV   | 105 |
| <b>Tabela 3-</b> Características clínicas e dialíticas em 115 pacientes em HD divididos em três grupos de acordo com os tercís de ferritina..... | 106 |
| <b>Tabela 4-</b> Características clínicas e dialíticas de acordo com a dose acumulada de ferro intravenoso.....                                  | 107 |

## SEGUNDO ARTIGO EM INGLÊS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Table 1-</b> Clinical and biochemical characteristics and plasma pentosidine levels in 115 HD patients.....                             | 126 |
| <b>Table 2-</b> Clinical and dialysis characteristics according to HCV serology.....   | 127 |
| <b>Table 3-</b> Clinical and dialysis characteristics in 115 HD patients placed in three groups according to the tertiles of ferritin..... | 128 |
| <b>Table 4-</b> Clinical and dialysis characteristics according to the accumulated dose of intravenous iron.....                           | 129 |

## 1 INTRODUÇÃO

A maior causa de mortalidade em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) é de origem cardiovascular, atingindo um índice anual em torno de aproximadamente 9%, ou seja, 10 a 20 vezes maior se comparada a população geral, mesmo quando o ajuste é feito para outros fatores de risco tais como idade, raça, sexo e presença de diabetes mellitus (DM) [1]. As causas de doença cardiovascular em pacientes com IRC são de origem multifatorial, e embora a presença de conhecidos fatores de risco sejam comumente encontrados, outros fatores ditos não tradicionais, tais como desnutrição, infecção persistente e estresse oxidativo (EO) parecem exercer um papel relevante no desenvolvimento do processo aterosclerótico neste grupo de pacientes [2-4].

A presença de inflamação é um achado consistente em pacientes com IRC e tem sido amplamente reconhecida como um novo fator de risco para doença arterial coronariana (DAC) [5]. Não é incomum em pacientes em fase pré-dialítica se encontrar níveis elevados de proteína C-reativa (PCR), e isto tem sugerido que a função renal residual (FRR) pode ter influência sobre a resposta inflamatória neste grupo de pacientes [5]. Adicionalmente, a presença de níveis plasmáticos elevados de outros marcadores inflamatórios, como interleucina 6 (IL-6) sugere que processos não relacionados só a FRR, como a presença de trombose em enxertos vasculares [6], o processo aterosclerótico *per se* [7], infecções persistentes (*Chlamydia pneumoniae*) [8] e infecções dentais [9], podem contribuir para o aumento do estímulo à resposta inflamatória observada em pacientes com IRC terminal [5].

### **Causas de inflamação na IRC**

#### **Insuficiência renal crônica *per se***

O desenvolvimento da IRC contribui para o aparecimento do quadro inflamatório, sendo que em alguns estudos os níveis séricos de determinados marcadores inflamatórios, tais como: IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ) se mostraram significativamente elevados em pacientes com IRC, não sendo diferentes entre os pacientes que iniciaram diálise ou estavam em fase pré-dialítica [10, 11]. Por outro lado, outros autores descreveram que a resposta inflamatória

estaria exacerbada em pacientes em diálise comparada aos pacientes que ainda não a iniciaram [12-14]. Qual seria então a explicação encontrada para que a deterioração da função renal seja uma causa importante de inflamação nos pacientes com IRC? A medida que ocorre a perda de função renal um aumento dos níveis séricos dos marcadores inflamatórios, em especial as interleucinas, começa a ser verificada nestes pacientes [15]. Nos urêmicos em fase pré-dialítica há uma relação diretamente proporcional entre o aumento dos níveis circulantes de várias citocinas e seus receptores e a queda de função renal [16-18]. Panichi et al [19] mediram os níveis séricos de PCR e IL-6 em 102 pacientes em pré-diálise e observaram que 25% deles apresentavam níveis de PCR acima de 5mg/l. Quando estes mesmos pacientes foram divididos de acordo com a FRR, 56% deles com clearance de creatinina (ClCr) inferior a 20ml/min tiveram níveis de PCR acima de 5mg/l, enquanto que no outro grupo com um ClCr superior a 20 ml/min, somente 10% deles apresentavam PCR acima deste valor.

Outros autores confirmaram o fato da FRR estar diretamente relacionada a um aumento dos níveis de citocinas plasmáticas e de seus receptores. Memoli et al [20] determinaram que a excreção renal de receptores solúveis da IL-6 (sIL-6) esta marcadamente reduzida em pacientes com IRC em fase pré-dialítica. Do mesmo modo, Bolton et al [21] verificaram que o nível sérico de creatinina foi o fator independente mais determinante dos níveis séricos de IL-6 em pacientes com IRC. Confirmando estes achados, Chung et al [22] recentemente demonstraram em pacientes em diálise uma associação significativa entre marcadores inflamatórios e FRR confirmando os achados descritos previamente.

### **Infecções persistentes e inflamação**

A presença de infecções crônicas com o envolvimento de vários microorganismos, em particular, *Chlamydia pneumoniae*, *Cytomegalovirus* e *Helicobacter pylori* parecem estar relacionadas ao desenvolvimento do processo inflamatório e da aterogênese. Estudos epidemiológicos tem evidenciado a presença de *Chlamydia pneumoniae* em placas ateroscleróticas de pacientes com doença arterial coronariana indicando uma associação positiva entre infecção por este microorganismo e aterosclerose [5, 23]. Zoccali et al [24] demonstraram em um

grupo de tabagistas em hemodiálise (HD) que a presença de imunoglobulinas da classe IgG anti-*Chlamydia pneumoniae* foi associada com a presença de placas ateroscleróticas em carótida. Estes mesmos autores [24] estudando 278 pacientes com IRC mostraram que a mortalidade foi quatro vezes maior em pacientes que apresentaram-se soropositivos para a presença de *Chlamydia pneumoniae*. Outro agente infeccioso responsável por infecções crônicas em pacientes urêmicos e não urêmicos é o *Helicobacter pylori*. O *Helicobacter pylori* é um patógeno encontrado em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento, atingindo a prevalência, em algumas partes rurais da África, de até 96% [25]. Tem sido documentada a presença de DNA de *Helicobacter pylori* em placas ateroscleróticas em artérias coronárias dando suporte a idéia que este agente pode influenciar no desenvolvimento da aterosclerose.

Outra situação clínica relacionada à presença de inflamação crônica são as infecções periodontais. A doença periodontal é uma importante fonte de produtos da resposta inflamatória resultante da interação entre o hospedeiro e o patógeno oral, e que pode exercer seus efeitos por um longo período [26]. A recente análise do estudo NHANES III [9] encontrou uma associação significativa entre valores da PCR e a incidência de doença periodontal. Adicionalmente, tem sido relatada a presença de fenômenos tromboembólicos em pacientes com inflamação periodontal provocada pela *Porphyromonas gingivalis* [27]. Um recente estudo canadense [28] avaliou 147 pacientes em diálise e verificou que quase a totalidade destes pacientes apresentava algum sinal de gengivite. Em 1991 na cidade do Rio de Janeiro 1854 indivíduos não urêmicos foram avaliados quanto ao seu estado periodontal sendo que 97,5% destes indivíduos necessitavam de algum tipo de terapia periodontal [29]. Parece razoável se supor que a população de pacientes urêmicos no Brasil não é diferente quanto a presença de um estado dental precário.

### **Diálise e qualidade do dialisado**

A exposição do sangue dos pacientes em HD a membranas menos biocompatíveis causa ativação das células mononucleares e tem sido apontada como um potencial fator associado a inflamação neste grupo de pacientes [30]. Membranas menos biocompatíveis, feitas a base de celulose, ativam células da

linhagem branca, sistema complemento e podem exercer seus efeitos diminuindo a função renal residual. Alguns investigadores tem sugerido que mesmo membranas biocompatíveis podem ativar a resposta inflamatória durante a HD. Honkanen et al [31] observaram similar aumento dos níveis circulantes de IL-1 $\beta$  e outros marcadores inflamatórios de fase aguda durante 240 minutos de diálise utilizando diferentes tipos de membranas, tais como celulose, acetato de celulose e polimetilmetacrilato. Isto leva a crer que, independente do tipo de membrana utilizada, o procedimento dialítico é uma potencial fonte de inflamação nos pacientes urêmicos.

A qualidade da água usada na HD também parece interferir na presença de inflamação nestes pacientes. O uso de soluções não estéreis e a passagem de lipopolissacarídeos bacterianos através da membrana dialítica podem propiciar o desencadeamento do processo inflamatório [32]. Além do mais, tem sido relatada a diminuição da produção de citocinas plasmáticas com o uso de água livre de endotoxinas (ultrapura) obtida por filtração do líquido de diálise [32]. Este fato sugere que a ativação monocitária pode ser desencadeada por endotoxinas, as quais podem diretamente atravessar a membrana de diálise ou estar no lado do dialisado da membrana [33].

A exposição sangüínea a membranas menos biocompatíveis ou a soluções de diálise não estéreis não podem explicar a presença de inflamação em outros grupos de pacientes urêmicos como, por exemplo, os pacientes em diálise peritoneal (DP) [20]. Yeun et al [34] verificaram que pacientes em DP apresentaram-se mais inflamados quando comparados aos pacientes em HD. Na verdade, alguns fatores específicos da DP tais como exposição da membrana peritoneal a substâncias presentes no líquido de diálise não estéril e o próprio acesso transperitoneal para diálise são potenciais fontes de estímulo à inflamação [35]. Independente do tipo de modalidade dialítica, a maioria dos pacientes em diálise apresentam evidências de ativação da resposta inflamatória. Um fato interessante a se notar é que o padrão da resposta inflamatória varia ao longo do tempo. Kaysen et al [36] demonstraram em 37 pacientes em HD que a resposta inflamatória modifica-se ao longo do tempo. Estes autores observaram que a variação nos níveis de PCR foi de 2 ordens de magnitude quando comparados a albumina e transferina séricas. Outro fato significativo verificado foi de que a resposta inflamatória não foi influenciada pelo tipo



de membrana dialítica, sugerindo que outros fatores não relacionados à diálise também estão envolvidos na gênese e perpetuação do processo inflamatório.

### **Prevalência de desnutrição, inflamação e aterosclerose nos pacientes com IRC**

Stenvinkel et al [37] estudaram pacientes suecos em fase pré-dialítica e puderam observar que 44% eram malnutridos, 32% tinham sinais de inflamação, e que em 72% pode-se verificar a presença de placas em carótida. Caravaca et al [38] analisaram 201 pacientes espanhóis em pré-diálise e puderam notar que 36% deles apresentavam sinais de desnutrição. Relatos da América do Norte como o estudo CANUSA [39] descreveram que 51% dos pacientes em diálise apresentavam sinais de desnutrição enquanto que 4% deles eram severamente desnutridos. Parece que já na fase pré dialítica metade destes pacientes já apresentam algum sinal de desnutrição.

Quando se analisa a prevalência destes fatores nos pacientes em diálise a presença da chamada síndrome MIA (má nutrição, inflamação e aterosclerose) é mais evidente. Qureshi et al [40] demonstraram que a prevalência de desnutrição nos pacientes suecos em hemodiálise foi de 65%, e que a evidência de atividade inflamatória esteve presente em quase que 55% dos casos cuja principal causa de mortalidade foi de origem cardiovascular (52%). Mais recentemente o mesmo grupo descreveu [41] que 57% dos pacientes em HD apresentavam níveis elevados de PCR e que a presença de desnutrição foi de 40 e 80 % nos sobreviventes e não sobreviventes, respectivamente. Zimmermann et al [42] em 1999 estudaram 280 pacientes estáveis em HD e verificaram que a PCR estava elevada em 46% desta população na ausência de infecção clínica aparente, e que a mortalidade por doença cardiovascular foi significativamente mais elevada nos pacientes com aumento da PCR. O mesmo grupo recentemente descreveu [43], que ao final de quatro anos de acompanhamento destes pacientes o índice de mortalidade anual foi de 11%, comprovando a observação inicial de que a alta taxa de mortalidade correlaciona-se com elevações séricas da PCR.

Yeun et al [44] também demonstraram uma forte correlação entre a presença de inflamação, avaliada pela medida sérica da PCR, e a mortalidade cardiovascular nos pacientes em HD. Foi constatado neste estudo que pacientes que apresentaram

menor sobrevida foram aqueles cujos níveis de PCR encontravam-se mais elevados. Outro achado destes autores foi que a maior causa de mortalidade neste mesmo grupo (41,5%) foi de origem cardiovascular. Ikizler et al [45] acompanharam a sobrevida de 73 pacientes em HD durante 15 meses, e concluíram que o risco de hospitalização foi maior no grupo de pacientes com PCR elevada. Da mesma forma, Kaysen et al [36] em um estudo longitudinal estabeleceu que os valores da PCR podem variar ao longo do tempo, levando a crer que a resposta inflamatória se dá de forma intermitente e que os níveis de albumina sérica são influenciados diretamente pela presença de inflamação. Finalmente, Bologa et al [46] correlacionaram outros marcadores inflamatórios que não a PCR, como o FNT  $\alpha$  e IL-6 com o grau de hipoalbuminemia e constataram que a IL-6 foi o fator de risco de mortalidade mais significativo. O que parece claro na análise destes diversos estudos é a íntima relação entre a presença de inflamação e doença cardiovascular (DCV).

Ao se analisar a presença da síndrome MIA nos pacientes asiáticos parece que os resultados são um pouco diferentes em relação aos estudos realizados nos EUA e Europa. Apesar da principal causa de mortalidade nestes pacientes também ser de origem cardiovascular, sendo responsável por 43,1% das mortes no Japão [47], a prevalência de desnutrição e inflamação é menor. Outro fato relevante é que a alta prevalência de hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e anormalidades lipídicas, observada em japoneses, exercem um papel relevante na elevada prevalência de eventos cardiovasculares. Quando se analisou a presença da síndrome MIA nesta população específica, Noh et al [48] verificaram em 106 pacientes em diálise peritoneal que somente 12% dos pacientes apresentaram sinais de inflamação, sendo que a prevalência de desnutrição neste estudo foi somente de 30,8%. Ainda assim, apesar da prevalência de pacientes inflamados ser baixa, a PCR mostrou-se um fator independente de mortalidade. Iseki et al [49] em outro estudo asiático analisando 163 pacientes em HD, observaram que a prevalência de inflamação foi de 27% e que 55% dos óbitos foram de origem cardiovascular. Qual a explicação para que pacientes asiáticos apresentem menor prevalência de inflamação embora com a mesma prevalência de doença cardiovascular? Pode-se especular que a presença de influências genéticas,

diferenças dietéticas e sócio-econômicas podem modificar a presença da síndrome MIA nesta população.

### **Desnutrição nos pacientes com IRC**

Outra característica comum nos pacientes portadores de IRC é a presença de desnutrição, que pode variar de acordo com a população estudada, entre 10 a 70% em pacientes em HD e de até 18% a 51% nos pacientes em DP [50]. Além do mais, estes pacientes podem apresentar com 2 tipos de desnutrição [51]. O primeiro tipo (tipo 1) é relacionada a uma baixa ingestão proteico-calórica. Neste contexto, a presença de co-morbidades é incomum e a albumina sérica (Alb-S) pode estar normal ou levemente diminuída. O segundo tipo de desnutrição está associado com a inflamação e aterosclerose e DCV. Obviamente estes dois tipos de desnutrição são freqüentemente combinados na prática clínica. A maioria dos estudos que avaliaram o estado nutricional na população urêmica foi realizada em países industrializados. Estudos europeus que analisaram o estado nutricional de pacientes portadores de IRC, na população sueca [40] e espanhola [38] puderam constatar presença de um estado nutricional não satisfatório em 44 e 36% da população urêmica em fase pré-dialítica.

A avaliação nutricional da população urêmica pode ser realizada por métodos mais simples como, por exemplo, por meio da história e exame físico, método conhecido como o da avaliação subjetiva global (ASG) que é simples, validado e não oneroso de avaliação do estado nutricional [52]. Outros métodos objetivos podem ser empregados como, por exemplo, avaliação de peso, altura e pregas cutâneas. Lowrie et al [53] descreveram que quanto maior a porcentagem do peso atual abaixo do ideal maior é o risco de mortalidade. A taxa do aparecimento do nitrogênio ureico (PNA) é utilizada para estimar a ingesta alimentar protéica de pacientes estáveis e expressa o aparecimento total de nitrogênio em termos de ingesta protéica. Este índice pode ser calculado por meio da medida do nitrogênio urinário. A recomendação protéica recomendada para pacientes em HD atualmente é de no mínimo 1,2g/Kg/dia [50].

O estudo MDRD [54] apresenta evidências suficientes de que a medida que ocorre uma queda no RFG uma piora do estado nutricional é observada. Enquanto é claro existir uma queda da ingestão protéica calórica quando a filtração glomerular atinge 60ml/min, a diminuição é muito pequena até que atinja 30ml/min. Apesar disto, quando se mediu a Alb-S e a transferrina observou-se uma queda muito mais acentuada com o decréscimo da função renal residual. A hipótese mais aceita para explicar este fato é que a presença de inflamação seja responsável pelo declínio dos níveis séricos destas proteínas. Muitos fatores têm sido relacionados com o desenvolvimento de desnutrição nos pacientes em HD incluindo baixa ingestão proteica devido ao quadro de anorexia, presença de náuseas e vômitos causados pela síndrome urêmica, diálise inadequada e doenças crônicas concomitantes como, por exemplo, a presença de insuficiência cardíaca congestiva [55, 56]. Além disto, a acidose metabólica, anormalidades endocrinológicas tais como a resistência insulínica e o hiperparatireoidismo secundário podem aumentar o catabolismo protéico e aumentar o risco do aparecimento de um balanço negativo de nitrogênio [57]. A perda no dialisado de proteínas e aminoácidos nos pacientes em DP também parece contribuir para o aparecimento deste distúrbio [58].

O tipo da membrana dialítica afeta o metabolismo protéico dos pacientes em HD. A interação entre o sangue e membranas regeneradas de celulose, por exemplo, conduz a um maior catabolismo protéico [20]. Além disto, a ativação do sistema complemento pode conduzir a liberação das citocinas pró-inflamatórias (FNT- $\alpha$  e IL-1) causando degradação da musculatura [59]. Finalmente, outro fator adicional a ser considerado é a presença de acidose metabólica. A acidose metabólica aumenta o catabolismo protéico corporal e induz o balanço nitrogenado negativo em pacientes com IRC, estimula a desidrogenase do cetoácido de cadeia ramificada do músculo portanto aumenta a degradação do  $\alpha$ -cetoisocaproato, que é o cetoácido da leucina responsável pela inibição do catabolismo protéico no músculo [60].

### **Inflamação e aterogênese**

Zimmermann et al [42] demonstraram que tanto a PCR quanto a albumina foram fatores independentes de mortalidade em todas as causas de óbito nos pacientes em hemodiálise. Contudo, a PCR contribuiu em maior intensidade quando comparada a albumina sérica. Yeun et al [44] verificaram que os pacientes que

apresentavam níveis de PCR acima de 11,5ug/ml obitaram após 28 meses de observação. Bologna et al [46] relataram 60 % de mortalidade nos pacientes em HD que se encontraram no mais alto tercil do nível da PCR em 26 meses de observação.

A PCR é um membro da família das pentraxinas e é considerada o protótipo das proteínas de fase aguda em seres humanos. A síntese da PCR acontece no fígado [61], apesar de uma produção extra-hepática já ter sido documentada [62, 63]. A interleucina 6 (IL-6) é a principal indutora do gen da PCR, porém a IL-1, os glicocorticóides e os produtos originários da ativação do complemento agem sinergicamente com a IL-6 na geração de PCR [61]. A PCR consiste de 5 cadeias de moléculas arranjadas simetricamente por ligações não covalentes em torno de um núcleo central, sendo que sua função biológica principal é o reconhecimento de patógenos e células danificadas do próprio hospedeiro (incluindo antígenos nucleares, lipoproteínas e células apoptóticas) e a mediação de sua eliminação por meio do recrutamento do sistema de complemento e células fagocíticas [64, 65].

Além do fato de a PCR ser um marcador de inflamação, esta proteína *per se* parece apresentar propriedades pro-inflamatórias por meio da ativação do sistema complemento [66]. A elevação dos níveis de PCR após o infarto agudo do miocárdio e durante a angina instável é um fator prognóstico de sobrevida e confirma que o processo inflamatório pode não ser meramente um epifenômeno, mas sim um fator patogênico relevante na formação da placa aterosclerótica [67]. Em 1985 Vlaicu et al [68] pela primeira vez demonstraram a presença de PCR no interior da camada íntima arterial de aorta aterosclerótica. Em 1998 Torzewski et al [69], investigando lesões ateroscleróticas coronarianas, notaram que a maioria das células espumosas subendoteliais apresentavam a presença de PCR além de frações do complemento, tais como C5b-9.

Muitas proteínas de fase aguda estão diretamente associadas com a doença vascular. Uma delas em especial é o fibrinogênio [70]. Níveis de fibrinogênio aumentados estão diretamente relacionados com a presença de inflamação e desnutrição, e os níveis destas proteínas, tal como a PCR variam ao longo do tempo nos pacientes em HD [71]. Desta forma, episódios agudos de inflamação podem aumentar a concentração deste fator de coagulação no plasma. Outra proteína

sérica que pode encontrar-se aumentada na população urêmica é a lipoproteína a (Lp(a)), que também se correlaciona com a presença de desnutrição e inflamação, sugerindo que a sua regulação pode sofrer influência da resposta inflamatória aguda [72]. A inflamação também altera a expressão de moléculas solúveis de adesão a célula vascular (VCAM-1) e de molécula solúveis de adesão intercelular (ICAM-1) estas moléculas promovem uma maior adesividade do monócito a célula vascular e estão associadas a doença vascular [73, 74] .

A relação entre a variabilidade da resposta inflamatória aguda nos pacientes em HD e a presença de doença vascular permanece obscura. Muitas possibilidades têm sido aventadas, porém até o momento de forma especulativa. Não se sabe, por exemplo, se a inflamação que ocorre por um curto espaço de tempo pode resultar em eventos cardiovasculares. A inflamação claramente altera a composição protéica plasmática e as estruturas protéicas e lipoprotéicas também são afetadas pelo processo inflamatório. O fato é que o tempo entre estas alterações e o desenvolvimento de doença oclusiva aterosclerótica pode não ser imediata, mas ocorrendo o dano vascular este processo pode se auto-alimentar, ou seja, as células monocitárias envolvidas no dano à parede do vaso contribuem para o aumento crônico dos níveis das proteínas de fase aguda e a partir daí estabelecendo-se um ciclo vicioso [75].

### **Inflamação e doença cardiovascular**

A doença vascular aterosclerótica é uma complicação freqüente nos pacientes portadores de IRC. A DCV é a maior causa de mortalidade sendo responsável por quase metade dos óbitos nestes pacientes [42]. Utilizando critérios clínicos de diagnóstico a DAC e a insuficiência cardíaca congestiva estão presentes em cerca de 40 % dos pacientes incidentes em HD [40, 76]. Embora a presença de DAC pareça alta pode existir uma subestimação de sua verdadeira prevalência, o que já foi verificado em estudos angiográficos em pacientes diabéticos assintomáticos [77]. Levin et al [78] demonstraram que a prevalência de hipertrofia ventricular esquerda é inversamente relacionada ao grau de função renal residual.

As causas da DCV em pacientes com IRC são múltiplas e incluem os chamados fatores de risco tradicionais e não tradicionais [2]. Os chamados riscos tradicionais (idade, história familiar, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade e sedentarismo) estão presentes nos pacientes com IRC, porém o ambiente urêmico parece predispor que fatores não tradicionais (sobrecarga de volume, anemia, anormalidades do metabolismo do cálcio e fósforo e estresse oxidativo) agravem e acentuem o desenvolvimento de DCV neste grupo de pacientes [79,80].

As hipóteses mais atuais enfatizam o papel da disfunção endotelial como primeira etapa da formação da placa do ateroma sendo que cada lesão aterosclerótica característica representa um diferente estágio do processo inflamatório crônico na parede arterial [81]. Na última década muito se tem estudado o papel da inflamação na gênese do processo aterosclerótico. As evidências levantadas apontam que a inflamação na parede da artéria representa o início e a perpetuação do processo aterosclerótico que inclui desde a erosão, fissura e ruptura da placa aterosclerótica, passando a se definir o processo aterosclerótico não somente como uma entidade puramente de origem metabólica (dislipidemia), mas sim se acentuando seu componente inflamatório [82].

É importante ressaltar que o processo inflamatório tem efeitos significativos na oxidação das lipoproteínas [30]. Durante este processo ocorre um aumento na expressão das moléculas de adesão endotelial que promovem a adesão e ativação de células mononucleares e de neutrófilos à superfície endotelial [30]. Proteínas de fase aguda produzidas pelo fígado como amiloide sérico A (SAA) deslocam a Apo A-I (que é uma proteína de fase aguda) da molécula de lipoproteínas de alta densidade (HDL), tornando esta molécula aderente a vasculatura endotelial [82].

Concomitantemente, há um aumento do conteúdo de triglicerídeos do HDL e este HDL modificado não é mais capaz de reduzir as lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDL-ox) que são fundamentais na aterogênese [83, 84]. Outra alteração significativa ocasionada pela presença de inflamação é que a mieloperoxidase, uma potente enzima leucocitária, pode causar a oxidação LDL. O resultado final deste processo é que macrófagos endoteliais fagocitam este LDL oxidado tornando-se macrófagos carregados de lipídeos, que iniciam e propagam o

processo aterosclerótico [30, 82]. Independente da causa inicial que desencadeia o processo de disfunção endotelial, após o dano ao endotélio ter acontecido, inicia-se a adesividade leucocitária e plaquetária e uma atividade pró-coagulante é estabelecida, com conseqüente síntese de citocinas, fatores de crescimento e moléculas vasoativas pelo endotélio lesado [85].

A partir desta etapa com a aceleração do processo inflamatório, ocorre uma proliferação de células musculares lisas, aumento da espessura da parede arterial, acúmulo de macrófagos e linfócitos nesta parede com ativação das células musculares lisas levando à liberação de enzimas hidrolíticas, citocinas com conseqüente necrose focal [86]. Uma capa fibrosa é organizada sobre o núcleo de gordura e área de necrose dando início a um ciclo vicioso de infiltração mononuclear, migração e proliferação de células musculares lisas, alterações fibróticas e espessamento e reestruturação da parede arterial levando a uma redução da luz do vaso afetado [85, 87].

A lesão arterial altera o fluxo sanguíneo e dependendo do grau de estenose pode produzir lesão isquêmica do órgão afetado [85]. O processo de erosão e ruptura da capa fibrosa freqüentemente acontece nos locais mais frágeis desta capa, e dão entrada a macrófagos que se acumulam e são ativados, liberando metaloproteinases (colagenases e elastases) que geram instabilidade da placa aterosclerótica, fatores tissulares pró-coagulantes e outros fatores hemostáticos que ativam o processo de trombose arterial [85, 88].

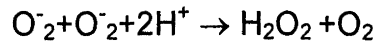
### **Inflamação e estresse oxidativo**

Termos como radicais livres (RL), EO e antioxidantes têm sido amplamente utilizado nas discussões de mecanismos de várias doenças. A introdução destes termos iniciou-se a partir de 1969 por Joe M. McCord trabalhando em colaboração com Irwin Fridowich na Duke University. Estes dois autores descobriram uma enzima conhecida chamada superóxido dismutase (SOD) que catalisa a conversão das chamadas espécies reativas de oxigênio  $O_2^-$  (ERO) a peróxido de hidrogênio, conforme a seguinte reação química [89, 90]:



SOD

↓



Da reação química acima pode-se observar que as ERO podem ser convertidas a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pela enzima SOD, este por sua vez é convertido em  $\text{H}_2\text{O}$  tanto pela enzima conhecida como catalase ou glutathione peroxidase [90]. Em termos práticos, as espécies reativas de oxigênio incluem dois compostos, o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e o radical hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ), ambos caracterizados por apresentarem um único elétron não pareado. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  não é um radical livre, mas que na ausência da catalase ou na presença de um potencial doador de elétrons ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ) é convertido a hidroxil-radical, que é o mais potente e citotóxico das ERO [91].

Hoje parece ser claro que o EO, particularmente quando radicais livres são formados a partir de leucócitos e de reações inflamatórias, é originado pela formação de ERO, que podem causar danos ao DNA celular, à respiração celular mitocondrial e dano direto ao parênquima de órgãos [91]. Em condições normais as ERO são contidas por um elaborado sistema antioxidante constituído de numerosas enzimas de origem endógena, bem como por compostos oriundos da dieta que formam um sistema protetor contra a toxicidade mediada pelas ERO [89, 90, 92].

O EO que decorre quando há produção excessiva de radicais livres de oxigênio ou níveis baixos de anti-oxidantes tem sido considerado um importante fator de desenvolvimento da disfunção endotelial e aterogênese [93]. Radicais livres estão envolvidos no desenvolvimento de aterosclerose por gerar LDL-ox que através de vários mecanismos danificam a parede vascular e causam lesões ateroscleróticas. EO elevado é comum em todas as fases da IRC e em diálise a perda de antioxidantes durante o tratamento dialítico, como as vitaminas C e E, pode agravar o processo [94]. Dando suporte a esta hipótese, um estudo do uso de capilares recobertos com vitamina E, com um seguimento de 3 meses, mostra não só um aumento nos níveis plasmáticos de vitamina E mas também elevação no HDL e redução na oxidação de LDL, apontando para benefícios do tratamento anti-oxidante nesta população [95].

Em pacientes portadores de IRC e diabetes mellitus produtos do metabolismo avançado da glicólise (PAGs) tem sido relatados como agentes etiológicos importantes no desenvolvimento de DCV [96]. Os PAGs são formados por glicólise não enzimática ou glicoxidação de proteínas, e se acumulam no plasma lentamente durante o processo natural de envelhecimento; este processo se intensifica marcadamente em pacientes diabéticos e com IRC [97]. Os PAGs mais claramente identificados são a pentosidina e a N $\epsilon$ -carboximetil lisina (CML). Estas substâncias reagem diretamente com receptores específicos que induzem a síntese intracelular de radicais livres e citocinas pró-inflamatórias que por sua vez aceleram a inflamação crônica [97, 98].

O interesse no papel patogênico da elevada concentração de pentosidina na IRC deve-se ao fato de que estes pacientes a elevação dos níveis de pentosidina é totalmente independente da elevação dos níveis de glicose [99, 100]. Tem sido verificado que os rins exercem um papel fundamental na remoção destes PAGs, e que o acúmulo de pentosidina acontece nestes pacientes em virtude da perda de função renal. Especula-se que não somente a perda de função renal seria a única causa do acúmulo destas substâncias como também elas seriam geradas na presença de EO [101].

Embora estudos em pacientes com DM indiquem que o acúmulo de PAGs está fortemente associado com as complicações diabéticas, não há evidências sólidas sobre os efeitos destas substâncias nas complicações crônicas verificadas na insuficiência renal terminal [99]. Contudo, os PAGs tem sido implicados na patogênese da amiloidose relacionada à diálise de forma que o sistema cardiovascular poderia também representar um potencial alvo para o acúmulo dos PAGs [102]. Miyata et al [103] recentemente demonstraram que a pentosidina, bem como os PAGs estão presentes na neointima de artérias carótidas ateroscleróticas. Por outro lado, outros autores [4] não encontraram nenhuma relação entre pentosidina e espessamento da íntima arterial em lesões ateroscleróticas de pacientes em HD. Confirmando estes achados, Schwedler et al [104] recentemente reportaram que altos níveis de CML não foram associados a uma piora da sobrevida nos pacientes em HD.

## Estresse oxidativo e ferro parenteral

Evidências recentes sugerem que as preparações utilizando ferro parenteral são altamente pró-oxidantes *in vitro*. Nos poucos estudos que têm investigado os efeitos da sobrecarga de ferro em modelos animais, tem sido verificado aumento da peroxidação lipídica tanto no plasma como também nas paredes vasculares [105]. Em estudos clínicos, resultados conflitantes têm sido verificados, demonstrando que a ferritina sérica está diretamente relacionada à oxidação do LDL ou pode torná-lo mais susceptível à oxidação [106]. Esta discrepância pode ser resultado da ferritina sérica não ser somente um fator que reflete os estoques de ferro, como também ser um marcador inflamatório [107].

Na ausência de reposição de ferro os pacientes com IRC em uso de eritropoietina recombinante humana (EPO) desenvolvem um quadro de anemia. Ao mesmo tempo, grandes quantidades de ferro podem exceder a capacidade de ligação da transferrina, ocasionando a presença de ferro livre na circulação [108]. Além do mais, a administração de ferro quando realizada durante a diálise, ocasionaria um incremento do EO já provocado pela diálise *per se* [91, 96]. Diferentes marcadores do EO tem sido associados ao uso de ferro parenteral. Drueke et al [105] recentemente demonstraram uma estreita correlação entre ferritina sérica, produtos avançados de oxidação de proteínas (PAOP) e dose anual de ferro. Adicionalmente, o aumento dos estoques de ferro corporal está relacionado a um aumento da deficiência de licopeno, que é um antioxidante [108].

Todas as preparações de ferro hoje disponíveis no mercado causam peroxidação lipídica. O parâmetro utilizado como marcador desta reação foi o malonaldeído (MDA), que se mostra elevado após exposição das células às várias formulações de ferro por um tempo de 60 minutos [109]. Zager et al [109] descreveram que ratos submetidos a injeções intravenosas de dextran, apresentaram um aumento em torno de 40 vezes das concentrações plasmáticas de MDA após 2 horas da injeção do ferro intravenoso.

O mecanismo pelo qual o ferro livre (Figura 1) causa EO baseia-se na hipótese da produção do ânion superóxido, gerado pela forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase (NADPH) existente nos monócitos e polimorfonucleares e resultante do processo inflamatório crônico da diálise e da

uremia [90]. O ânion superóxido pode ser convertido pela SOD a peróxido de hidrogênio, o qual pode ser convertido pela enzima mieloperoxidase no potente oxidante hipoclorito. O ferro livre liberado das preparações de reposição, diretamente ou após sua conversão na forma  $\text{Fe}^{3+}$  pelo ânion superóxido, pode converter o peróxido de hidrogênio em outro potente oxidante que é o radical hidroxil [109]. (Vide Figura 1)

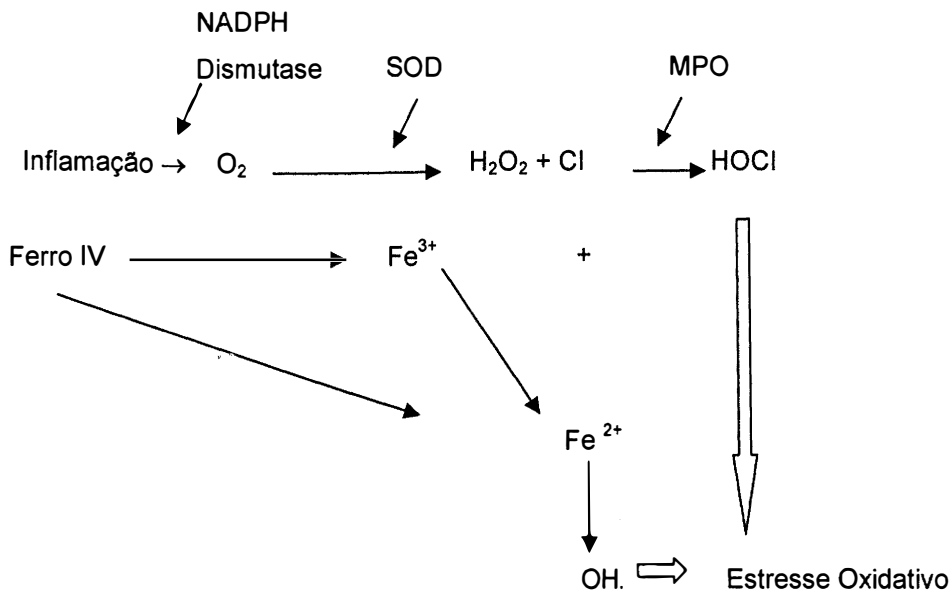


Figura 1: Mecanismo de formação de radicais livres e de estresse oxidativo pelo uso de ferro intravenoso

### Estresse oxidativo e hepatite C

As infecções virais podem causar EO [110]. O processo se inicia com a ligação do vírus a receptores de membrana da célula invadida, seguido pela entrada de material genético viral (DNA ou RNA) no interior da célula [111]. Os vírus se utilizam do sistema protéico sintético da célula do hospedeiro para replicar suas próprias proteínas. Algumas vezes a célula do hospedeiro sobrevive em um estado de infecção crônica, liberando outros vírus periodicamente e em outras vezes ocorre a morte celular liberando partículas virais as quais vão infectar novas células [110].

Atualmente estuda-se a possibilidade de que o vírus da deficiência humana (HIV 1 ou 2) possa causar EO, porém, qualquer infecção viral, bacteriana ou fúngica sabidamente pode causar EO [110]. A resposta fagocitária do hospedeiro,

incrementada pela produção de citocinas como o FNT- $\alpha$ , pode gerar grandes quantidades de ERO, na tentativa de eliminar o agente invasor. A mobilização das defesas do hospedeiro envolve a ativação do sistema NF- $\kappa$ B em linfócitos e em outras células, porém o vírus pode utilizar esta resposta para o seu próprio benefício, devido ao fato de que grande parte dos genes promotores virais freqüentemente contém seqüências semelhantes de NF- $\kappa$ B que promovem a sua transcrição [110].

Infecções virais crônicas como a causada pelo vírus da hepatite (HCV) podem levar ao câncer hepático [111]. A hepatite crônica é associada com a presença de células inflamatórias que presumivelmente geram ERO, sendo que elevados níveis de 8-hidroxidioxanosina (8-OhdG), que é um marcador de dano ao DNA, têm sido detectados no fígado de pacientes com hepatite crônica e em tecidos hepáticos de pacientes com presença de neoplasia [92]. O dano tecidual provocado pelo HCV no fígado é caracterizado por um aumento da formação de radicais livres (RL) manifestada principalmente pelo aumento na produção de marcadores da peroxidação lipídica, oxidação proteica e perturbação na produção de glutathione [112]. Os pacientes com infecção pelo HCV algumas vezes apresentam aumentos leves a moderados na concentração hepática de ferro e ocasionalmente podem apresentar uma sobrecarga de ferro importante. Este aumento ocorre em decorrência da liberação de ferro dos hepatócitos lesionados, pelo próprio vírus ou por fatores genéticos. Independente da situação responsável pela sobrecarga de ferro, o efeito por si só pode influenciar a progressão da hepatite C [112]. Em modelos animais de hemocromatose genética, a sobrecarga de ferro é responsável por dano hepático tecidual por meio da geração de ERO, levando à peroxidação lipídica e alteração das membranas celulares [113]. Em condições de doença crônica hepática o ferro tem sido descrito como um mitógeno importante [114]. Tem sido relatado o efeito microestimulatório do ferro em fígados normais e em fígados cuja mitose foi inibida com 2-acetilaminofluorene e a sua presença em nódulos regenerativos tem sido postulada como um fator de risco importante para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, provavelmente pelo efeito pré-mutagênico decorrente das alterações provocadas no DNA celular [112, 115].

As infecções virais detectadas no endotélio vascular também podem contribuir para o início do processo aterosclerótico. Ishizaka et al [116] investigaram a relação entre a positividade para HCV e o espessamento arterial da íntima de carótidas de 104 pacientes portadores de HCV. Estes autores verificaram que a presença de HCV foi relacionada a um aumento da prevalência de placa aterosclerótica e espessamento da íntima arterial, sendo que este risco foi independente de qualquer outro relacionado ao desenvolvimento da aterosclerose. Por outro lado, Kiechel et al [117] não confirmaram estes achados, não encontrando associação significativa entre hepatite crônica ativa e o desenvolvimento de novas placas ateroscleróticas.

A relação entre hepatite C, EO e sobrecarga de ferro nos pacientes em HD tem sido muito pouco estudada. A maioria dos estudos que avaliaram o EO e sua correlação com ferro não envolveu pacientes portadores de HCV. No Brasil a prevalência de pacientes em HD com evidência sorológica de HCV situa-se em torno de 30 a 65% conforme a região do país [118], sendo que esta prevalência pode estar subestimada devido ao fato que a maioria dos estudos baseia-se em diagnóstico sorológico e não na identificação de partículas virais. Apesar disto, recentemente foi confirmado que em pacientes portadores de HCV em HD evidencia-se a presença de EO, verificado pela elevação de marcadores de peroxidação lipídica, quando comparados a pacientes HCV negativos [119]

## **Conclusão**

A maior causa de morte nos pacientes em diálise em todo o mundo é de origem cardiovascular. A presença de inflamação é um importante fator prognóstico, sendo que sua prevalência pode variar em diferentes regiões do mundo. Em nosso meio, especialmente nos países em desenvolvimento há uma falta de dados epidemiológicos que estabeleça de maneira fidedigna o quão afetados são os pacientes portadores de IRC quanto a presença de inflamação e desnutrição. É evidente que o nosso conhecimento dos fatores de risco tradicionais e não tradicionais na população urêmica é originado de países industrializados, e a aplicabilidade dos resultados em nosso país deve ser verificada pela realização de estudos regionais que focalizem a síndrome MIA em nosso meio.

Muito pouco se tem estudado sobre a presença de EO e outros fatores de risco não tradicionais para o desenvolvimento de DCV na população urêmica de nosso país. Além disto, a íntima relação entre EO hepatite C e sobrecarga de ferro parece apresentar amparo recente nos diversos trabalhos relatados nesta introdução. Entretanto, o estudo desta tríade em pacientes renais crônicos em HD, e suas influências sobre o EO é um tema ainda muito pouco avaliado não só no Brasil mas também em outros países, sendo então a nossa meta nos dois artigos que se seguem estudar parâmetros cada vez mais importantes relacionados a mortalidade de pacientes renais crônicos tais como a inflamação e o EO.

## Referências Bibliográficas

1. Foley, R.N., P.S. Parfrey, and M.J. Sarnak, *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease*. Am J Kidney Dis, 1998. **32**(5 Suppl 3): p. S112-9.
2. Cheung, A.K., et al., *Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients*. Kidney Int, 2000. **58**(1): p. 353-62.
3. Stenvinkel, P., et al., *Does persistent infection with chlamydia pneumoniae increase the risk of atherosclerosis in chronic renal failure?* Kidney Int, 1999. **55**: p. 2531-2532.
4. Zoccali, C., et al., *Pentosidine, carotid atherosclerosis and alterations in left ventricular geometry in hemodialysis patients*. J Nephrol, 2001. **14**(4): p. 293-8.
5. Stenvinkel, P., *Inflammatory and atherosclerotic interactions in the depleted uremic patient*. Blood Purif, 2001. **19**: p. 53-61.
6. Ayus, J.C. and D. Sheikh-Hamad, *Silent infection in clotted hemodialysis access grafts*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**: p. 1314-1321.
7. Heinrich, J., et al., *Association of variables of coagulation, fibrinolysis and acute-phase with atherosclerosis in coronary and peripheral arteries and those arteries supplying the brain*. Thromb Haemost, 1995. **73**: p. 374-378.
8. Zoccali, C., et al., *Inflammation is associated with carotid atherosclerosis in dialysis patients*. J Hypertens, 2000. **18**: p. 1207-1213.
9. Spittle, M., et al., *Relationship between antibodies to periodontal pathogens and c-reactive protein (CRP) levels in hemodialysis patients*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**: p. 299A.
10. Herbelin, A., et al., *Elevated circulating levels of interleukin-6 in patients with chronic renal failure*. Kidney Int, 1991. **39**: p. 954-960.
11. Pereira, B.J.G., et al., *Plasma levels of IL-1b, TNF-a and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients*. Kidney Int, 1994. **45**: p. 890-896.
12. Cavaillon, J.M., et al., *Serum interleukin-6 in long-term hemodialysed patients*. Nephron, 1992. **60**: p. 307-313.
13. Libetta, C., et al., *Inflammatory effects of peritoneal dialysis: evidence of systemic monocyte activation*. Kidney Int, 1996. **49**: p. 506-511.



14. Pereira, B.J.G., et al., *In vitro production of interleukin-1 receptor antagonist in chronic renal failure, CAPD and HD*. *Kidney Int*, 1992. **42**: p. 1419-1424.
15. Nakanishi, I., et al., *Interleukin-8 in chronic renal failure and dialysis patients*. *Nephrol Dial Transpl*, 1994. **9**: p. 1435-1442.
16. Brockhaus, M., et al., *Plasma tumour necrosis factor soluble receptors in chronic renal failure*. *Kidney Int*, 1992. **42**: p. 663-667.
17. Descamps-Latscha, B., et al., *Balance between IL-1b, TNF-a, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis*. *J Immunol*, 1995. **154**: p. 882-892.
18. Van Riemsdijk-van Overbeeke, I.C., et al., *TNF-a:mRNA, plasma protein levels and soluble receptors in patients with chronic hemodialysis, on CAPD and with end-stage renal failure*. *Clin Nephrol*, 2000. **53**: p. 115-123.
19. Panichi, V., et al., *C-reactive protein and interleukin-6 levels are related to renal function in predialytic chronic renal failure*. *Nephron*, 2002. **91**(4): p. 594-600.
20. Memoli, B., et al., *Role of different dialysis membranes in the release of interleukin-6 soluble receptor in uremic patients*. *Kidney Int*, 2000. **58**: p. 417-424.
21. Bolton, C.H., et al., *Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines*. *Nephrol Dial Transpl*, 2001. **16**: p. 1189-1197.
22. Chung, S.H., et al., *Association between residual renal function, inflammation and patient survival in new peritoneal dialysis patients*. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. **18**(3): p. 590-7.
23. Ikizler, T.A., *Epidemiology of vascular disease in renal failure*. *Blood Purif*, 2002. **20**(1): p. 6-10.
24. Zoccali, C., F. Mallamaci, and G. Tripepi, *Atherosclerosis in dialysis patients: does Chlamydia pneumoniae infection contribute to cardiovascular damage?PG - 25-8*. *Nephrol Dial Transplant*, 2002. **17 Suppl 8**.
25. Campbell, D.I., et al., *The African enigma: low prevalence of gastric atrophy, high prevalence of chronic inflammation in West African adults and children*. *Helicobacter*, 2001. **6**(4): p. 263-7.
26. Howell, T.H., et al., *Periodontal disease and risk of subsequent cardiovascular disease in U.S. male physicians.PG - 445-50*. *J Am Coll Cardiol*, 2001. **37**(2).
27. Fong, I.W., *Infections and their role in atherosclerotic vascular disease*. *J Am Dent Assoc*, 2002. **133 Suppl**: p. 7S-13S.

28. Klassen, J.T. and B.M. Krasko, *The dental health status of dialysis patients*. J Can Dent Assoc, 2002. **68**(1): p. 34-8.
29. Mengel, R., et al., *[Periodontal status in Rio de Janeiro city (Brazil)]*. Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl, 1991. **79**(4): p. 285-92.
30. Kaysen, G.A., *The microinflammatory state in uremia - Causes and potential consequences*. J Am Soc Nephrol, 2001. **In Press**.
31. Honkanen, E., et al., *Acute-phase proteins during hemodialysis: correlations with serum interleukin-1 beta levels and different dialysis membranes*. Nephron, 1991. **57**(3): p. 283-7.
32. Tielemans, C., et al., *Effects of ultrapure and non-sterile dialysate on the inflammatory response during in vitro hemodialysis*. Kidney Int, 1996. **49**(1): p. 236-43.
33. Kaysen, G.A. and V. Kumar, *Inflammation in ESRD: causes and potential consequences*. J Ren Nutr, 2003. **13**(2): p. 158-60.
34. Yeun, J.Y. and G.A. Kaysen, *Acute phase proteins and peritoneal dialysate albumin loss are the main determinants of serum albumin and peritoneal dialysis patients*. Am J Kidney Dis, 1997. **30**: p. 923-927.
35. Carozzi, S., et al., *Peritoneal dialysis effluent, cytokine levels, and peritoneal mesothelial cell viability in CAPD: a possible relationship*. Adv Perit Dial, 1997. **13**: p. 7-12.
36. Kaysen, G.A., et al., *The acute-phase response varies with time and predicts serum albumin levels in hemodialysis patients*. Kidney Int, 2000. **58**: p. 346-352.
37. Stenvinkel, P., et al., *Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure*. Kidney Int, 1999. **55**(5): p. 1899-911.
38. Caravaca, F., et al., *Uraemic symptoms, nutritional status and renal function in pre-dialysis end-stage renal failure patients*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(4): p. 776-82.
39. Group, C.-U.C.P.D.S., *Adequacy of dialysis and nutrition in continuous peritoneal dialysis: Association with clinical outcomes*. J Am Soc Nephrol, 1996. **7**: p. 198-207.
40. Qureshi, A.R., et al., *Inflammation, malnutrition and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients*. Submitted, 2001.

41. Qureshi, A.R., et al., *Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13 Suppl 1**: p. S28-36.
42. Zimmermann, J., et al., *Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients*. Kidney Int, 1999. **55**: p. 648-658.
43. Wanner, C., et al., *Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients*. Kidney Int, 2002. **61 Suppl 80**: p. 99-102.
44. Yeun, J.Y., et al., *C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients*. Am J Kidney Dis, 2000. **35**: p. 469-476.
45. Ikizler, T.A., et al., *Association of morbidity with markers of nutrition and inflammation in chronic hemodialysis patients: A prospective study*. Kidney Int, 1999. **55**: p. 1945-1951.
46. Bologa, R.M., et al., *Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients*. Am J Kidney Dis, 1998. **32(1)**: p. 107-14.
47. Shinzato, T., et al., *Report of the annual statistical survey of the Japanese Society for Dialysis Therapy in 1996*. Kidney Int, 1999. **55(2)**: p. 700-12.
48. Noh, H., et al., *Serum C-reactive protein: a predictor of mortality in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients*. Nephrol Dial Transpl, 1998. **18**: p. 387-394.
49. Iseki, K., et al., *Serum C-reactive (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients*. Nephrol Dial Transpl, 1999. **14**: p. 1956-1960.
50. Riella, M.C., *Malnutrition in dialysis: Malnourishment or uremic inflammatory response?* Kidney Int, 2000. **57**: p. 1211-1232.
51. Stenvinkel, P., et al., *Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA-syndrome)*. Nephrol Dial Transpl, 2000. **15**: p. 953-960.
52. *Clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. K/DOQI, National Kidney Foundation*. Am J Kidney Dis, 2000. **35(6 Suppl 2)**: p. S1-140.
53. Lowrie, E.G. and N.L. Lew, *Death risk in hemodialysis patients: The predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities*. Am J Kidney Dis, 1990. **15**: p. 458-482.
54. Coronado, B., et al., *Cardiovascular disease risk factors and GFR in the MDRD study*. J Am Soc Nephrol, 1997.

55. Hakim, R.M. and N. Levin, *Malnutrition in hemodialysis patients*. Am J Kidney Dis, 1993. **21**: p. 125-137.
56. Heimbürger, O., et al., *Hand-grip muscle strength, lean body mass, and plasma proteins as markers of nutritional status in patients with chronic renal failure close to start of dialysis therapy*. Am J Kidney Dis, 2000. **36**(6): p. 1213-25.
57. Bergström, J., *Metabolic acidosis and nutrition in dialysis patients*. Blood Purif, 1996. **13**: p. 361-367.
58. Laville, M. and D. Fouque, *Nutritional aspects in hemodialysis*. Kidney Int Suppl, 2000. **76**: p. S133-9.
59. Ikizler, T.A., et al., *Hemodialysis stimulates muscle and whole body protein loss and alters substrate oxidation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(1): p. E107-16.
60. Stein, A., et al., *Role of an improvement in acid-base status and nutrition in CAPD patients*. Kidney International, 1997. **52**(4): p. 1089-95.
61. Volanakis, J.E., *Human C-reactive protein: expression, structure, and function*. Mol Immunol, 2001. **38**(2-3): p. 189-97.
62. Dong, Q. and J.R. Wright, *Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4815-20.
63. Yasojima, K., et al., *Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease*. Brain Res, 2000. **887**(1): p. 80-9.
64. Gershov, D., et al., *C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1353-64.
65. Du Clos, T.W., *Function of C-reactive protein*. Ann Med, 2000. **32**(4): p. 274-8.
66. Yasojima, K., et al., *Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques*. Am J Pathol, 2001. **158**(3): p. 1039-51.
67. Morrow, D.A., et al., *C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. Thrombolysis in Myocardial Infarction*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(7): p. 1460-5.
68. Vlaicu, R., et al., *Immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic intima*. Atherosclerosis, 1985. **55**(1): p. 35-50.

69. Torzewski, J., et al., *C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries*. *Arterioscler Tromb Vasc Biol*, 1998. **18**: p. 1386-1392.
70. Irish, A., *Cardiovascular disease, fibrinogen and the acute phase response. Associations with lipids and blood pressure in patients with chronic renal disease*. *Atherosclerosis*, 1998. **137**: p. 133-139.
71. Bickel, C., et al., *Relation of markers of inflammation (C-reactive protein, fibrinogen, von Willebrand factor, and leukocyte count) and statin therapy to long-term mortality in patients with angiographically proven coronary artery disease*. *Am J Cardiol*, 2002. **89**(8): p. 901-8.
72. Rhoads, G.G., et al., *Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction*. *JAMA*, 1986. **256**: p. 2540-2544.
73. Hwang, S.-J., C.M. Ballantyne, and A.R. Sharrett, et al, *Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. *Circulation*, 1997. **96**: p. 4219-4225.
74. Oertli, B., et al., *Mechanisms of hyaluronan-induced upregulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney epithelial cells: hyaluronan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear factor-kappa B and activating protein-1*. *J of Immunol*, 1998. **161**: p. 3431-3437.
75. Folsom, A.R., et al., *C-reactive protein and incident coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study*. *Am Heart J*, 2002. **144**(2): p. 233-8.
76. Stenvinkel, P., et al., *A syndrome of malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA) is associated with elevated serum hyaluronan and increased mortality in chronic renal failure (CRF)*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**: p. 182A.
77. *Cardiovascular Risk Extended Evaluation in Dialysis Patients (CREED), C-reactive protein and atherosclerosis in dialysis patients*. *Nephrol Dial Transpl*, 1998. **13**: p. 2710-2711.
78. Levin, A., *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease prior to dialysis*. *Semin Dial*, 2003. **16**(2): p. 101-5.
79. Bergstrom, J. and B. Lindholm, *Malnutrition, cardiac disease, and mortality: an integrated point of view*. *Am J Kidney Dis*, 1998. **32**(5): p. 834-41.

80. Kim, S.B., et al., *Persistent elevation of C-reactive protein and ischemic heart disease in patients with continuous ambulatory peritoneal dialysis*. Am J Kidney Dis, 2002. **39**(2): p. 342-6.
81. Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am Heart J, 1999. **138**(5 Pt 2): p. S419-20.
82. Ross, R., *Atherosclerosis: an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
83. Maggi, E., et al., *Enhanced LDL oxidation in uremic patients: An additional mechanism for accelerated atherosclerosis*. Kidney Int, 1994. **45**: p. 876-883.
84. Kronenberg, F., et al., *LDL-unbound apolipoprotein(a) and carotid atherosclerosis in hemodialysis patients*. Clinical Genetics, 1997. **52**: p. 377-386.
85. Zoccali, C., F. Mallamaci, and G. Tripepi, *Inflammation and atherosclerosis in end-stage renal disease*. Blood Purif, 2003. **21**(1): p. 29-36.
86. Amann, K., et al., *Special characteristics of atherosclerosis in chronic renal failure*. Clin Nephrol, 2003. **60 Suppl 1**: p. S13-21.
87. Zoccali, C., et al., *Fibrinogen, inflammation and concentric left ventricular hypertrophy in chronic renal failure*. Eur J Clin Invest, 2003. **33**(7): p. 561-6.
88. Prichard, S.S., *Impact of dyslipidemia in end-stage renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(9 Suppl 4): p. S315-20.
89. Locatelli, F., et al., *Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(7): p. 1272-80.
90. Massy, Z.A. and T. Nguyen-Khoa, *Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management*. J Nephrol, 2002. **15**(4): p. 336-41.
91. Nguyen-Khoa, T., et al., *Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(2): p. 335-40.
92. Loguercio, C. and A. Federico, *Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(1): p. 1-10.
93. Halliwell, B., *The role of oxygen radicals in human disease with particular reference to the vascular system*. Haemostasis, 1993. **23 [Suppl. 1]**: p. 118-126.
94. Maggi, E., et al., *Autoantibodies against oxidatively-modified LDL in uremic patients undergoing dialysis*. Kidney Int, 1994. **46**: p. 869-876.

95. Bonnefont-Rousselot, D., et al., *Blood oxidative stress and lipoprotein oxidizability in haemodialysis patients: effect of the use of a vitamin E-coated dialysis membrane*. *Nephrol Dial Transplant*, 2000. **15**(12): p. 2020-8.
96. Michelis, R., et al., *Carbonyl stress induced by intravenous iron during haemodialysis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. **18**(5): p. 924-30.
97. Miyata, T., et al., *Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure*. *Kidney Int*, 1997. **51**: p. 1170-1181.
98. Miyata, T., et al., *Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers*. *Biochem Biophys Res Comm*, 1998. **244**: p. 45-49.
99. Makita, Z., et al., *Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(12): p. 836-842.
100. Miyata, T., et al., *Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine*. *J Am Soc Nephrol*, 1996. **7**(8): p. 1198-1206.
101. Miyata, T., et al., *Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure*. *Kidney Int*, 1997. **51**(4): p. 1170-1181.
102. Miyata, T., et al., *beta 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(3): p. 1243-1252.
103. Miyata, T., et al., *2-Isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) treatment inhibits the development of intimal thickening after balloon injury of rat carotid artery: role of glycooxidation and lipoxidation reactions in vascular tissue damage*. *FEBS Lett*, 1999. **445**(1): p. 202-206.
104. Schwedler, S.B., et al., *Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients*. *Kidney Int*, 2002. **62**(1): p. 301-310.
105. Drueke, T., et al., *Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease*. *Circulation*, 2002. **106**(17): p. 2212-7.
106. Arosio, P. and S. Levi, *Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(4): p. 457-63.
107. Meneghini, R., *Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage*. *Free Radic Biol Med*, 1997. **23**(5): p. 783-92.

108. Turlin, B. and Y. Deugnier, *Iron overload disorders*. Clin Liver Dis, 2002. **6**(2): p. 481-96, viii.
109. Zager, R.A., et al., *Parenteral iron formulations: a comparative toxicologic analysis and mechanisms of cell injury*. Am J Kidney Dis, 2002. **40**(1): p. 90-103.
110. Westendorp, M.O., et al., *HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state*. Embo J, 1995. **14**(3): p. 546-54.
111. Jain, S.K., et al., *Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease*. J Hepatol, 2002. **36**(6): p. 805-11.
112. Rigamonti, C., et al., *Iron, hepatic stellate cells and fibrosis in chronic hepatitis C*. Eur J Clin Invest, 2002. **32 Suppl 1**: p. 28-35.
113. Sherrington, C.A. and J.K. Olynyk, *Iron as a cofactor in chronic hepatitis C infection*. Liver, 2002. **22**(3): p. 187-9.
114. Riggio, O., et al., *Iron overload in patients with chronic viral hepatitis: how common is it?* Am J Gastroenterol, 1997. **92**(8): p. 1298-1301.
115. Stal, P., et al., *The effects of dietary iron on initiation and promotion in chemical hepatocarcinogenesis*. Hepatology, 1995. **21**(2): p. 521-8.
116. Ishizaka, Y., et al., *Association between hepatitis C virus core protein and carotid atherosclerosis*. Circ J, 2003. **67**(1): p. 26-30.
117. Kiechl, S., et al., *Active and passive smoking, chronic infections, and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck Study*. Stroke, 2002. **33**(9): p. 2170-6.
118. Carneiro, M.A., et al., *Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patients in Central Brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2001. **96**(6): p. 765-9.
119. Koken, T., et al., *Oxidative stress markers in hepatitis C infected hemodialysis patients*. J Nephrol, 2002. **15**(3): p. 302-7.

Biblioteca  
FAMED/HCPA



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1) Primário:**

Avaliar o estado nutricional, perfil inflamatório e o estresse oxidativo em pacientes em terapia de substituição renal com hemodiálise.

### **2.2) Secundários:**

- 1) Analisar o impacto dos níveis circulantes de marcadores inflamatórios, verificada de maneira seriada, na sobrevivência dos pacientes em hemodiálise.
- 2) Avaliar a prevalência de má nutrição e inflamação em uma amostra da população brasileira em hemodiálise.
- 3) Verificar a correlação da infecção pelo vírus da hepatite C e da reposição parenteral de ferro com os níveis plasmáticos de pentosidina.

### 3. PRIMEIRO ARTIGO EM PORTUGUÊS

#### **Impacto Prognóstico de Níveis Flutuantes de Proteína C-Reativa em Pacientes Brasileiros em Hemodiálise: Um Estudo Prospectivo**

Marcelo M. Nascimento <sup>1, 3, 4</sup>, Roberto Pecoits-Filho <sup>2,4</sup>, A. Rashid Qureshi <sup>4</sup>, Shirley Y. Hayashi <sup>4</sup>, Roberto C. Manfro <sup>3</sup>, Maria A. Pachaly <sup>1</sup>, Luciana Renner <sup>1</sup>, Peter Stenvinkel <sup>4</sup>, Bengt Lindholm <sup>4</sup> e Miguel C. Riella <sup>1,2</sup>

Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná - Brasil <sup>1</sup> ; Divisão de Nefrologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Brasil <sup>2</sup> ; Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul <sup>3</sup>; Divisões de Medicina Renal e Baxter Novum, Departamento de Ciências Clínicas, Instituto Karolinska, Hospital Universitário de Huddinge, Estocolmo, Suécia <sup>4</sup>

#### **Endereço para correspondência:**

Bengt Lindholm, MD, PhD

Divisions of Renal Medicine and Baxter Novum

K-56 Huddinge University Hospital.

S-141 86 Stockholm

Sweden

Tel: +46(8) 5858-2601

Fax: +46(8) 689-7730

E-mail: [bengt.lindholm@klinvet.ki.se](mailto:bengt.lindholm@klinvet.ki.se)

## RESUMO

**Introdução:** Uma medida elevada isolada da proteína C-reativa (PCR) prediz a mortalidade em pacientes em hemodiálise (HD), mas o impacto da resposta inflamatória persistente comparada à ocasional não é conhecido.

**Métodos:** Para estabelecer a influência da inflamação ocasional na sobrevida de 180 pacientes (54% M, 49±14 anos) em HD, foram analisados a cada dois meses: proteína C-reativa (PCR), albumina sérica (Alb-S) e fibrinogênio. Baseando-se em quatro dosagens consecutivas de PCR os pacientes foram alocados em três grupos: Grupo 1 (n= 74; 41%), sem inflamação (PCR < 5,1 mg/l em todas as dosagens); Grupo 2 (n=65; 36%), inflamação ocasional (1-3 dosagens de PCR > 5,1mg/l); e Grupo 3 (n=41; 23%), inflamação persistente (todas as dosagens de PCR > 5,1mg/l). O estado nutricional foi avaliado pelo ASG (Avaliação Subjetiva Global), e a sobrevida (21 meses de seguimento) pela curva de Kaplan Meier e o modelo de Cox.

**Resultados:** A mediana e os intervalos dos valores de PCR (mg/l) para os grupos 1, 2 e 3 foram: 3,2 (3,2-5,1), 3,6 (3,2-54,9) e 13,8 (5,2-141), respectivamente (p<0,001). Não houve diferença significativa (p=0,27) entre a prevalência de desnutrição entre o Grupo 1 (62%), Grupo 2 (54%) e Grupo 3 (72%), respectivamente. A taxa de sobrevida pela análise de Kaplan Meier foi significativamente diferente entre os grupos (qui-quadrado 12,34; p=0,0004). Os pacientes no Grupo 3 apresentaram a maior mortalidade (34%; p=0,001), comparado ao Grupo 1 (8%) e Grupo 2 (14%; p=0,01), respectivamente, enquanto não se observou diferença significativa na mortalidade entre os Grupos 1 e 2. Idade, níveis de PCR, Alb-S e desnutrição foram previsores independentes de mortalidade.

**Conclusão:** Os resultados indicam que a inflamação persistente, foi um melhor fator preditor de mortalidade do que a inflamação ocasional em pacientes em HD.

**Palavras chave:** hemodiálise, inflamação, desnutrição, IRC, proteína C-reativa.

**Título de Cabeçalho:** Atividade inflamatória persistente e evolução clínica.

## Introdução

Apesar do rápido desenvolvimento da tecnologia em diálise, a taxa anual de mortalidade de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) é muitas vezes maior do que a da população geral. Esta diferença se deve principalmente à aterosclerose acelerada e mortalidade elevada associadas com doença cardiovascular (DCV) (1). O enfoque nos mecanismos patogénéticos do processo aterosclerótico vem se modificando ao longo da última década, e o interesse na participação da inflamação neste processo está aumentando (2). Além disso, 40% dos pacientes submetidos a diálise de manutenção sofrem de graus variados de desnutrição e o mau estado nutricional está associado a inflamação, DCV e aumento da mortalidade em pacientes com IRC (3).

Estudos transversais baseados em uma única determinação da PCR demonstraram que cerca de 30-50% dos pacientes em pré-diálise, hemodiálise (HD) e diálise peritoneal (DP) apresentam evidências sorológicas de uma resposta inflamatória ativada, com níveis elevados de proteína C-reativa (PCR) (4). Entretanto, a inflamação pode flutuar ao longo do tempo, e o aparecimento de eventos clínicos em pacientes em diálise pode estar relacionado principalmente a elevações persistentes, e não ocasionais, nos níveis plasmáticos de PCR (5, 6). Apesar de estar bem documentado que a mortalidade por DCV é significativamente mais alta em pacientes em hemodiálise com uma dosagem isolada de PCR elevada (7, 8), as conseqüências em termos de evolução clínica de níveis flutuantes de PCR ainda não foram estabelecidas. Para testar a hipótese de que a ativação inflamatória ocasional tem um impacto na sobrevivência de pacientes com IRC, medimos prospectivamente, a cada 2 meses, os níveis de PCR em 180 pacientes em hemodiálise, por 6 meses. Os dados clínicos, laboratoriais e o estado nutricional foram avaliados e os pacientes foram seguidos por um período de 21 meses, durante o qual a mortalidade foi registrada.

## **Pacientes e Métodos**

### *Pacientes e desenho do estudo*

Todos os pacientes prevalentes em HD em três centros de diálise em Curitiba, sul do Brasil, foram inicialmente admitidos no presente estudo, que consistiu de duas partes. Na primeira parte (pré-basal), os pacientes foram submetidos a avaliações bimestrais de inflamação, por 6 meses. Ao final deste período, foi realizada uma avaliação clínica e nutricional (investigação basal). Na segunda fase de seguimento, a mortalidade foi registrada. Para serem incluídos na segunda parte do estudo, era necessário que os pacientes tivessem completado quatro dosagens consecutivas de PCR durante o período pré-basal. Os critérios de exclusão foram a presença de uma doença inflamatória crônica conhecida ou infecção ativa durante os 6 meses iniciais do estudo. Entre os 264 pacientes inicialmente admitidos no estudo, 180 (68%) pacientes (97 homens e 83 mulheres) atingiram os critérios de inclusão. Os dados clínicos e laboratoriais são apresentados na Tabela 1.

A mediana da idade foi de 48 anos (intervalo, 16 a 89 anos). As causas de IRC foram: glomerulonefrite crônica (n=63; 35%), nefrosclerose hipertensiva (n=47; 26%), nefropatia diabética (n=20; 11%) e outras causas (n=50; 28%). Todos os pacientes foram hemodialisados por 3-4 horas três vezes por semana com membranas de celulose modificada (acetato de celulose ou derivados de celulose). A grande maioria dos pacientes possuía fistulas AV nativas, e apenas 5% possuíam enxertos vasculares. Os medicamentos incluíam eritropoietina recombinante humana, sacarato de ferro, quelantes de fósforo à base de cálcio, vitamina D ativa oral, anti-hipertensivos (inibidores da enzima conversora da angiotensina entre eles), quelantes de fósforo, vitamina D na forma oral sendo que drogas anti-inflamatórias, como ácido acetil salicílico (indicados como anti-agregantes plaquetários), foram utilizados numa minoria dos pacientes. O Comitê de Ética do Hospital Evangélico de Curitiba aprovou o protocolo de estudo, e o consentimento informado foi obtido de todos os pacientes.

Inflamação clinicamente significativa foi definida como PCR > 5,1mg/l, baseado na curva ROC (receiver operating characteristics), que apresentou um valor de corte de PCR >5,1 mg/l como um fator predictor de morte (Figura 1). De acordo com os resultados das quatro dosagens consecutivas de PCR durante o período pré-basal, e utilizando a curva ROC para a PCR, os pacientes foram alocados em três grupos: Grupo 1 (n =74), sem inflamação (o valor de todas as quatro dosagens de PCR < 5,1mg/l); Grupo 2 (n = 65), inflamação flutuante (pelo menos um valor de PCR > 5,1mg/l), e Grupo 3 (n = 41), inflamação persistente (o valor de todas as quatro dosagens de PCR > 5,1mg/l).

#### *Métodos laboratoriais*

As amostras de sangue venoso foram colhidas antes do início da sessão de hemodiálise e armazenadas em gelo (4°C) e centrifugadas dentro de 60 minutos após a coleta. As amostras foram então armazenadas a -20°C até a análise. Determinações séricas de PCR (imunoensaio nefelométrico; apenas valores > 3,2 mg/l foram relatados), albumina sérica (Alb-S) (método do verde bromocresol), e fibrinogênio (medido pelo método do tempo de trombina, com uma amostra de sangue anticoagulada com citrato de sódio a 3,8%) foram realizadas bimestralmente durante os 6 meses prévios ao período de seguimento. Hemoglobina e uréia sérica, determinadas pelos métodos de rotina, e a adequação da diálise (Kt/V) avaliada pela equação de Daugirdas (9), foram analisadas na fase basal.

#### *Avaliação nutricional*

A avaliação subjetiva global (ASG) foi utilizada para determinar o estado nutricional basal. O ASG incluiu seis indicadores ou dados subjetivos: três avaliações baseadas na história de perda de peso pelo paciente, presença de anorexia e vômitos, e três baseadas nos critérios do nutricionista de verificação da perda de massa muscular, presença de edema e perda de gordura subcutânea. Com base nestas avaliações, cada paciente recebeu uma classificação que refletiu o estado nutricional, como se segue: A= estado nutricional normal, B= desnutrição leve a moderada e C= desnutrição grave (10). O ASG basal foi realizado no início do período de seguimento e foi executado pelo mesmo nutricionista.



## *Seguimento*

Após a investigação basal, os pacientes foram prospectivamente acompanhados pelos 21 meses subseqüentes para determinar sua evolução clínica. A sobrevida foi registrada a partir do final do período pré-basal da coleta das amostras (de Setembro de 2000 a Maio de 2002) até o óbito (n =27) ou censurados quando da realização de transplante renal (n=13).

## *Análise estatística*

Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e mediana mais limites. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo. A comparação entre dois grupos foi realizada utilizando o teste t de Student para variáveis normalmente distribuídas, enquanto o teste U de Mann-Whitney foi utilizado para variáveis não normalmente distribuídas. Comparações entre três grupos foram realizadas utilizando o teste ANOVA. A análise das variáveis categóricas foi feita pela análise de tabelas de contingência. Para variáveis não distribuídas normalmente, as correlações foram feitas com teste de ranqueamento de Spearman. O teste de Kaplan Meier foi utilizado para análise de sobrevida. A análise de risco proporcional de Cox foi utilizada para estabelecer previsores individuais de sobrevida. O valor de corte para a PCR, como previsora de morte, atingiu uma sensibilidade e especificidade de 63% e 67,3% respectivamente, de acordo com a curva ROC (Fig. 1). A área sob a curva ROC foi 0,696, erro padrão 0,002, e intervalo de confiança de 95%, 0,564 a 0,795.

## **Resultados**

### *Dados Clínicos*

Os dados clínicos e concentrações séricas de PCR, Alb-S e fibrinogênio para os 180 pacientes estão resumidos na Tabela 1. Desnutrição (ASG, classificação B e C) estava presente em 99 (62%) dos pacientes dos 159 investigados; 85 (53%) pacientes encontravam-se levemente desnutridos, e 14 (8%) dos pacientes estavam gravemente desnutridos. Os valores da mediana e limites da PCR, e das médias e desvios padrão da Alb-S e fibrinogênio, na investigação basal foram respectivamente: 3,6 mg/l (variação, 3,2 - 82 mg/l),  $3,5 \pm 0,3$  g/dl, e  $500 \pm 140$  mg/dl.

Nível elevado de PCR (definido como PCR >5,1mg/l) foi encontrado em 66 (37%) pacientes na primeira medida disponível durante o período pré-basal, e 106 (59%) pacientes apresentaram PCR elevada pelo menos em uma ocasião durante os 6 meses de período pré-basal. Em 37% dos pacientes a PCR estava elevada em todas as quatro medidas. Entre os 66 pacientes que apresentavam PCR inicial elevada, 45 (68%) continuaram com PCR >5,1 mg/l na medida final (Tabela 2). Além disso, no período pré-basal, 45 (24%) pacientes apresentavam sinais de inflamação ou desnutrição.

Na fase basal, encontrou-se correlação entre PCR e fibrinogênio (Rho = 0,43,  $p < 0,001$ ), mas, inesperadamente, não entre PCR e Alb-S (Rho=-0,11;  $p = 0,15$ ), fibrinogênio e Alb-S (Rho=0,04;  $p = 0,6$ ) ou PCR e idade (Rho=0,08;  $p = 0,28$ ). Uma correlação significativa foi encontrada entre desnutrição e idade (Rho=0,18;  $p = 0,002$ ). Os pacientes desnutridos eram significativamente mais idosos ( $51 \pm 13$  vs.  $46 \pm 15$  anos;  $p = 0,02$ ) comparados aos pacientes bem nutridos. Em outros aspectos, os pacientes desnutridos não diferiram significativamente dos pacientes bem nutridos com relação a uma variedade de parâmetros bioquímicos, incluindo Alb-S ( $3,5 \pm 0,3$  vs.  $3,4 \pm 0,3$  g/dl;  $p = 0,15$ ); fibrinogênio ( $507 \pm 138$  vs.  $480 \pm 170$  mg/dl,  $p = 0,24$ ) e PCR ( $4,3 [3,2 - 80,7]$  vs.  $5,1 [3,2 - 37]$  mg/l,  $p = 0,54$ ), respectivamente (Tabela 3).

#### *Comparações entre os três grupos de PCR*

As características clínicas dos três grupos são apresentadas na Tabela 4. Os valores individuais de PCR no grupo 2 são demonstrados na Figura 2. Os 65 pacientes no Grupo 2 apresentavam PCR elevada em uma (31 pacientes), duas (25 pacientes) ou três (9 pacientes) determinações. Enquanto os níveis séricos de albumina (Alb-S) não diferiram significativamente entre os três grupos, os pacientes no Grupo 3 apresentaram níveis significativamente ( $p < 0,001$ ) mais altos de fibrinogênio ( $570 \pm 130$  mg/dl) quando comparados aos pacientes no Grupo 1 ( $430 \pm 120$  mg/dl) e Grupo 2 ( $510 \pm 120$  mg/dl). Surpreendentemente, a prevalência de desnutrição não diferiu significativamente entre os três grupos. Apesar de os pacientes no Grupo 3 apresentarem níveis mais baixos de Kt/V ( $1,2 \pm 0,2$ ), comparados aos pacientes no Grupo 1 ( $1,36 \pm 0,2$ ) e Grupo 2 ( $1,36 \pm 0,2$ ) esta diferença não atingiu plena significância estatística ( $p = 0,06$ ). A mortalidade geral foi

significativamente mais alta no Grupo 3 (34%) comparada ao Grupo 1 (8 %) e Grupo 2 (14 %) ( $p=0,001$ ). Quando analisados separadamente, não houve diferenças significativas na mortalidade entre o Grupo 1 e 2 (Qui-Quadrado = 0,67,  $p=0,5$ ), mas a mortalidade foi significativamente mais alta no Grupo 3 comparado ao Grupo 2 (Qui-Quadrado = 7,1,  $p=0,01$ ) e entre Grupo 3 e Grupo 1 (Qui-Quadrado = 11,97,  $p=0,0007$ ).

### *Análise de sobrevida*

Durante o período de seguimento, 27 pacientes evoluíram para óbito (8%, 14% e 34 % para os Grupos 1, 2 e 3, respectivamente). As causas de morte foram DCV (52%), infecção (30%) ou outras causas (18%). A sobrevida em pacientes no grupo 1, 2 e 3 é apresentada na Figura 3. De acordo com a análise de Kaplan Meier para toda a população, a taxa de sobrevida foi significativamente diferente entre os grupos (qui-quadrado 12,34,  $p=0,0004$ ). Pacientes no Grupo 3 apresentaram a mortalidade mais elevada (34%;  $p=0,001$ ) comparados ao Grupo 1 (mortalidade de 8%) e Grupo 2 (mortalidade de 14%) respectivamente, enquanto não houve diferença na mortalidade entre o Grupo 1 e Grupo 2. A análise de risco proporcional de Cox foi aplicada à população geral do estudo para ajustar ocasiões livres de eventos, para idade, desnutrição, PCR, Alb-S e sexo (Tabela 5). A análise de Cox demonstrou que a desnutrição, a idade, a Alb-S e a PCR estavam independentemente associadas com a mortalidade. Por outro lado, o sexo não foi um preditor independente de mortalidade na análise de Cox.

Os dados clínicos dos sobreviventes e não-sobreviventes são apresentados na Tabela 6. Comparados aos sobreviventes, os não sobreviventes apresentavam nível médio mais elevado de PCR (6,2 [3,2 - 82] mg/l vs. 3,2 [3,2 - 28,30] mg/l ( $p<0,0001$ ), níveis mais baixos de Alb-S ( $3,3\pm 0,5$  vs.  $3,5\pm 0,3$  g/dl) ( $p=0,003$ ), e eram mais idosos ( $57\pm 14$  vs.  $48\pm 14$  anos) ( $p=0,002$ ) respectivamente. Quase todos os não sobreviventes eram desnutridos (96%), enquanto que a prevalência de desnutrição nos sobreviventes foi de 56%.

## Discussão

O principal achado do presente estudo foi que os 23% dos pacientes em HD que apresentavam níveis plasmáticos de PCR persistentemente elevados apresentaram pior evolução clínica, comparados aos pacientes em HD que apresentavam elevações ocasionais (36% dos pacientes) ou níveis baixos (41% dos pacientes) de PCR. Desta forma, a inflamação persistente, mais do que inflamação ocasional, foi um poderoso fator predictor de mortalidade. Além disto, 62% dos pacientes eram desnutridos, e a desnutrição apresentou um forte impacto na mortalidade. Entretanto, em contraste com vários estudos prévios, da Europa e América do Norte, as correlações entre marcadores inflamatórios e estado nutricional foram fracas, sugerindo que a inflamação não foi um forte determinante do estado nutricional neste estudo. A alta prevalência de inflamação neste estudo brasileiro confirma que a inflamação é uma característica clínica importante em pacientes com IRC, independentemente da origem geográfica (11).

É um fato reconhecido atualmente que existem fortes correlações entre desnutrição, inflamação e DCV em pacientes com IRC (7, 8 12, 13). A síndrome de mal-nutrição, inflamação e aterosclerose (MIA) associa-se a alta mortalidade, e nesta síndrome a inflamação parece ter participação crucial (13). Apesar de a origem da inflamação na IRC não ser clara, acredita-se que a infecção bacteriana ou viral crônica, a perda de função renal residual, a uremia per se, e em pacientes em HD, a influência do procedimento dialítico sejam fatores importantes (14-17). No presente estudo, encontramos que 59% de nossos pacientes, que não apresentavam sinais de infecção clinicamente aparente, tinham nível elevado de PCR ( $PCR > 5,1$  mg/l) em pelo menos uma ou mais ocasiões durante os 6 meses iniciais do período pré-basal, confirmando que a IRC é um estado inflamatório crônico. Um estudo recente em um grande grupo de pacientes europeus com IRC (17) mostrou que um valor de PCR acima de 3,4 mg/l foi um fator predictor de mortalidade.

Ao comparar os dados atuais com estudos europeus e norte-americanos prévios, várias diferenças importantes devem ser consideradas. Primeiro, em nosso estudo a glomerulonefrite crônica e a nefrosclerose hipertensiva foram as causas mais comuns de IRC, o que está de acordo com os dados do registro latino americano (18). Segundo, em contraste com os estudos norte americanos e

europeus em que a prevalência de nefropatia diabética em HD é mais alta, a prevalência de nefropatia diabética foi de apenas 9% no estudo atual. Isto deve ser explicado pelo fato de que a maior parte dos pacientes diabéticos em nossa clínica estão sendo tratados por DP. Outro fator importante a ser considerado é que a média de idade foi consideravelmente mais baixa em comparação com pacientes europeus e norte americanos em diálise (19, 20). Finalmente, uma prevalência elevada de desnutrição (62%, pela avaliação do ASG) foi encontrada no estudo atual, comparado aos estudos europeus e norte americanos prévios, onde geralmente menos de 50% dos pacientes em diálise apresentam graus variáveis de desnutrição (11). As fracas correlações entre os marcadores biológicos de inflamação e o estado nutricional podem indicar que a desnutrição, num sentido mais amplo, pode ser explicada pela deficiente ingestão protéica nos pacientes brasileiros em HD.

A maioria dos estudos que analisam o perfil inflamatório e desnutrição em pacientes com IRC são de países ocidentais e asiáticos industrializados, enquanto que em outros países a estimativa real da síndrome MIA permanece obscura (11). A prevalência da desnutrição em nossa população (62%) foi semelhante à relatada previamente na Suécia (12), mas é mais elevada que a prevalência em vários outros estudos, especialmente em pacientes asiáticos nos quais a desnutrição e inflamação possam ser menos comuns. No estudo de Noh et al (21), 12% de 106 pacientes em DP na Coreia apresentavam sinais de inflamação, e mesmo neste grupo a prevalência de desnutrição foi de apenas 30,8%. Estes achados divergentes podem ser explicados por diferenças em fatores sócio-econômicos, nutricionais e genéticos entre diferentes populações.

#### *Inflamação e mortalidade*

A resposta de fase aguda de maneira geral varia ao longo do tempo em pacientes em diálise, sugerindo que um processo transitório, tal como as infecções, é freqüentemente responsável pela ativação da resposta inflamatória (22). Quando analisamos as variações nos níveis de PCR em nossos pacientes, foi possível identificar um grupo de pacientes nos quais os níveis de PCR flutuaram entre valores acima e abaixo do ponto de corte (Grupo 2). Do ponto de vista clínico, é

importante compreender as implicações da resposta inflamatória nos pacientes do Grupo 2 que algumas vezes apresentaram níveis de PCR dentro dos limites da normalidade. De acordo com a análise de Kaplan Meier, estes pacientes apresentaram uma melhor taxa de sobrevida, comparados aos pacientes persistentemente inflamados do Grupo 3.

Uma possibilidade de explicação para a pior sobrevida no Grupo 3 é que este grupo possuía mais condições de co-morbidades comparado aos outros dois grupos, e também apresentava níveis mais elevados de fibrinogênio, prevalência mais elevada de desnutrição e idade mais avançada do que os outros dois grupos. Já demonstramos previamente que a taxa de mortalidade aumenta progressivamente com o aumento do número de fatores de risco (desnutrição, inflamação e DCV), chegando a 75% após 3 anos nos pacientes que possuem todos estes três fatores de risco (12). Neste estudo, pudemos confirmar que a idade, a Alb-S, a PCR e a desnutrição foram preditores independentes de mortalidade. De modo semelhante, Zimmermann et al (8) e Yeun et al (7) demonstraram que a PCR e a idade foram os fatores preditores mais importantes de mortalidade por DCV em pacientes europeus e norte americanos em HD. A diferença entre a mortalidade no Grupo 2 e Grupo 3, no presente estudo, poderia também estar relacionada ao fato de que os pacientes do Grupo 2 eram mais jovens e apresentavam níveis médios mais baixos de PCR, refletindo um menor grau de atividade inflamatória persistente. É notável que os pacientes do Grupo 3, também durante o período de seguimento, apresentaram níveis persistentemente elevados de PCR (dados não apresentados), demonstrando então um padrão continuado de resposta inflamatória sistêmica.

Outra explicação plausível para a diferença encontrada no padrão da resposta inflamatória em nossos pacientes é a variação na determinação genética da resposta inflamatória, como sugerido por Girndt et al (23) que demonstraram a influência do genótipo da interleucina anti-inflamatória (IL-10) nos pacientes com IRC. Nestes pacientes, o alelo -1082\* (baixa produção de IL-10) apresentava elevações mais freqüentes da resposta de fase aguda e prevalência mais alta de DCV, comparado aos pacientes com o genótipo -1082G\* (alta produção de IL-10). Berger et al (24) recentemente evidenciaram uma associação entre polimorfismos do gen da IL-1 e níveis de PCR e fibrinogênio em pacientes não renais submetidos a

angiografia coronariana. Avaliados em conjunto, estes achados sugerem um papel importante dos polimorfismos dos genes na variabilidade interindividual da resposta inflamatória, o que em parte poderia explicar os diferentes padrões de atividade inflamatória em nossos pacientes.

Este estudo confirma uma forte correlação entre as proteínas de fase aguda, PCR e fibrinogênio (7, 8, 13). Os níveis de fibrinogênio estão elevados em pacientes com insuficiência renal crônica (25) e a inflamação de placas em artérias coronárias é prevista por altos níveis de PCR e fibrinogênio (26). Porém, inesperadamente, os níveis de Alb-S não se correlacionaram com a PCR quando os 180 pacientes foram analisados no estudo atual. Apesar disto, uma forte correlação negativa foi encontrada quando as análises se limitaram ao grupo de não sobreviventes (dados não apresentados), sugerindo que a hipoalbuminemia associada com a resposta inflamatória foi um marcador para mortalidade neste grupo de pacientes em HD.

#### *Limitações do estudo*

Várias deficiências no presente estudo devem ser consideradas. Primeiro, em nossa avaliação nutricional nos baseamos no ASG. Apesar de a National Kidney Foundation Dialysis Outcome Quality Initiative (DOQI), em sua mais recente atualização, recomendar a utilização do ASG para avaliação do estado nutricional protéico-calórico (27), uma determinação isolada do ASG pode não levar em consideração qualquer variação do estado nutricional que ocorra ao longo do tempo. Segundo, a falta de estimativa da DCV como previsor da evolução clínica é outra importante preocupação adicional. No presente estudo, como uma avaliação cardiovascular completa através de métodos não-invasivos e invasivos não estava disponível em muitos pacientes, não incluímos uma análise de DCV baseada em achados clínicos. Terceiro, apesar de que muitos pacientes com infecção ativa conhecida foram excluídos do estudo durante o período pré-basal, episódios infecciosos sub-clínicos não podem ser excluídos como causadores de surtos de inflamação no grupo 2, especialmente em pacientes com apenas uma medida elevada de PCR. A resolução do processo infeccioso poderia trazer os níveis de PCR ao normal, resultando em efeito não deletério na evolução clínica. Finalmente, deve ser assinalado que os critérios de inclusão de quatro medidas consecutivas

durante o período basal de 6 meses implica numa seleção positiva de sobreviventes ao longo deste período.

Em resumo, entre estes 180 pacientes brasileiros em HD, a inflamação e a desnutrição foram complicações freqüentes e com impacto importante na sobrevida, mas não se correlacionaram uma com a outra, sugerindo que muitos dos pacientes desnutridos apresentavam desnutrição tipo 1, ou seja, não associada com inflamação (28). O estudo atual também confirma que uma determinação isolada da PCR, assim como da Alb-S, desnutrição e idade avançada são fatores previsores fortes e independentes de mortalidade nos pacientes brasileiros com IRC. No segmento longitudinal do estudo, pudemos distinguir dois grupos característicos de pacientes com níveis elevados de PCR: um grupo com níveis flutuantes e outro com atividade inflamatória persistente. Os pacientes com elevação persistente da PCR apresentaram maior taxa de mortalidade do que os pacientes com elevação ocasional da PCR; ao passo que a mortalidade no último grupo não diferiu significativamente da mortalidade no grupo não inflamado. Desta forma, a inflamação persistente, mais do que a ocasional, foi previsora da mortalidade em pacientes em HD. Estudos adicionais são necessários para melhor compreender a(s) causa(s) de atividade inflamatória persistente em pacientes com IRC.



**Agradecimentos:** Agradecemos a assistência técnica especializada da Enfermeira Ana Paula Modesto e Dr Paulo Fraxino. Durante estes estudos, Marcelo M. do Nascimento recebeu uma bolsa de estudos da CAPES, Brasil (Processo #BEX0291/02)

## Referências Bibliográficas

1. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ: Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 32: S112-119, 1998.
2. Ross R: Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126., 1999.
3. Mehrotra R, Kopple JD: Nutritional management of maintenance dialysis patients: why aren't we doing better? *Annu Rev Nutr* 21: 343-379, 2001.
4. Stenvinkel P: Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated? *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 8: 33-38, 2002.
5. Kaysen GA, Stevenson FT, Depner TA: Determinants of albumin concentration in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 29: 658-668, 1997.
6. Van Tellingen A, Grooteman MP, Schoorl M, Bartels PC, Van Der Ploeg T, Wee PM, Nube MJ: Intercurrent clinical events are predictive of plasma C-reactive protein levels in hemodialysis patients. *Kidney Int* 62: 632-638, 2002.
7. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA: C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 35: 469-476, 2000.
8. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 65: 648-658, 1999.
9. Depner TA, Daugirdas JT: Equations for normalized protein catabolic rate based on two-point modeling of hemodialysis urea kinetics. *J Am Soc Nephrol* 7: 780-785, 1996.
10. Waitzberg DL, Caiaffa WT, Correia MI: Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. *Nutrition* 17: 573-580, 2001.
11. Nascimento MM, Pecoits-Filho R, Lindholm B, Riella MC, Stenvinkel P: Inflammation, malnutrition and atherosclerosis in end-stage renal disease: a global perspective. *Blood Purif* 20: 454-458, 2002.
12. Qureshi AR, Alvestrand A, Divino-Filho JC, Gutierrez A, Heimbürger O, Lindholm B, Bergström J: Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 1: S28-36, 2002.

13. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, Diczfalussy U, Wang T, Berglund L, Jogestrand T: Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 55: 1899-1911., 1999.
14. Memoli B: Cytokine production in haemodialysis. *Blood Purif* 17: 149-158, 1999.
15. Memoli B, Postiglione L, Cianciaruso B, Bisesti V, Cimmaruta C, Marzano L, Minutolo R, Cuomo V, Guida B, Andreucci M, Rossi G: Role of different dialysis membranes in the release of interleukin-6 soluble receptor in uremic patients. *Kidney Int* 58: 417-424, 2000.
16. Pereira BJG, Shapiro L, King AJ, Falagas ME, Strom JA, Dinarello CA: Plasma levels of IL-1, TNF- $\alpha$  and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney Int* 45: 890-896, 1994.
17. Stenvinkel P, Wanner C, Metzger T, Heimbürger O, Mallamaci F, Tripepi G, Malatino L, Zoccali C: Inflammation and outcome in end-stage renal failure: does female gender constitute a survival advantage? *Kidney Int* 62: 1791-1798, 2002.
18. Mazzuchi N, Schwedt E, Fernandez JM, Cusumano AM, Ancao MS, Poblete H, Saldana-Arevalo M, Espinosa NR, Centurion C, Castillo H, Gonzalez F, Milanés CL, Infante M, Ariza M: Latin American Registry of dialysis and renal transplantation: 1993 annual dialysis data report. *Nephrol Dial Transplant* 12: 2521-2527, 1997.
19. Incidence and prevalence of ESRD. USRDS. United States Renal Data System. *Am J Kidney Dis* 30: S40-53, 1997.
20. Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S: End Stage Renal Failure in type 2 diabetes : A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis* 34: 795-808, 1999.
21. Noh H, Lee SW, Kang SW, Shin SK, Choi KH, Lee HY, Han DS: Serum C-reactive protein: a predictor of mortality in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transpl* 18: 387-394, 1998.
22. Kaysen GA, Dublin JA, Müller HG, Rosales LM, Levin NW: The acute-phase response varies with time and predicts serum albumin levels in hemodialysis patients. *Kidney Int* 58: 346-352, 2000.
23. Girndt M, Kaul H, Sester U, Ulrich C, Sester M, Georg T, Kohler H: Anti-inflammatory interleukin-10 genotype protects dialysis patients from cardiovascular events. *Kidney Int* 62: 949-955, 2002.
24. Berger P, McConnell JP, Nunn M, Kornman KS, Sorrell J, Stephenson K, Duff GW: C-reactive protein levels are influenced by common IL-1 gene variations. *Cytokine* 17: 171-174, 2002.

25. Koch M, Kutkuhn B, Grabensee B, Ritz E: Apolipoprotein A, fibrinogen, age, and a history of stroke are predictors of death in dialyzed diabetic patients: a prospective study in 412 subjects. *Nephrol Dial Transpl* 12: 2603-2611, 1997.
26. Gil M, Zarebinski M, Adamus J: Plasma fibrinogen and troponin I in acute coronary syndrome and stable angina. *Int J Cardiol* 83: 43-46, 2002.
27. Clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. K/DOQI, National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis* 35: S1-140, 2000.
28. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J: Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 15: 953-960, 2000.

**Tabela 1.** Dados clínicos e laboratoriais em 180 pacientes em hemodiálise ao final do período basal.

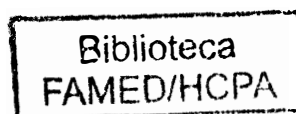
|  |                        |
|--|------------------------|
| <b>Idade (anos) <sup>a</sup></b>         | <b>49 ± 14</b>         |
| <b>Homens (%)</b>                        | <b>55</b>              |
| <b>Tempo em HD (meses) <sup>a</sup></b>  | <b>59 ± 37</b>         |
| <b>PCR (mg/l) <sup>b</sup></b>           | <b>3,6 (3,2 to 82)</b> |
| <b>Alb-S (g/dl) <sup>a</sup></b>         | <b>3,5 ± 0,3</b>       |
| <b>Fibrinogênio (mg/dl) <sup>a</sup></b> | <b>500 ± 140</b>       |
| <b>Kt/V uréia <sup>a,c</sup></b>         | <b>1,3 ± 0,2</b>       |
| <b>Desnutrição (%) <sup>d</sup></b>      | <b>62</b>              |
| <b>Diabetes mellitus (%)</b>             | <b>10</b>              |

<sup>a</sup> Valores expressados como média ± desvio padrão; <sup>b</sup> Valores expressados como mediana e intervalos; <sup>c</sup> n=159; <sup>d</sup> n= 152 (ASG B e C).

**Tabela 2.** PCR inicial versus PCR ao final do período basal (6 meses depois).

| <b>PCR<sup>a</sup></b>           | <b>PCR elevada 6 meses após</b> | <b>PCR baixa 6 meses após</b> |
|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| <b>PCR inicial alta (n =66)</b>  | 45 (68%)                        | 21 (32%)                      |
| <b>PCR inicial baixa (n=114)</b> | 28 (24%)                        | 86 (76%)                      |

<sup>a</sup> PCR >5,1 mg/l foi utilizada como valor de corte para definir inflamação.



**Tabela 3.** Comparação clínica e laboratorial de acordo com o estado nutricional basal em 159 pacientes. Desnutrição foi definida como ASG classe B ou C.

| Parâmetro                           | Desnutridos<br>(n=99) | Bem-nutridos<br>(n=60) | Valor p |
|-------------------------------------|-----------------------|------------------------|---------|
| Homens (%)                          | 51                    | 49                     | 0,4     |
| Idade (anos) <sup>a</sup>           | 51 ± 13               | 45 ± 14                | 0,02    |
| Diabetes Mellitus (%)               | 13                    | 7                      | 0,2     |
| PCR (mg/l) <sup>b</sup>             | 3,7 (3,2 to 82)       | 3,6 (3,2 to 15,6)      | 0,5     |
| Alb-S (g/dl) <sup>a</sup>           | 3,4 ± 0,3             | 3,5 ± 0,3              | 0,2     |
| Fibrinogênio (mg/dl) <sup>b</sup>   | 510 ± 130             | 480 ± 120              | 0,2     |
| Kt/V <sup>a,c</sup>                 | 1,3 ± 0,2             | 1,3 ± 0,2              | 0,5     |
| Tempo em HD<br>(meses) <sup>a</sup> | 58 ± 41               | 60 ± 32                | 0,2     |

<sup>a</sup> Valores do período basal expressos como média ± desvio padrão; <sup>b</sup> Valores do período basal expressos como mediana e intervalos; <sup>c</sup> n=129

**Tabela 4.** Dados clínicos e laboratoriais nos três grupos subdivididos de acordo com os níveis de PCR.

| Parâmetro                         | Grupo 1<br>n=74 | Grupo 2<br>n=65 | Grupo 3<br>n=41 | Valor p |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|
| Idade (anos) <sup>a</sup>         | 48 ± 12         | 46 ± 14         | 56 ± 14         | <0,001  |
| Homens (%)                        | 46              | 58              | 63              | 0,18    |
| PCR (mg/l) <sup>b</sup>           | 3,2(3,2-5,1)    | 3,6(3,2-54,9)   | 13,8(5,2-141)   | <0,001  |
| Inflamação (%) <sup>c</sup>       | 0               | 37              | 100             | <0,05   |
| Tempo em HD (meses) <sup>a</sup>  | 65 ± 39         | 54 ± 36         | 51 ± 34         | 0,09    |
| Albumina (g/dl) <sup>a</sup>      | 3,5 ± 0,3       | 3,5 ± 0,3       | 3,4 ± 0,4       | 0,42    |
| Fibrinogênio (mg/dl) <sup>a</sup> | 440 ± 120       | 520 ± 130       | 580 ± 130       | <0,001  |
| Kt/V uréia <sup>a,d</sup>         | 1,3 ± 0,2       | 1,3 ± 0,2       | 1,2 ± 0,2       | 0,06    |
| Desnutrição (%) <sup>e</sup>      | 54              | 62              | 72              | 0,27    |
| Mortalidade geral (%)             | 8               | 14              | 34              | 0,001   |
| Mortalidade taxa/ano (%)          | 4,6             | 7,9             | 19              | 0,001   |

<sup>a</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão; <sup>b</sup> Valores expressos como mediana e intervalos; <sup>c</sup> Proporção média de PCR anormalmente elevada nas 4 aferições; <sup>d</sup> n=129; <sup>e</sup> n=159 (ASG B e C)



**Tabela 5.** Análise multivariada proporcional de Cox dos fatores de risco prevendo mortalidade.

| <b>Parâmetro</b>                     | <b>Taxas de Risco ajustadas (IC 95%)</b> | <b>Valor p</b> |
|--------------------------------------|--|----------------|
| <b>Idade (por ano)</b>               | 1,05 (1,02-1,08)                         | 0,0003         |
| <b>Sexo (M versus F)</b>             | 1,01 (0,42-2,38)                         | 0,96           |
| <b>Desnutrição (ASG B e C vs. A)</b> | 3,4 (1,56-14,55)                         | 0,0004         |
| <b>Alb-S (por aumento g/dl)</b>      | 0,25 (0,09-0,72)                         | 0,01           |
| <b>PCR (por aumento mg/l)</b>        | 1,03 (1,01-1,06)                         | 0,004          |

ASG, Alb-S e PCR, avaliadas na fase basal.

**Tabela 6:** Dados clínicos e laboratoriais basais nos sobreviventes e não sobreviventes.

| Parâmetro                         | Sobreviventes<br>(n=153) | Não sobreviventes<br>(n=27) | Valor p  |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------|
| Homens (%)                        | 52                       | 62                          | 0,33     |
| Idade (anos) <sup>a</sup>         | 48 ± 14                  | 57 ± 14                     | 0,002    |
| Diabetes (%)                      | 11                       | 9                           | 0,09     |
| PCR (mg/l) <sup>b</sup>           | 3,2 (3,2 - 28,30)        | 6 (3,2 - 82)                | <0,0001  |
| Elevação da PCR (%) <sup>c</sup>  | 44                       | 88                          | <0,05    |
| Albumina (g/dl) <sup>a</sup>      | 3,5 ± 0,3                | 3,3 ± 0,5                   | 0,003    |
| Grupo 1 (%) <sup>d</sup>          | 92                       | 8                           | *0,5     |
| Grupo 2 (%) <sup>d</sup>          | 88                       | 12                          | **0,01   |
| Grupo 3 (%) <sup>d</sup>          | 65                       | 35                          | ***0,001 |
| Fibrinogênio (mg/dl) <sup>b</sup> | 491 ± 128                | 534 ± 166                   | 0,13     |
| Kt/V <sup>a,e</sup>               | 1,3 ± 0,2                | 1,1 ± 0,1                   | 0,09     |
| Tempo em HD (meses) <sup>a</sup>  | 60 ± 38                  | 50 ± 36                     | 0,17     |
| Desnutrição (%) <sup>f</sup>      | 56                       | 96                          | <0,0001  |

<sup>a</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão; <sup>b</sup> Valores expressos como mediana e intervalos; <sup>c</sup> Proporção média de PCR anormalmente elevada nas quatro aferições; <sup>d</sup> Análise da mortalidade pelo teste Qui-quadrado entre os grupos: \* 1 e 2/\*\*2 e 3/ \*\*\*1 e 3; <sup>e</sup> n=129; <sup>f</sup> n= 159 (ASG=B or C)

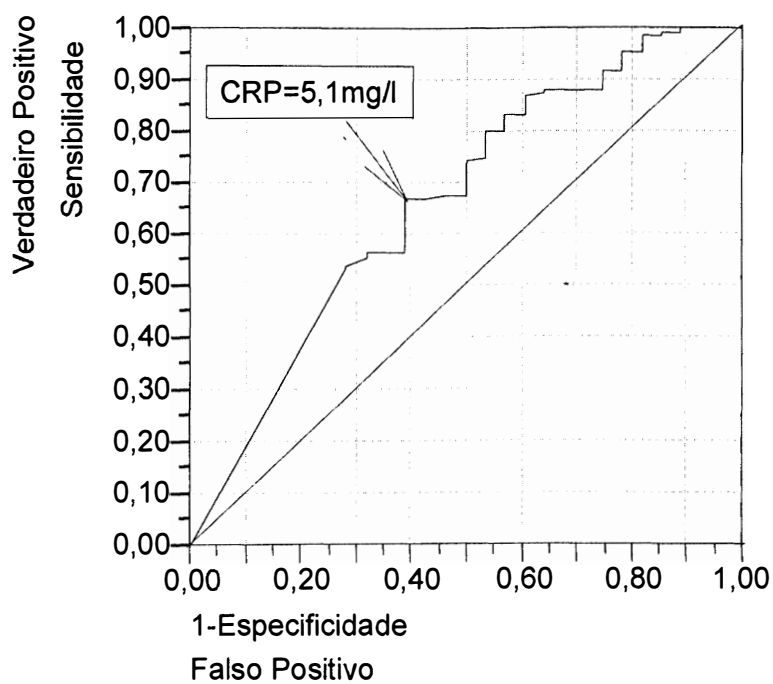
**Legendas para as figuras:**

**Figura 1.** Curva ROC para PCR como um previsor de mortalidade.

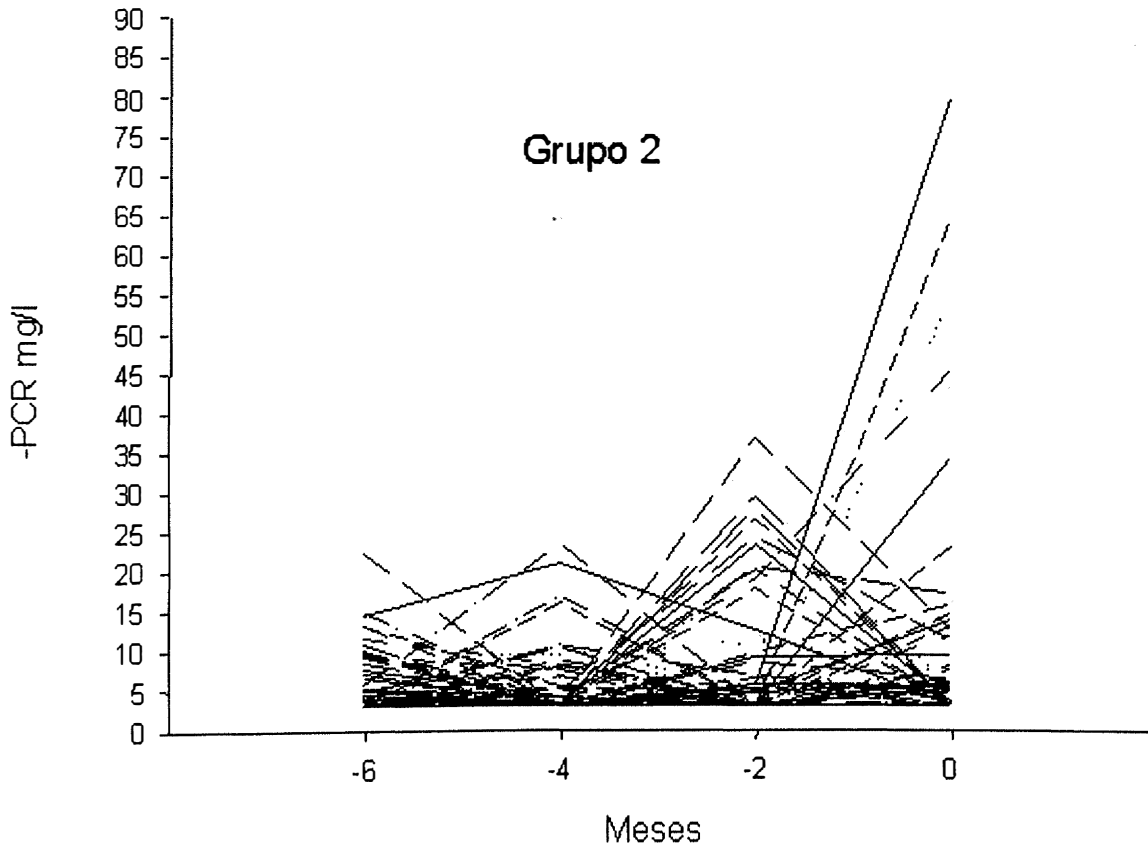
**Figura 2.** Distribuição de níveis de PCR em 65 pacientes ocasionalmente inflamados (o nível de detecção da PCR foi de 3,2 mg/l).

**Figura 3.** Sobrevida dos pacientes em relação à elevação da PCR: Grupo 1 (sem elevação), Grupo 2 (elevação ocasional) e Grupo 3 (elevação persistente).

**Figura 1:** Curva ROC para PCR como predictor de mortalidade.

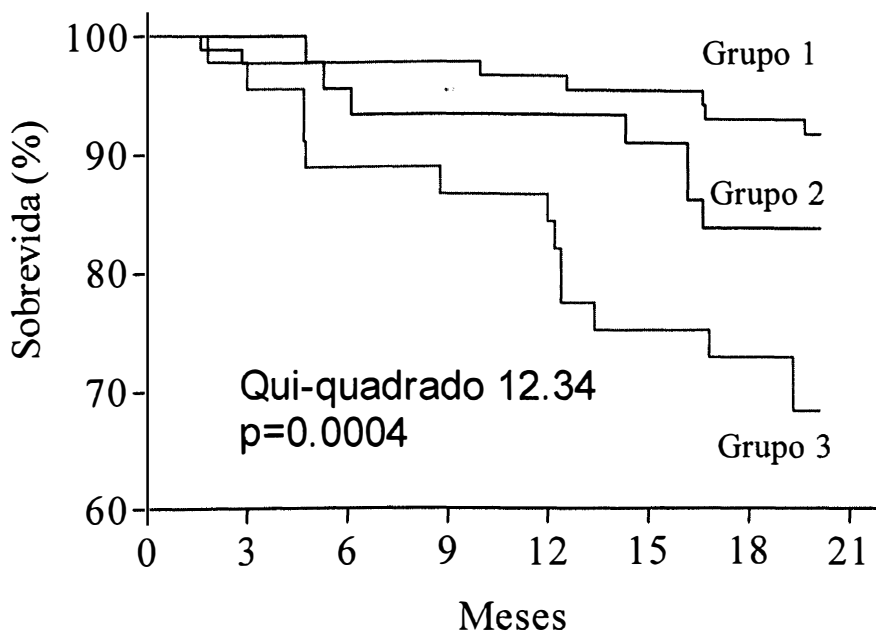


**Figura 2.** Distribuição de níveis de PCR em 65 pacientes ocasionalmente inflamados (o nível de detecção da PCR foi de 3,2 mg/l).



**Figura 3.** Sobrevida dos pacientes em relação à elevação da PCR:

Grupo 1 (sem elevação), Grupo 2 (elevação ocasional) e Grupo 3 (elevação persistente).



#### 4 PRIMEIRO ARTIGO EM INGLÊS

### **The Prognostic Impact of Fluctuating Levels of C-Reactive Protein in Brazilian Hemodialysis Patients: A Prospective Study**

Marcelo M. Nascimento <sup>1, 3, 4</sup>, Roberto Pecoits-Filho <sup>2,4</sup>, A. Rashid Qureshi <sup>4</sup>, Shirley Y. Hayashi <sup>4</sup>, Roberto C. Manfro <sup>3</sup>, Maria A. Pachaly <sup>1</sup>, Luciana Renner <sup>1</sup>, Peter Stenvinkel <sup>4</sup>, Bengt Lindholm <sup>4</sup> and Miguel C. Riella <sup>1,2</sup>

Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná-Brazil <sup>1</sup>; Division of Nephrology Pontificia Universidade Católica do Paraná-Brazil <sup>2</sup>; Post-Graduate Medical Sciences Nephrology Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Brazil <sup>3</sup>; Divisions of Renal Medicine and Baxter Novum, Department of Clinical Science, Karolinska Institutet, Huddinge University Hospital, Stockholm, Sweden <sup>4</sup>.

#### **Address for correspondence:**

Bengt Lindholm, MD, PhD

Divisions of Renal Medicine and Baxter Novum

K-56 Huddinge University Hospital.

S-141 86 Stockholm

Sweden

Tel: +46(8) 5858-2601

Fax: +46(8) 689-7730

E-mail: [bengt.lindholm@klinvet.ki.se](mailto:bengt.lindholm@klinvet.ki.se)

## Abstract

**Background:** A single elevated C-reactive protein (CRP) predicts mortality in hemodialysis (HD) patients but the relative importance of persistent versus occasional systemic inflammatory response is not known.

**Methods:** To assess the influence on survival of occasional inflammation, C-reactive protein (CRP), serum albumin (S-Alb) and fibrinogen were analysed bimonthly in 180 HD patients (54% M, 49±14 yr). Based on four consecutive measurements of CRP, patients were assigned into three groups: Group 1 (n=74; 41%), no inflammation (CRP < 5.1 mg/l in all measurements); Group 2 (n=65; 36%), occasional inflammation (1-3 measurements of CRP > 5.1 mg/l); and Group 3 (n=41; 23%), persistent inflammation (all measurements of CRP > 5.1 mg/l). The nutritional status was evaluated by SGA, and the survival (21 months of follow-up), by Kaplan Meier curve and Cox model.

**Results:** The median and range of CRP values (mg/l) for group 1, 2 and 3 were: 3.2 (3.2-5.1), 3.6 (3.2-54.9) and 13.8 (5.2-141), respectively (p<0.001). The prevalence of malnutrition did not differ significantly (p=0.27) between Group 1 (62%), Group 2 (54%) and Group 3 (72%) respectively. The survival rate by Kaplan Meier analysis was significantly different among the groups (chi-square 12.34; p=0.0004). Patients in Group 3 showed the highest mortality (34%; p=0.001), compared to Group 1 (8%) and Group 2 (14%; p=0.01) respectively, whereas no significant difference in mortality between Groups 1 and 2 was found. Age, CRP, S-Alb level and malnutrition, were independent predictors of mortality.

**Conclusion:** The results indicate that persistent, rather than occasional inflammation, predicts mortality in HD patients.



**Key Words:** hemodialysis, inflammation, malnutrition, ESRD, C-reactive protein.

**Running title:** Persistent inflammatory activity and clinical outcome

## Introduction

Despite the rapid improvement in dialysis technology, the annual mortality rate of patients with end-stage renal disease (ESRD) is many-fold higher than that of the general population. This difference is mainly due to accelerated atherosclerosis and increased mortality associated with cardiovascular disease (CVD) (1). The focus on the pathogenic mechanisms of the atherosclerotic process has been changing during the last decade, and interest in the role of inflammation in the atherosclerotic process is expanding (2). Moreover, 40% of patients undergoing maintenance dialysis suffer from varying degrees of malnutrition and a poor nutritional status is associated with inflammation, CVD, and increased mortality in patients with ESRD (3).

Cross-sectional studies based on a single determination of CRP show that about 30-50% of predialysis, hemodialysis (HD), and peritoneal dialysis (PD) patients have serologic evidence of an activated inflammatory response with elevated serum levels of C-reactive protein (CRP) (4). However, inflammation may fluctuate over time and the appearance of clinical events in dialysis patients might mainly be related to persistent rather than to occasional elevations in plasma CRP levels (5, 6). Although it is well documented that CVD mortality is significantly higher in HD patients with a single elevated CRP (7, 8), the consequences, in terms of clinical outcome of fluctuating levels of CRP have not been established. To test the hypothesis that occasional inflammatory activation has an impact on the survival of ESRD patients, we prospectively measured bimonthly CRP levels in 180 HD patients for six months. Their clinical, laboratory and nutritional status were assessed and the patients were then followed for a mean period of 21 months, during which time mortality was recorded.

## Subjects and Methods

### *Patients and study design*

All prevalent HD patients in three dialysis centres in Curitiba, in southern Brazil, were initially enrolled in the present study, which consisted of two parts. In the first part (pre-baseline), the patients underwent bimonthly assessments of inflammation for 6 months. At the end of this period the patients underwent a clinical and nutritional assessment (baseline investigation). In the second follow-up phase of

the study mortality was recorded. To be included in the second part of the study, the patients were required to have completed four consecutive measurements of CRP during the preceding 6 months. The exclusion criteria were presence of a known chronic inflammatory disease or active infection during the initial 6 months of the study. Among the 264 patients who were initially enrolled in the study, 180 (68%) patients (97 men and 83 women) met the inclusion criteria. The clinical and baseline data are shown in Table 1. The median age was 48 years (range, 16 to 89 years). The causes of renal failure were: chronic glomerulonephritis (n=63; 35%), hypertensive nephrosclerosis (n=47; 26%), diabetic nephropathy (n=20; 11%) and other causes (n=50; 28%). All patients were hemodialysed 3-4 hours three times weekly with modified cellulosic membranes (cellulose acetate or derivatized cellulose). The vast majority of the patients had native AV fistula and only 5% had vascular grafts. Medications included human recombinant erythropoietin, iron sacharate, calcium based phosphate binders, oral active vitamin D, angiotensin-conversion enzyme inhibitors whereas, anti-inflammatory drugs such as aspirin were used as antiplatelet aggregation therapy only in a few patients. Only a few patients were being treated with statins. The Ethics Committee of Hospital Evangélico de Curitiba approved the study protocol, and informed consent was obtained from all patients.

Clinically significant inflammation was defined as CRP > 5.1mg/l, based on the receiver operating characteristics (ROC) curve, which showed a threshold value of CRP>5.1 mg/l as a predictor of death (Figure 1). According to the results of the four consecutive CRP measurements during the pre-baseline period, and using the ROC cut off value for CRP, the patients were allocated into three groups: Group 1 (n=74), no inflammation (all four CRP values < 5.1mg/l); Group 2 (n=65), fluctuating inflammation (at least one CRP value > 5.1mg/l), and Group 3 (n=41), persistent inflammation (all four CRP values > 5.1mg/l).

#### *Laboratory methods*

Venous blood samples were taken prior to the initiation of the HD session and were stored on ice (4°C) and then centrifuged within 60 minutes after collection. Samples were thereafter stored at -20°C until analysis. Serum determinations of CRP (nephelometric immunoassay; only values > 3.2 mg/l were reported), serum albumin

(S-Alb) (bromocresol green method), and fibrinogen measured by the thrombin time method, with a blood sample anticoagulated with 3.8% sodium citrate) were performed bimonthly during the 6 months prior to the follow-up period. Haemoglobin and serum urea, determined by routine methods, and dialysis adequacy (Kt/V) as assessed by the Daugirdas equation (9), were analyzed at baseline.

### *Nutritional evaluation*

The subjective global assessment (SGA) was used to evaluate the nutritional status at baseline. SGA included six subjective assessments; three assessments were based on the patient's history of weight loss, incidence of anorexia and incidence of vomiting, and three based on the dietitian's grading of muscle wasting, presence of edema and loss of subcutaneous fat. On the basis of these assessments, each patient was given a ranking that reflected the nutritional status as follows: A= normal nutritional status, B= mild to moderate malnutrition and C= severe malnutrition (10). The baseline SGA was carried out at the beginning of the follow-up period and was performed by the same experienced dietitian.

### *Follow-up*

After the baseline investigation, the patients were followed prospectively for the subsequent 21 months to determine their clinical outcome. Survival was recorded from the end of the pre-baseline period of sample collection (from September 2000 to May 2002), until death (n=27) or censoring for transplantation (n=13).

### *Statistical analysis*

Data are presented as mean  $\pm$  SD. A p-value less than 0.05 was considered significant. A comparison between two groups was performed using the Student t test for normally distributed variables whereas the Mann-Whitney's U-test was used for not-normal distributed variables. Comparisons between three groups were performed using the ANOVA test. The analysis of categorical variables was made by the analysis of contingency tables. For non-normally distributed variables, correlations were performed with the Spearman rank test. The Kaplan Meier test was used for analysis of survival. Cox proportional hazard analysis was used to assess independent predictors of survival. The cut-off point for CRP, as predictor of death, reached a sensitivity and specificity of 63% and 67.3% respectively according to the

ROC curve (Fig. 1). The area under the ROC curve was 0.696, standard error 0.002, and the 95% confidence interval 0.564 to 0.795.

## Results

### *Clinical data*

The clinical data and serum concentrations of CRP, S-Alb and fibrinogen for the 180 patients are summarized in Table 1. Malnutrition (SGA, ranking B to C) was present in 99 (62%) patients of the 159 patients investigated; 85 (53%) patients were mildly malnourished, and 14 (8%) patients were severely malnourished. The mean values of CRP, S-Alb and fibrinogen at the baseline investigation were respectively: 7.3 mg/l (range, 3.2 - 82 mg/l),  $3.5 \pm 0.3$  g/dl, and  $500 \pm 140$  mg/dl. An increased CRP level (defined as CRP  $>5.1$  mg/l) was found in 66 (37%) patients at the first available measurement during the pre-baseline period, and 106 (59%) patients had an elevated CRP level at least once during the pre-baseline 6 months period. In 37% of the patients CRP level was elevated in all four measurements. Among the 66 patients who had an elevated initial CRP, 45 (68%) persisted with CRP  $>5.1$  mg/l at the final measurement (Table 2). In addition, at pre-baseline period 45 (24%) patients either had signs of inflammation or malnutrition.

At baseline, correlation was found between CRP and fibrinogen (Rho = 0.43,  $p < 0.001$ ), but unexpectedly, not between CRP and S-Alb (Rho = -0.11;  $p = 0.15$ ), fibrinogen and S-Alb (Rho = 0.04;  $p = 0.6$ ) or CRP and age (Rho = 0.08;  $p = 0.28$ ). A significant correlation was found between malnutrition and age (Rho = 0.18;  $p = 0.002$ ). Malnourished patients were significantly older ( $51 \pm 13$  vs.  $46 \pm 15$  years;  $p = 0.02$ ) compared to well-nourished patients. Otherwise the malnourished patients did not differ significantly from the well-nourished patients with regard to a variety of biochemical parameters including, S-Alb ( $3.5 \pm 0.3$  vs.  $3.4 \pm 0.3$  g/dl;  $p = 0.15$ ); fibrinogen ( $507 \pm 138$  vs.  $480 \pm 170$  mg/dl,  $p = 0.24$ ) and CRP ( $4.3 [3.2 - 80.7]$  vs.  $5.1 [3.2 - 37]$  mg/l,  $p = 0.54$ ), respectively (Table 3).

### *Comparisons between the three CRP groups*

The clinical characteristics of the three groups are given in Table 4. The individual values of CRP in Group 2 are presented in Figure 2. The 65 patients in Group 2 had an elevated CRP at one (31 patients), two (25 patients) or three (9

patients) determinations. Whereas S-alb levels did not differ significantly among the three groups, patients in Group 3 had significantly ( $p < 0.001$ ) higher levels of fibrinogen ( $570 \pm 130$  mg/dl) when compared to patients in Group 1 ( $430 \pm 120$  mg/dl) and Group 2 ( $510 \pm 120$  mg/dl). Surprisingly, the prevalence of malnutrition did not differ significantly among the three groups. Although patients in Group 3 had lower levels of Kt/V ( $1.2 \pm 0.2$ ), compared with patients in Group 1 ( $1.36 \pm 0.2$ ) and Group 2 ( $1.36 \pm 0.2$ ) this difference did not attain full statistical significance ( $p = 0.06$ ). The overall mortality was significantly higher in Group 3 (34%) compared to Group 1 (8%) and Group 2 (14%) ( $p = 0.001$ ). When analysed separately there were no significant differences in mortality between Group 1 and 2 (Chi-Square = 0.67,  $p = 0.5$ ), but significantly higher mortality in Group 3 compared with Group 2 (Chi-Square = 7.1,  $p = 0.01$ ) and between group 3 and group 1 (Chi-Square = 11.97,  $p = 0.0007$ ).

### *Survival analysis*

During the follow-up 27 patients died (8%, 14% and 34% for group 1, 2 and 3, respectively). The causes of death were CVD (52%), infection (30%) or other causes (18%). The survival in the patients in group 1, 2 and 3 is shown in Fig. 3. According to the Kaplan Meier analysis for the overall population, the survival rate was significantly different among the groups (chi-square 12.34,  $p = 0.0004$ ). Patients in group 3 had the highest overall mortality (34%;  $p = 0.001$ ) compared to Group 1 (mortality 8%) and Group 2 (mortality 14%) respectively, whereas there was no difference in mortality between Group 1 and Group 2. The Cox proportional hazard model was applied to the overall study population to adjust event free times for age, malnutrition, CRP, S-Alb and gender (Table 5). The Cox analysis showed that malnutrition, age, S-Alb and CRP were independently associated with mortality. On the other hand, gender was not an independent predictor of mortality in the Cox analysis.

The clinical data on the survivors and non-survivors are shown in Table 6. Compared with survivors, non-survivors had a higher median level of CRP ( $6.2$  [ $3.2 - 82$ ] mg/l vs.  $3.2$  [ $3.2 - 28.30$ ] mg/l ( $p < 0.0001$ ), lower levels of S-alb ( $3.3 \pm 0.5$  vs.  $3.5 \pm 0.3$  g/dl) ( $p = 0.003$ ), and were older ( $57 \pm 14$  vs.  $48 \pm 14$  years) ( $p = 0.002$ ), respectively. Almost all non-survivors were malnourished (96%), whereas the prevalence of malnutrition in survivors was 56%.

## Discussion

The main finding of the present study was that the 23% of HD patients, who had persistently elevated plasma levels of CRP had a poorer clinical outcome compared to HD patients who had occasional elevations (36% of patients) or low plasma levels (41% of patients) of CRP. Thus, persistent rather than occasional inflammation was a powerful predictor of death. In addition, 62% of the patients were malnourished, and malnutrition was also a strong predictor of mortality. However, in contrast to several previous studies, from Europe and North America, the correlations between inflammatory markers and nutritional status were weak, suggesting that inflammation was not a strong determinant of nutritional status in the present study. The high prevalence of inflammation in this Brazilian HD cohort, confirms that inflammation is an important clinical feature in ESRD patients, regardless geographical origin (11).

It is now well recognized that there are strong relationships between malnutrition, inflammation and CVD in ESRD patients (7, 8, 12, 13). The malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA) syndrome is associated with a high mortality, and in this syndrome, inflammation appears to have a crucial role (13). Although the origin of inflammation in ESRD patients is often unclear, chronic bacterial or viral infection, loss of residual renal function, uremia per se, and in HD patients, the influence of the dialysis procedure are thought to be important factors (14-17). In the present study, we found that 59 % of our patients, who had no signs of clinically apparent infection, had an elevated level of CRP (CRP>5.1 mg/l) at one or more occasions during the initial 6 months of the pre-baseline period confirming that ESRD is a chronic inflammatory state. A recent study on a large cohort of European (17) ESRD patients, showed that a CRP value above of 3.4 mg/l was a predictor of death.

When comparing the present data to previous European and North American studies, several important differences should be considered. At first, in our study, chronic glomerulonephritis and hypertensive nephrosclerosis were the most common causes of ESRD, which is in agreement with data from the Latin American Registry (18). At the second, in contrast with North American and European studies in which the prevalence of diabetic nephropathy in HD is higher, the prevalence of diabetic



nephropathy was only 9 % in the present study. This might be explained by the fact that most of the diabetic patients in our clinic are being treated by PD. Another important fact to consider is that the mean age was considerably lower compared to European and North American dialysis patients (19,20). Finally, a higher prevalence of malnutrition (62%, as assessed by SGA) was found in the present study compared to previous studies from North America and Europe where usually fewer than 50% of patients undergoing dialysis suffer from varying degrees of protein energy malnutrition (11). The poor correlations between inflammation biomarkers and the nutritional status may indicate that malnutrition, to a larger extent, might be explained by poor nutritional intake in the Brazilian HD patients.

Most of the studies analysing the inflammatory profile and malnutrition in ESRD patients are from industrialized Western and Asian countries whereas in other countries the real estimation of the MIA syndrome remains unclear (11). The prevalence of malnutrition in our population (62%) was similar to that reported previously from Sweden (12) but is higher than the prevalence in several other studies, especially in Asian patients in whom malnutrition as well as inflammation may be less common. Noh et al (21) found that 12% of 106 patients on PD in Korea had signs of inflammation, and even in this group the prevalence of malnutrition was only 30.8%. These divergent findings might be explained by differences in socio-economic, nutritional and genetic factors between different populations.

### *Inflammation and mortality*

The acute phase response usually varies over the time in dialysis patients, suggesting that a transitory process, such as infections, is often responsible for activation of the inflammatory response (22). When we analysed the variation of CRP levels in our patients, we could identify a group of patients in whom the levels of CRP fluctuated between normal and abnormal values (Group 2). From a clinical point of view, it is important to understand the implications of the inflammatory response of patients in Group 2 who sometimes presented with CRP levels within the limits of normality. These patients had according to the Kaplan Meier analysis a better survival rate compared with the persistently inflamed patients in Group 3.

One possibility that might explain the poor survival in Group 3 is that this group may have had more co-morbid conditions compared with the other two groups, and they had higher levels of fibrinogen, a higher prevalence of malnutrition and they were older compared to the other two groups. We have previously shown that the mortality rate increases progressively with an increasing number of risk factors (malnutrition, inflammation and CVD), being as high as 75% after 3 years in patients who have all these three risk factors (18). In this study, we could confirm that age, S-Alb, CRP and malnutrition were independent predictors of mortality. Similarly, Zimmermann et al (8) and Yeun et al (7) found that CRP and age were the most important factors in predicting CVD mortality among European and North American HD patients. The difference in mortality between Group 2 and Group 3, in the present study, could also be related to the fact that patients from Group 2 were younger and presented with on average lower levels of CRP, reflecting a lower degree of persistent inflammatory activity. It is notable that patients from Group 3, also during the follow-up period, presented with persistently higher levels of CRP (data not shown), thus demonstrating a continual pattern of a systemic inflammatory response.

Another plausible explanation for the difference in the pattern of the inflammatory response found in our patients is the variation in the genetic determination of the inflammatory response, as suggested by Girndt et al (23) who demonstrated the influence of the anti-inflammatory interleukin (IL-10) genotype in ESRD patients. In these patients, the -1082\* allele (low IL-10 production) had more frequent elevations of the acute phase response and a higher prevalence of CVD, compared to patients with the -1082G\* genotype (high IL-10 production). Berger et al (24) recently showed an association between IL-1 gene polymorphisms and levels of CRP and fibrinogen in non-renal patients submitted to coronary angiography. Taken together, these findings suggest an important role of gene polymorphisms in the interindividual variability of the inflammatory response, which to some extent might explain the different patterns of inflammatory activity in our patients.

This study confirms strong correlations between the acute phase proteins, CRP and fibrinogen (7, 8, 13). Fibrinogen levels are elevated in patients with chronic renal failure (25) and inflammation of coronary artery plaques is predicted by high values of CRP and fibrinogen (26). However, surprisingly, S-alb levels were not

associated with CRP when all 180 patients were analyzed in the present study. Nevertheless, a strong negative correlation was found when the analysis was limited to the nonsurvival group (data not shown), suggesting that hypoalbuminemia associated with systemic inflammation was a marker for mortality in this cohort of HD patients.

### *Limitations of the study*

Several shortcomings of the present study should be considered. First, in our nutritional evaluation we relied on SGA. Although the National Kidney Foundation Dialysis Outcome Quality Initiative (DOQI) recommends the use of SGA in its most recent update for the evaluation of protein-energy nutritional status (27), a single determination of SGA cannot take into account any variation of the nutritional state that occurred over time. At second, the lack of assessment of CVD as a predictor of clinical outcome is another relevant concern. In the present study, as a complete cardiovascular evaluation through invasive or non-invasive investigations was not available in most patients, we did not include an analysis of CVD based on clinical findings. Third, although all patients with known active infection were excluded from the study during the pre-baseline period, subclinical infectious episodes can still not be ruled out as causing the bursts of inflammation in Group 2, especially in patients with only one elevated measurement of CRP. The resolution of the infectious process could bring the levels of CRP back to normal, resulting in no harmful effect on clinical outcome. Finally, it should be noted that the inclusion criteria of four consecutive assessments during the 6-month baseline period implies a positive selection of the survivors during this period.

In summary, among these 180 Brazilian HD patients, inflammation and malnutrition were common complications that predicted survival, but did not correlate with each other, suggesting that many of the malnourished patients had malnutrition type 1, i.e. not associated with inflammation (28). The present study also confirms that a single determination of CRP as well as of serum albumin, malnutrition and advanced age are independent and strong predictors of mortality in Brazilian ESRD patients. In the longitudinal part of the study, we could distinguish two characteristic

groups of patients with elevated levels of CRP: one group with fluctuating levels and another one with persistent inflammatory activity. The patients with a persistent elevation of CRP had a higher mortality rate than the patient with occasional CRP elevation, whereas the mortality in the latter group did not differ significantly from the mortality in the non-inflamed patient. Thus, persistent, rather than occasional, inflammation predicts mortality in HD patients. Further studies are needed to better understand the cause(s) of a persistent inflammatory response in ESRD patients.

**Acknowledgements:** We acknowledge the skilled technical assistance of Ms Ana Paula Modesto, and Dr Paulo Fraxino. During these studies, Marcelo M. Nascimento was the recipient of a scholarship from Capes, Brazil (Process #BEX0291/02)

## References

1. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ: Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 32: S112-119, 1998.
2. Ross R: Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126., 1999.
3. Mehrotra R, Kopple JD: Nutritional management of maintenance dialysis patients: why aren't we doing better? *Annu Rev Nutr* 21: 343-379, 2001.
4. Stenvinkel P: Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated? *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 8: 33-38, 2002.
5. Kaysen GA, Stevenson FT, Depner TA: Determinants of albumin concentration in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 29: 658-668, 1997.
6. Van Tellingen A, Grooteman MP, Schoorl M, Bartels PC, Van Der Ploeg T, Wee PM, Nube MJ: Intercurrent clinical events are predictive of plasma C-reactive protein levels in hemodialysis patients. *Kidney Int* 62: 632-638, 2002.
7. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA: C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 35: 469-476, 2000.
8. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 65: 648-658, 1999.
9. Depner TA, Daugirdas JT: Equations for normalized protein catabolic rate based on two-point modeling of hemodialysis urea kinetics. *J Am Soc Nephrol* 7: 780-785, 1996.
10. Waitzberg DL, Caiaffa WT, Correia MI: Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. *Nutrition* 17: 573-580, 2001.
11. Nascimento MM, Pecoits-Filho R, Lindholm B, Riella MC, Stenvinkel P: Inflammation, malnutrition and atherosclerosis in end-stage renal disease: a global perspective. *Blood Purif* 20: 454-458, 2002.
12. Qureshi AR, Alvestrand A, Divino-Filho JC, Gutierrez A, Heimbürger O, Lindholm B, Bergstrom J: Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 1: S28-36, 2002.

13. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulträ F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, Jogestrand T: Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 55: 1899-1911., 1999.
14. Memoli B: Cytokine production in haemodialysis. *Blood Purif* 17: 149-158, 1999.
15. Memoli B, Postiglione L, Cianciaruso B, Bisesti V, Cimmaruta C, Marzano L, Minutolo R, Cuomo V, Guida B, Andreucci M, Rossi G: Role of different dialysis membranes in the release of interleukin-6 soluble receptor in uremic patients. *Kidney Int* 58: 417-424, 2000.
16. Pereira BJG, Shapiro L, King AJ, Falagas ME, Strom JA, Dinarello CA: Plasma levels of IL-1, TNF- $\alpha$  and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney Int* 45: 890-896, 1994.
17. Stenvinkel P, Wanner C, Metzger T, Heimbürger O, Mallamaci F, Tripepi G, Malatino L, Zoccali C: Inflammation and outcome in end-stage renal failure: does female gender constitute a survival advantage? *Kidney Int* 62: 1791-1798, 2002.
18. Mazzuchi N, Schwedt E, Fernandez JM, Cusumano AM, Ancao MS, Poblete H, Saldana-Arevalo M, Espinosa NR, Centurion C, Castillo H, Gonzalez F, Milanes CL, Infante M, Ariza M: Latin American Registry of dialysis and renal transplantation: 1993 annual dialysis data report. *Nephrol Dial Transplant* 12: 2521-2527, 1997.
19. Incidence and prevalence of ESRD. *USRDS. United States Renal Data System. Am J Kidney Dis* 30: S40-53, 1997.
20. Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S: End Stage Renal Failure in type 2 diabetes : A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis* 34: 795-808, 1999.
21. Noh H, Lee SW, Kang SW, Shin SK, Choi KH, Lee HY, Han DS: Serum C-reactive protein: a predictor of mortality in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transpl* 18: 387-394, 1998.
22. Kaysen GA, Dublin JA, Müller HG, Rosales LM, Levin NW: The acute-phase response varies with time and predicts serum albumin levels in hemodialysis patients. *Kidney Int* 58: 346-352, 2000.
23. Girndt M, Kaul H, Sester U, Ulrich C, Sester M, Georg T, Kohler H: Anti-inflammatory interleukin-10 genotype protects dialysis patients from cardiovascular events. *Kidney Int* 62: 949-955, 2002.

24. Berger P, McConnell JP, Nunn M, Kornman KS, Sorrell J, Stephenson K, Duff GW: C-reactive protein levels are influenced by common IL-1 gene variations. *Cytokine* 17: 171-174, 2002.
25. Koch M, Kutkuhn B, Grabensee B, Ritz E: Apolipoprotein A, fibrinogen, age, and a history of stroke are predictors of death in dialyzed diabetic patients: a prospective study in 412 subjects. *Nephrol Dial Transpl* 12: 2603-2611, 1997.
26. Gil M, Zarebinski M, Adamus J: Plasma fibrinogen and troponin I in acute coronary syndrome and stable angina. *Int J Cardiol* 83: 43-46, 2002.
27. Clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. K/DOQI, National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis* 35: S1-140, 2000.
28. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J: Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 15: 953-960, 2000.



**Table 1.** Clinical and laboratory data in 180 hemodialysis patients at the end of the baseline period..

|   |                 |
|---|-----------------|
| <b>Age (years) <sup>a</sup></b>         | 49 ± 14         |
| <b>Males (%)</b>                        | 55              |
| <b>Time on HD (months) <sup>a</sup></b> | 59 ± 37         |
| <b>CRP (mg/l) <sup>b</sup></b>          | 3.6 (3.2 to 82) |
| <b>S-Albumin (g/dl) <sup>a</sup></b>    | 3.5±0.3         |
| <b>Fibrinogen (mg/dl) <sup>a</sup></b>  | 500 ± 140       |
| <b>Kt/V urea <sup>a,c</sup></b>         | 1.3 ± 0.2       |
| <b>Malnutrition (%) <sup>d</sup></b>    | 62              |
| <b>Diabetes mellitus (%)</b>            | 9               |

<sup>a</sup> Values expressed as means ± SD; <sup>b</sup> Values expressed as median and range; <sup>c</sup> n=129; <sup>d</sup> n= 159 (SGA B and C).

**Table 2.** Initial CRP versus CRP at the end of the baseline period (6 months later)

| <b>CRP<sup>a</sup></b>          | <b>High CRP 6 months later</b> | <b>Low CRP 6 months later</b> |
|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <b>Initial high CRP (n =66)</b> | 45 (68%)                       | 21 (32%)                      |
| <b>Initial low CRP (n=114)</b>  | 28 (24%)                       | 86 (76%)                      |

<sup>a</sup> CRP >5.1\_mg/l was used as cut-off value to define inflammation.

**Table 3.** Clinical and laboratory comparison according to baseline nutritional status in 159 patients. Malnutrition was defined as SGA category B or C.

| <b>Parameter</b>                       | <b>Malnourished<br/>(n=99)</b> | <b>Well-nourished<br/>(n=60)</b> | <b>p value</b> |
|--|--------------------------------|----------------------------------|----------------|
| <b>Males (%)</b>                       | 51                             | 49                               | 0.4            |
| <b>Age (years)<sup>a</sup></b>         | 51 ± 13                        | 45 ± 14                          | 0.02           |
| <b>Diabetes Mellitus (%)</b>           | 13                             | 7                                | 0.2            |
| <b>CRP (mg/l)<sup>b</sup></b>          | 3.7 (3.2 to 82)                | 3.6 (3.2 to 15.6)                | 0.5            |
| <b>S-Albumin (g/dl)<sup>a</sup></b>    | 3.4 ± 0.3                      | 3.5 ± 0.3                        | 0.2            |
| <b>Fibrinogen (mg/dl)<sup>b</sup></b>  | 510 ± 130                      | 480 ± 120                        | 0.2            |
| <b>KtV<sup>a,c</sup></b>               | 1.3 ± 0.2                      | 1.3 ± 0.2                        | 0.5            |
| <b>Time on HD (months)<sup>a</sup></b> | 58 ± 41                        | 60 ± 32                          | 0.2            |

<sup>a</sup> Values at baseline expressed as mean ± SD; <sup>b</sup> Values at baseline expressed as median and range; <sup>c</sup> n=129

**Table 4.** Clinical and laboratory data in the three groups subdivided according to CRP levels

| Parameter                       | Group 1<br>n=74 | Group 2<br>n=65 | Group 3<br>n=41 | p value |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|
| Age (years) <sup>a</sup>        | 48 ± 12         | 46 ± 14         | 56 ± 14         | <0.001  |
| Males (%)                       | 46              | 58              | 63              | 0.18    |
| CRP (mg/l) <sup>b</sup>         | 3.2 (3.2-5.1)   | 3.6 (3.2-54.9)  | 13.8 (5.2-141)  | <0.001  |
| Inflammation (%) <sup>c</sup>   | 0               | 37              | 100             | <0.05   |
| Time on HD (month) <sup>a</sup> | 65 ± 39         | 54 ± 36         | 51 ± 34         | 0.09    |
| Albumin (g/dl) <sup>a</sup>     | 3.5 ± 0.3       | 3.5 ± 0.3       | 3.4 ± 0.4       | 0.42    |
| Fibrinogen (mg/dl) <sup>a</sup> | 440 ± 120       | 520 ± 130       | 580 ± 130       | <0.001  |
| Kt/V urea <sup>a,d</sup>        | 1.3 ± 0.2       | 1.3 ± 0.2       | 1.2 ± 0.2       | 0.06    |
| Malnutrition (%) <sup>e</sup>   | 54              | 62              | 72              | 0.27    |
| Overall mortality (%)           | 8               | 14              | 34              | 0.001   |
| Mortality rate/year (%)         | 4.6             | 7.9             | 19              | 0.001   |

<sup>a</sup> Values expressed as means; <sup>b</sup> Values are expressed as median and range; <sup>c</sup> Mean proportion of abnormally elevated CRP in the four measurements.; <sup>d</sup> n=129; <sup>e</sup> n=159 (SGA B and C);

**Table 5.** Cox proportional hazards multivariate analysis of factors predicting

| <b>Parameter</b>                                     | <b>Adjusted<br/>Hazard Ratios<br/>(95% CI)</b> | <b>p-value</b> |
|--|--|----------------|
| <b>Age ( per year)</b>                               | 1.05 (1.02-1.08)                               | 0.0003         |
| <b>Gender (M versus F)</b>                           | 1.01 (0.42-2.38)                               | 0.96           |
| <b>Malnutrition (SGA B and C vs. A) <sup>a</sup></b> | 3.4 (1.56-14.55)                               | 0.0004         |
| <b>S-Albumin ( per g/dl increase ) <sup>a</sup></b>  | 0.25 (0.09-0.72)                               | 0.01           |
| <b>CRP (per mg/l increase) <sup>a</sup></b>          | 1.03 (1.01-1.06)                               | 0.004          |

mortality.

<sup>a</sup> SGA, S-Alb and CRP, were assessed at baseline.

**Table 6.** Baseline clinical and laboratory data in survivors and non-survivors

| Parameter                                  | Survivors<br>(n=153) | Nonsurvivors<br>(n=27) | p value  |
|--|----------------------|------------------------|----------|
| <b>Males (%)</b>                           | 52                   | 62                     | 0.33     |
| <b>Age (years)<sup>a</sup></b>             | 48 ± 14              | 57 ± 14                | 0.002    |
| <b>Diabetes (%)</b>                        | 11                   | 9                      | 0.09     |
| <b>CRP (mg/l)<sup>b</sup></b>              | 3.2 (3.2 to 28.30)   | 6 (3.2 to 82)          | <0.0001  |
| <b>CRP elevation (%)<sup>c</sup></b>       | 44                   | 88                     | <0.05    |
| <b>S-Alb (g/dl)<sup>a</sup></b>            | 3.5 ± 0.3            | 3.3 ± 0.5              | 0.003    |
| <b>Group 1 (%)<sup>d</sup></b>             | 92                   | 8                      | *0.5     |
| <b>Group 2 (%)<sup>d</sup></b>             | 88                   | 12                     | **0.01   |
| <b>Group 3 (%)<sup>d</sup></b>             | 65                   | 35                     | ***0.001 |
| <b>Fibrinogen (mg/dl)<sup>b</sup></b>      | 491 ± 128            | 534 ± 166              | 0.13     |
| <b>KtV<sup>a,e</sup></b>                   | 1.3 ± 0.2            | 1.1 ± 0.1              | 0.09     |
| <b>Time on HD<br/>(months)<sup>a</sup></b> | 60 ± 38              | 50 ± 36                | 0.17     |
| <b>Malnutrition (%)<sup>f</sup></b>        | 56                   | 96                     | <0.0001  |

<sup>a</sup> Values expressed as mean ± SD; <sup>b</sup> Values expressed as median and range; <sup>c</sup> Mean proportion of abnormal elevated CRP in the four measurements; <sup>d</sup> Analysis of mortality by Chi-square tests between groups: \* 1 and 2/\*\*2 and 3/\*\*\*1 and 3; <sup>e</sup> n=129; <sup>f</sup> n= 159 (SGA=B or C)

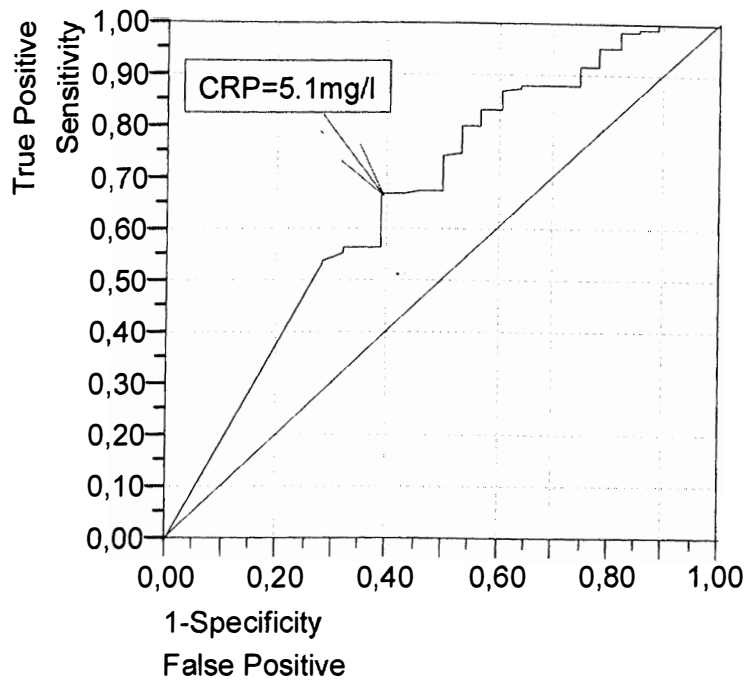
**Legends to figures:**

**Figure 1.** Receiver operating characteristics (ROC) curve for CRP as a predictor of death.

**Figure 2.** Distribution of CRP levels in 65 occasionally inflamed patients (the detection level of CRP was 3.2 mg/l).

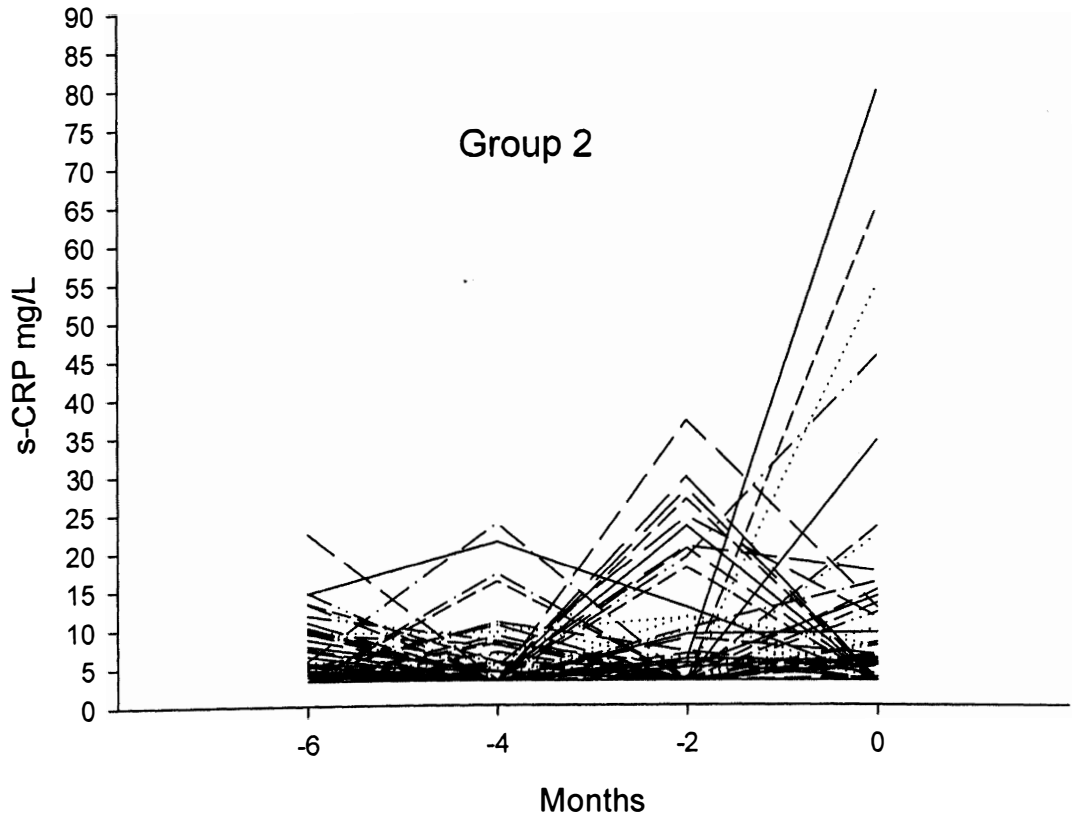
**Figure 3.** Survival of patients with no (Group 1), occasional (Group 2) and persistent (Group 3) elevation of serum CRP.

**Figure 1.** Receiver operating characteristics (ROC) curve for CRP as a predictor of death.

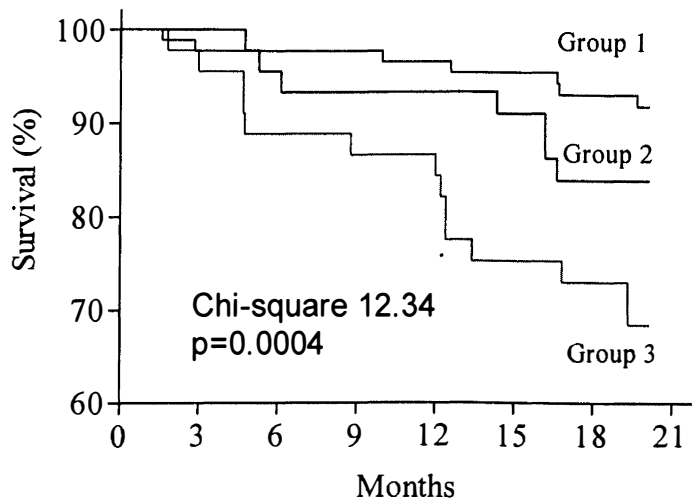




**Figure 2.** Distribution of CRP levels in 65 occasionally inflamed patients (the detection level of CRP was 3.5mg/l).



**Figure 3.** Survival of patients with no (Group 1), occasional (Group 2) and persistent (Group 3) elevation of serum CRP.



## 5 SEGUNDO ARTIGO EM PORTUGUÊS

### **Influência da hepatite C e reposição de ferro nos níveis plasmáticos de pentosidina em pacientes em hemodiálise.**

Marcelo M. Nascimento <sup>1, 3, 4</sup>, Mohamed E. Suliman<sup>4</sup>, Annette Bruchfeld <sup>4</sup>, Shirley Y. Hayashi<sup>4</sup>, Roberto C. Manfro <sup>3</sup>, Roberto Pecoits-Filho <sup>2,4</sup>, Maria A. Pachaly <sup>1</sup>, Luciana Renner <sup>1</sup>, Peter Stenvinkel <sup>4</sup>, Miguel C. Riella <sup>1,2</sup> and Bengt Lindholm<sup>4</sup>

Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná-Brasil <sup>1</sup>; Pontifícia Universidade Católica do Paraná-Brasil <sup>2</sup>; Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brasil <sup>3</sup>; Divisões de Medicina Renal e Baxter Novum, Departamento de Ciências Clínicas, Instituto Karolinska, Hospital Universitário Huddinge, Estocolmo, Suécia <sup>4</sup>.

#### **Endereço para correspondência:**

Bengt Lindholm, MD, PhD

Baxter Novum and Renal Medicine

Department of Clinical Science

Karolinska Institutet

K-56 Huddinge University Hospital.

S-141 86 Stockholm

Sweden

Tel: +46(8) 58582601

Fax: +46(8) 6897730

E-mail: [bengt.lindholm@klinvet.ki.se](mailto:bengt.lindholm@klinvet.ki.se)

## Resumo

**Introdução:** A doença hepática crônica e terapia intravenosa com ferro (TIVF) podem aumentar o estresse oxidativo (EO). O objetivo deste estudo foi verificar a influência da hepatite C (HCV) e TIVF no EO em pacientes em hemodiálise (HD).

**Métodos:** Um total de 115 pacientes em HD (47% masculinos, idade  $47 \pm 13$  anos) foram alocados em dois grupos de acordo com a presença (HCV+) ou ausência (HCV-) dos anticorpos séricos contra HCV. Os níveis de pentosidina plasmática, PCR de ultra-sensível (PCRas), interleucina-6 (IL-6) e alanina aminotransferase (ALT) foram medidos. Os pacientes também foram analisados de acordo com os tercís dos níveis séricos de ferritina: Grupo 1 (ferritina  $< 380$  ng/ml), Grupo 2 (ferritina 380-750ng/ml) e Grupo 3 (ferritina  $> 750$ ng/ml). A dose cumulativa de ferro foi registrada durante os 6 meses que antecederam o estudo.

**Resultados:** Pacientes HCV + apresentaram níveis medianos de pentosidina plasmática e ALT (média  $\pm$  desvio padrão) mais elevados que os pacientes HCV - (104.5 intervalos de 13.3-230.5 vs. 87.4, intervalos 25.6-183.7pmol/mg) e ( $30 \pm 21$  vs.  $20 \pm 24$ UI/l). Idade, sexo, albumina sérica (Alb-S), IL-6 e PCR não diferiram de acordo com a sorologia HCV. Os pacientes com níveis mais elevados de ferritina (Grupo 3) apresentaram níveis medianos mais elevados de pentosidina (pmol/mg) e de dose cumulativa de ferro (média  $\pm$  desvio padrão) em mg/últimos seis meses (106, intervalos, 27-230) ( $900 \pm 474$ ) comparados aos pacientes do Grupo 1 da ferritina (99, intervalos 43-175) ( $745 \pm 478$ ;  $p < 0,05$ ) e Grupo 2 da ferritina (79, intervalos 13-177) ( $694 \pm 532$ ;  $p < 0,05$ ). A pentosidina plasmática apresentou correlação positiva com a idade ( $Rho = 0.18$ ;  $p = 0.05$ ), HCV ( $Rho = 0.19$ ;  $p = 0.03$ ) e ferritina ( $Rho = 0.19$ ;  $p = 0.03$ ). Além disso, houve correlações significativas entre ferritina e hematócrito ( $Rho = 0.22$ ;  $p < 0.01$ ) e a dose cumulativa de ferro ( $Rho = 0.19$ ;  $p = 0.03$ ).

**Conclusão:** a combinação de hepatite C e TIVF, resultando em sobrecarga de ferro, pode intensificar o EO nos pacientes em HD.

**Palavras-chave:** Hepatite C, ferritina, hemodiálise, estresse oxidativo, pentosidina.

**Título de cabeçalho:** Pentosidina elevada em pacientes em hemodiálise com HCV e hiperferritinemia.

## Introdução

A principal causa de mortalidade em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) é a doença cardiovascular (DCV) [1]. A presença de inflamação e estresse oxidativo (EO) pode contribuir para a DCV em pacientes com IRC. Além disso, na uremia, estão elevados os níveis de produtos finais da glicação avançada (PFGAs), os quais podem promover aterosclerose [2]. Os PFGAs constituem uma classe heterogênea de substâncias, tais como a pentosidina, N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina e imidazol, que são formadas por reações de glicação não enzimática e oxidação entre compostos carbonil derivados de carboidratos e proteínas e grupos amino (reação de Maillard) [3]. O acúmulo de PFGAs em pacientes com IRC parece ser independente da glicose sérica, mas é associado com inflamação, EO, desnutrição e função renal residual reduzida [4].

Hepatite C, que infecta 170 milhões de pessoas no mundo todo, não é uma condição incomum nos pacientes brasileiros em hemodiálise (HD). A prevalência de anticorpos anti-HCV é alta nos centros brasileiros de HD (variação, 20% a 50%) [5, 6]. O EO aumentado é uma característica comum da doença hepática crônica [7] e em pacientes com infecção pelo HCV foram evidenciados níveis elevados de marcadores da peroxidação de lipídios no fígado, no soro e em leucócitos [8].

A anemia dos pacientes com IRC é geralmente tratada pela administração de eritropoietina (EPO) subcutânea e ferro intravenoso. Recentemente, foi sugerido que a TIVF pudesse estar associada com um aumento da mortalidade e morbidade em pacientes em HD [9]. Além disso, o ferro aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando à peroxidação de lipídios. O objetivo deste estudo foi investigar a influência do estado da sorologia HCV e terapia de reposição de ferro sobre os níveis de pentosidina em um grupo de pacientes em HD.

## **Pacientes e Métodos**

### *Pacientes e delineamento do estudo*

Um total de 115 pacientes em HD pacientes (56 homens; mediana de idade de 47, intervalos de 16-89 anos) em três centros de diálise na cidade de Curitiba (Paraná-Brasil) foram incluídos no estudo. O principal critério de inclusão foi uma permanência em hemodiálise de pelo menos 6 meses. Pacientes com doença inflamatória crônica (por ex., doenças reumáticas) infecções em atividade, assim como a presença de hepatite B, definida pela detecção do antígeno-Hbs no soro, foi excluída do estudo. Os dados clínicos e de diálise são apresentados na Tabela 1. As causas de insuficiência renal foram: glomerulonefrite crônica (n=54), nefrosclerose hipertensiva (n=32), nefropatia diabética (n=13), e outras causas (n=16). Todos os pacientes foram hemodialisados 3 vezes por semana com membranas de celulose modificada (acetato de celulose ou derivados da celulose).

A dose média de TIVF (dose semanal média de manutenção de 50-100 mg), e eritropoietina subcutânea (dose média de 75U/Kg, variação entre 50 a 100 U/Kg) foi registrada durante os 6 meses que precederam o início do estudo. Os pacientes foram divididos em tercias de acordo com seus níveis de ferritina, e em dois grupos dependendo da presença (HCV+) ou ausência (HCV-) dos anticorpos contra hepatite C. O Comitê de Ética do Hospital Evangélico de Curitiba aprovou o protocolo de estudo.

### *Análise Bioquímica*

Os pacientes em hemodiálise foram avaliados no meio da semana, antes de uma sessão de hemodiálise. Amostras de sangue venoso foram colhidas do pacientes de hemodiálise e controles pela manhã, após jejum noturno. As amostras de plasma foram separadas das células sanguíneas e armazenadas a -70°C até a análise. A albumina sérica (S-alb) foi determinada pelo método do verde bromocresol. A proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCRas) e a alanina aminotransferase (ALT) foram medidas pelo método nefelométrico. Os níveis plasmáticos de interleucina-6 (IL-6) foram medidos por imunoenensaio enzimático (ELISA, Orthodiagnostic System, Raritan, NJ, USA). A ferritina sérica foi medida pelo método



Immulite. O diagnóstico de hepatite C foi feito pela detecção dos anticorpos anti-HCV também por método de ELISA (ELISA-2, Anti-HCV test, Ortho, Raritan, NJ, USA) de segunda geração, baseado em seis medidas consecutivas realizadas mensalmente antes do início do estudo.

#### *Dosagens de pentosidina*

A pentosidina plasmática foi determinada por cromatografia líquida de alta performance de fase reversa, como originalmente descrito por Odetti et al [10] e modificado por Miyata et al [11]. Sumariamente, 50  $\mu$ l de plasma foram liofilizados e então hidrolisados por 50  $\mu$ l HCl (6N) a 110<sup>0</sup>C sob atmosfera de nitrogênio por 16 horas, subseqüentemente neutralizado com 100  $\mu$ l de NaOH (5N) e 200  $\mu$ l de tampão de fosfato (0.5M, pH 7.4), e então filtrado através de um filtro Millipore de 0.45  $\mu$ m-e diluído 20 vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS). As amostras filtradas (50  $\mu$ l) foram então injetadas em colunas analíticas C18 de fase reversa (218TP104, Vydac, Separation Group, Hesperia, CA) utilizando detector direto de fluorescência em comprimentos de onda de excitação/emissão de 335/385 nm. Um gradiente linear de solvente foi utilizado, como descrito por Wilker *et al* [12], no qual o solvente A foi o ácido heptafluorobutírico (HFBA, 0.01 M) em água e o solvente B foi o HFBA 0,01 M + 60% acetonitrilo + 40% H<sub>2</sub>O. O perfil de diluição foi realizado como se segue, de acordo com o gradiente linear: 0-3 min, 0% B; 3-20 min, 0-30% B; 20-25 min, 30% B; 25-35 min, 30-100% B; 36-45 min, 0% B. A taxa de fluxo foi mantida em 1 ml através do fluxo cromatográfico. Pentosidina sintética foi utilizada para o cálculo dos níveis plasmáticos. Como a pentosidina está principalmente ligada à proteína e a albumina é a única proteína que se liga à pentosidina, [11] e a pentosidina livre representa 3-4 % da pentosidina total circulante [13], as concentrações plasmáticas de pentosidina em pmol por litro foram, então, corrigidas para a albumina sérica e expressas em pmol por mg de albumina [14].

#### *Análise estatística*

Os dados são apresentados como media  $\pm$  desvio padrão, ou mediana e intervalos. Uma comparação entre dois grupos foi realizada utilizando o teste t de Student para variáveis normalmente distribuídas, enquanto o teste U de Mann-

Whitney foi usado para variáveis não normalmente distribuídas. Comparação entre três grupos foi realizada utilizando o teste ANOVA. A análise das variáveis categóricas foi realizada pela análise de tabelas de contingência. Para variáveis não normalmente distribuídas, correlações foram realizadas com o teste de ranqueamento de Spearman. A diferença foi considerada significativa quando o valor de "p" foi menor do que 0.05.

## Resultados

### *Dados Clínicos e Correlações*

As características clínicas dos pacientes são apresentadas na Tabela 1. Como esperado, encontrou-se nos pacientes uma significativa correlação negativa entre Alb-S e PCRas (Rho =-0,21; p=0,02), e entre Alb-S e desnutrição (ASG) (Rho=-0,21; p=0,03). Nos pacientes em HD, os níveis de pentosidina no plasma se correlacionaram com a idade (Rho=0,22; p=0,001) e ferritina (Rho=0,19; p=0,03). Foi encontrada uma correlação positiva entre IL-6 e idade (Rho=0,38; p<0,0001), entre IL-6 e PCRas (Rho=0,48; p<0,0001) e uma correlação inversa foi observada entre IL-6 e Alb-S (Rho= -0,20; p =0,004). A dose cumulativa de ferro foi  $776 \pm 498$  mg nos 6 meses que precederam a avaliação. A dose cumulativa de ferro se correlacionou com o hematócrito (Hct) (Rho=0,38; p<0,0001) e ferritina (Rho=0,20; p=0,02). Finalmente, foi encontrada uma correlação significativa entre a ferritina e o Hct (Rho=0,23; p=0,001), mas não houve correlações significativas entre ferritina e PCRas e IL-6, respectivamente.

### *Comparação entre pacientes de acordo com a sorologia HCV*

Os dados clínicos e laboratoriais basais dos dois grupos, HCV+ (n=62) e HCV-(n=53) respectivamente, são apresentados na Tabela 2. O tempo médio em tratamento hemodialítico foi significativamente maior no grupo HCV+ ( $6,1 \pm 3,0$  anos) comparado aos pacientes do grupo HCV- ( $3,9 \pm 2,7$  anos, p<0,001). Os pacientes HCV+ tiveram níveis significativamente mais altos de ALT e pentosidina plasmática que os pacientes HCV- (Figura 3). O nível mediano de PCRas sérica (mg/l) foi mais baixo no grupo HCV+ que no grupo HCV-, mas

esta diferença não alcançou significância estatística ( $p= 0,08$ ). Por fim, não houve diferença nos níveis de IL-6 entre os dois grupos.

#### *Comparação entre pacientes de acordo com os tercís de ferritina e dose de ferro*

Os pacientes foram subdivididos em tercís de acordo com os níveis séricos de ferritina (Tabela 3): Grupo 1 ( $n=39$ ; ferritina  $< 380$ ng/ml), Grupo 2 ( $n= 37$ ; ferritina de 380 a 750 ng/ml) e Grupo 3 ( $n= 39$ ; ferritina  $>750$  ng/ml). Os pacientes no Grupo 3 apresentaram níveis medianos de pentosidina significativamente mais elevados (Figura 2) se comparados aos outros dois grupos. Além disto, a dose de ferro foi significativamente mais alta no Grupo 3, se comparada aos Grupos 1 e 2, e uma prevalência aumentada de mulheres foi observada no Grupo 1, em comparação com os outros dois grupos. Por outro lado, idade, tempo em HD, albumina sérica, PCRas, IL-6 e a presença de hepatite C não foram significativamente diferentes entre os três grupos.

As características dos pacientes de acordo com a dose mediana de ferro são apresentadas na Tabela 4. Ferritina, hematócrito, tempo em diálise e a prevalência de HCV foram significativamente mais altos no grupo de pacientes com doses cumulativas de ferro mais elevadas ( $>600$  mg /6 meses). Por outro lado, não houve diferenças em relação a idade, sexo, pentosidina, PCRas, IL-6, S-alb e prevalência de desnutrição entre os dois grupos.

#### **Discussão**

Os principais achados deste estudo sugerem que a presença de HCV esteve associada com níveis plasmáticos mais elevados de pentosidina, indicando um aumento do EO neste grupo de pacientes. Este estudo é o primeiro a relatar uma correlação entre infecção por HCV e níveis elevados de produtos finais da glicação avançada (PFGAs), especificamente a pentosidina. Sob EO, a formação de PFGAs tais como a pentosidina, é o resultado de uma produção aumentada de compostos reativos de carbonil, formados pela auto-oxidação de carboidratos e lipídios [15]. Os níveis aumentados de pentosidina nos pacientes HCV+ e em pacientes com altos níveis de ferritina, sugerem que a

combinação de HCV e terapia intravenosa com ferro podem ter participação na elevação deste produto final da glicação avançada.

Pacientes em HD são um importante grupo de risco para infecção por HCV. A prevalência de HCV em pacientes brasileiros em HD difere de uma região para outra, variando de 20% a 50% [5]. A infecção pelo HCV estimula a produção de ERO por macrófagos ativados, e aldeídos reativos podem ativar diretamente os hepatócitos, transformando-os em miofibroblastos, então levando a fibrose e cirrose hepática. Entretanto, há poucos estudos sobre a participação do HCV no EO na população em HD. Köken et al [16] estudaram os níveis de malondialdeído e conteúdo de carbonil em um grupo de pacientes em HD, e evidenciaram que os pacientes HCV+ apresentaram níveis mais elevados destes marcadores de EO, comparados aos controles e pacientes HCV- em HD. A infecção por HCV pode resultar em acúmulo de ferro no fígado. O aumento nos depósitos de ferro pode ser devido à liberação pelo hepatócitos lesados, ação do próprio vírus ou fatores genéticos [17]. Além disso, a infecção persistente por HCV foi recentemente associada à aterosclerose. Ishizaki et al demonstraram que a infecção por HCV em pacientes não renais, detectada pela presença da proteína central do HCV, esteve significativamente associada com a presença de placas em artérias carótidas (diagnosticadas por ultrasonografia bidimensional de alta resolução) [18].

A maioria dos pacientes em HD necessita de suplementação de ferro para repor as perdas sanguíneas contínuas causadas pelo procedimento de HD. A deficiência absoluta ou relativa de ferro, pela depleção dos depósitos de ferro na medula óssea, é uma causa comum de falha na resposta à EPO [19]. Assim, a administração de ferro é um pré-requisito para uma eritropoiese adequada. A segurança e efeitos colaterais do ferro intravenoso têm sido debatidos nos últimos anos. Feldman et al [9], avaliando o impacto da administração parenteral de ferro sobre as taxas de sobrevida e hospitalização em 5833 pacientes em HD nos Estados Unidos, demonstraram um risco aumentado de mortalidade em pacientes que recebiam mais que 1000 mg de ferro-dextran num período de 6 meses. Também, a administração intravenosa de ferro para a correção da anemia em pacientes em HD pode liberar ferro livre, que pode reagir com peróxido de hidrogênio, produzindo

radicais oxidantes de hidroxila. Os oxiradicais resultantes têm o potencial de produzir danos sobre os lipídios, ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos celulares [20].

É provável que os níveis elevados de ferritina no presente estudo estejam relacionados à terapia de reposição de ferro. A média de ferro administrado aos pacientes esteve de acordo com a dose semanal recomendada, entre 50 e 100 mg. A prevalência mais elevada de mulheres no tercil de ferritina mais alto e a maior prevalência de pacientes HCV+ no grupo com doses cumulativas mais altas de ferro pode significar que a quantidade de ferro administrada a mulheres e pacientes HCV+ deve ser ajustada. Além disto, houve correlação positiva entre a dose cumulativa de ferro, ferritina e Hct, mas não entre ferritina e PCR e IL-6, respectivamente. Finalmente, o grupo que apresentou os níveis mais elevados de ferritina apresentava também os níveis mais elevados de pentosidina.

Estes achados estão em concordância com outros relatos. Lim et al [21] estudaram 50 pacientes em HD com respeito aos níveis de ferritina, e demonstraram que os pacientes com os maiores níveis de ferritina apresentavam os níveis mais altos de peróxidos de lipídios plasmáticos. Mais recentemente, Tovbin et al [22] evidenciaram que o ferro intravenoso esteve associado com um aumento em um marcador da oxidação protéica, PAOP (produtos avançados da oxidação protéica). De modo semelhante, Drüeke et al [23] demonstraram uma correlação entre aumento da espessura íntima-média das artérias carótidas com os PAOPs, ferritina plasmática e a dose cumulativa anual de ferro intravenoso, indicando uma possível participação do ferro intravenoso no estresse oxidativo.

Algumas deficiências devem ser consideradas no atual estudo. Primeiro, o diagnóstico de infecção pelo HCV foi baseado em um teste indireto. Apesar do fato de que os pacientes HCV+ apresentavam níveis mais elevados de ALT, sugerindo a presença de infecção crônica, a presença de negatividade anti-HCV com positividade de RNA de HCV não é rara em pacientes em HD [24]. Segundo, apesar do fato de que neste estudo a ferritina não se correlacionou com os outros dois parâmetros inflamatórios (IL-6 e PCR), os níveis de ferritina são reconhecidamente afetados pela inflamação [25]. Por fim, a avaliação histológica por biópsia hepática poderia ter caracterizado melhor a extensão do dano hepático e sua associação com HCV, ferritina e pentosidina.

Em resumo, os resultados deste estudo sugerem que o EO, refletido pelos níveis elevados de pentosidina no plasma, esteve elevado em pacientes com evidências sorológicas de infecção por HCV, assim como em pacientes com níveis elevados de ferritina. Estes resultados sugerem que o EO pode estar aumentado em pacientes em HD com uma infecção crônica acometendo o fígado, e que os níveis elevados de ferritina em parte devidos à reposição intravenosa de ferro, poderiam aumentar este efeito. Além disso, mais estudos são necessários para confirmar as possíveis relações entre hepatite C, terapia intravenosa com ferro e EO em pacientes em HD.

**Agradecimentos:** Este estudo foi patrocinado pelo Instituto Karolinska, Estocolmo, Suécia, e por um fundo da Baxter Health Care, Deerfield, Illinois, USA. Durante seus estudos o Dr Marcelo M. do Nascimento recebeu uma bolsa de estudos da CAPES, Brasil (Processo #BEX0291/02).

## Referências Bibliográficas

1. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32(5 Suppl 3): S112-9.
2. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62(5): 1524-1538.
3. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; 46: 223-34.
4. Suliman ME, Heimbürger O, Barany P, *et al.* Plasma Pentosidine is associated with inflammation and malnutrition in ESRD patients but does not predict outcome. *JASN* 2003; 15(6): in press.
5. Carneiro MA, Martins RM, Telés SA, Silva SA, Lopes CL, Cardoso DD, Vanderborght BO, Yoshida CF. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patients in Central Brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(6): 765-9.
6. Busek SU, Baba EH, Tavares Filho HA, Pimenta L, Salomao A, Correa-Oliveira R, Oliveira GC. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(6): 775-8.
7. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, *et al.* Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61(11): 4365-70.
8. Boya P, de la Pena A, Beloqui O, Larrea E, Conchillo M, Castelruiz Y, Civeira MP, Prieto J. Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31(5): 808-14.
9. Feldman HI, Santanna J, Guo W, Furst H, Franklin E, Joffe M, Marcus S, Faich G. Iron administration and clinical outcomes in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(3): 734-44.
10. Odetti P, Fogarty J, Sell DR, Monnier VM. Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes* 1992; 41(2): 153-9.
11. Miyata T, Ueda Y, Shinzato T, Iida Y, Tanaka S, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Maeda K. Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(8): 1198-206.



12. Wilker SC, Chellan P, Arnold BM, Nagaraj RH. Chromatographic quantification of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived product in tissue proteins: comparison with pentosidine. *Anal Biochem* 2001; 290(2): 353-8.
13. Friedlander MA, Wu YC, Elgawish A, Monnier VM. Early and advanced glycosylation end products. Kinetics of formation and clearance in peritoneal dialysis. *J Clin Invest* 1996; 97(3): 728-35.
14. Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, Ito T, Nangaku M, Iwata H, Kurokawa K. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 244: 45-49.
15. Miyata T, Fu MX, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Thorpe SR, Baynes JW. Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: is there oxidative stress in uremia? *Kidney Int* 1998; 54(4): 1290-5.
16. Koken T, Serteser M, Kahraman A, Gokce C. Oxidative stress markers in hepatitis C infected hemodialysis patients. *J Nephrol* 2002; 15(3): 302-7.
17. Hezode C, Cazeneuve C, Coue O, et al. Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. *J Hepatol* 1999; 31(6): 979-84.
18. Ishizaka Y, Ishizaka N, Takahashi E, Unuma T, Tooda E, Hashimoto H, Nagai R, Yamakado M. Association between hepatitis C virus core protein and carotid atherosclerosis. *Circ J* 2003; 67(1): 26-30.
19. Hsu CY, McCulloch CE, Curhan GC. Iron status and hemoglobin level in chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(11): 2783-6.
20. Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* 2001; 55(6): 333-9.
21. Lim PS, Wei YH, Yu YL, Kho B. Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(11): 2680-7.
22. Tovbin D, Mazor D, Vorobiov M, Chaimovitz C, Meyerstein N. Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: role of inflammation. *Am J Kidney Dis* 2002; 40(5): 1005-12.
23. Drueke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, Descamps-Latscha B, Guerin AP, Marchais SJ, Gausson V, London GM. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation* 2002; 106(17): 2212-7.

24. Hinrichsen H, Leimenstoll G, Stegen G, Schrader H, Folsch UR, Schmidt WE. Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in haemodialysis patients: a multicentre study in 2796 patients. *Gut* 2002; 51(3): 429-33.
25. Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med* 1974; 290(22): 1213-6.

## **Legendas para as figuras**

**Figura 1.** Níveis de pentosidina plasmática em in 115 HD pacientes subdivididos em três grupos de acordo com os tercis de ferritina.

**Figura 2.** Conteúdo de pentosidina de acordo com sorologia HCV.

**Tabela 1.** Características clínicas e bioquímicas e níveis de pentosidina plasmática em 115 pacientes em hemodiálise.

| <b>Características clínicas e bioquímicas</b> | <b>Pacientes em HD<br/>(n=115)</b> |
|---|------------------------------------|
| <b>Idade (anos)<sup>a</sup></b>               | 47 ± 13                            |
| <b>Sexo masculino (%)</b>                     | 48                                 |
| <b>Diabetes mellitus (%)</b>                  | 11                                 |
| <b>Desnutrição (ASG &gt;1) (%)</b>            | 53                                 |
| <b>PCRas (mg/l)<sup>b</sup></b>               | 3,6 (0,2 -150)                     |
| <b>IL-6 (pg/ml)<sup>b</sup></b>               | 4,3 (0,9-19,6)                     |
| <b>Alb-S (g/l)<sup>a</sup></b>                | 36±3,7                             |
| <b>Ferritina (ng/ml)<sup>b</sup></b>          | 491(16-1500)                       |
| <b>Pentosidina (pmol/mg)<sup>b</sup></b>      | 981(131-2331)                      |
| <b>Tempo em HD (anos)<sup>a</sup></b>         | 5,1 ± 3,1                          |

<sup>a</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão: <sup>b</sup> Valores expressos como mediana e intervalos.

**Tabela 2.** Características clínicas e dialíticas de acordo com a sorologia HCV.

|  | <b>Grupo HCV +<br/>n=62</b> | <b>Grupo HCV -<br/>n=53</b> | <b>Valor p</b> |
|--|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
| <b>Idade (anos)<sup>a</sup></b>          | 45 ± 11                     | 49 ± 15                     | NS             |
| <b>Prevalência sexo masculino (%)</b>    | 48                          | 47                          | NS             |
| <b>Tempo em HD (anos)<sup>a</sup></b>    | 6,1 ± 3,0                   | 3,9 ± 2,7                   | <0,001         |
| <b>Alb-S (g/l)<sup>a</sup></b>           | 35 ± 4,1                    | 35 ± 3,4                    | NS             |
| <b>ALT (UI/l)<sup>a</sup></b>            | 30 ± 21                     | 20 ± 24                     | <0,001         |
| <b>PCRas (mg/l)<sup>b</sup></b>          | 3,3 (0,2-62)                | 4,8 (0,3-150)               | NS             |
| <b>IL-6 (pg/ml)<sup>b</sup></b>          | 4,6 (0,9-19)                | 4,2 (0,98-19,64)            | NS             |
| <b>Pentosidina (pmol/mg)<sup>b</sup></b> | 104,5 (13-270)              | 87,4 (25,6-183,7)           | <0,05          |
| <b>Ferritina (ng/ml)<sup>b</sup></b>     | 555 (16-1500)               | 483 (54-1500)               | NS             |
| <b>Desnutrição (ASG=B ou C) (%)</b>      | 46                          | 54                          | NS             |

<sup>a</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão; <sup>b</sup> Valores expressos como mediana e intervalos;

**Tabela 3.** Características clínicas e dialíticas em 115 pacientes em HD divididos em três grupos de acordo com os tercís de ferritina

|   | <b>Grupo 1<br/>(Ferritina<br/>&lt;380 ng/ml)<br/>n=39</b> | <b>Grupo 2<br/>(Ferritina<br/>380-750ng/ml)<br/>n=37</b> | <b>Grupo 3<br/>(Ferritina<br/>&gt;750ng/ml)<br/>n=39</b> | <b>Valor p</b> |
|---|---|--|--|----------------|
| <b>Idade (anos) <sup>a</sup></b>        | 45 ± 12   | 49 ± 14  | 47 ± 14  | NS             |
| <b>Sexo masculino (%)</b>               | 65  | 37   | 41   | <0,05          |
| <b>Tempo em HD (anos) <sup>a</sup></b>  | 4,3 ± 2   | 5,4 ± 3,4  | 5,3 ± 3  | NS             |
| <b>Alb-S (g/l) <sup>a</sup></b>         | 35 ± 3,2  | 35 ± 4,2   | 36 ± 3,3   | NS             |
| <b>Ferritina <sup>a</sup></b>           | 228 ± 89  | 527 ± 106  | 1201 ± 261   | <0,001         |
| <b>PCRas (mg/l)<sup>b</sup></b>         | 4,8 (0,2-54)  | 3,6 (0,2-150)  | 3,3 (0,2-62,7)   | NS             |
| <b>IL-6 (pg/ml)</b>                     | 4,6 (0,9-19)  | 4,8 (0,9-18)   | 4,2 (1,2-19)   | NS             |
| <b>Pentosidina(pmol/mg)<sup>a</sup></b> | 79 (13-177)   | 99 (43-175)  | 106 (27-230)   | <0,05          |
| <b>HCV (%)</b>                          | 55  | 45   | 56   | NS             |
| <b>Dose de ferro<br/>(mg /6 meses)</b>  | 745 ± 478   | 694 ± 532  | 900 ± 474  | <0,05          |
| <b>Hct (%)</b>                          | 32 ± 5  | 33 ± 6   | 35 ± 6   | <0,05          |
| <b>ASG (B ou C) (%)</b>                 | 54  | 51   | 56   | NS             |

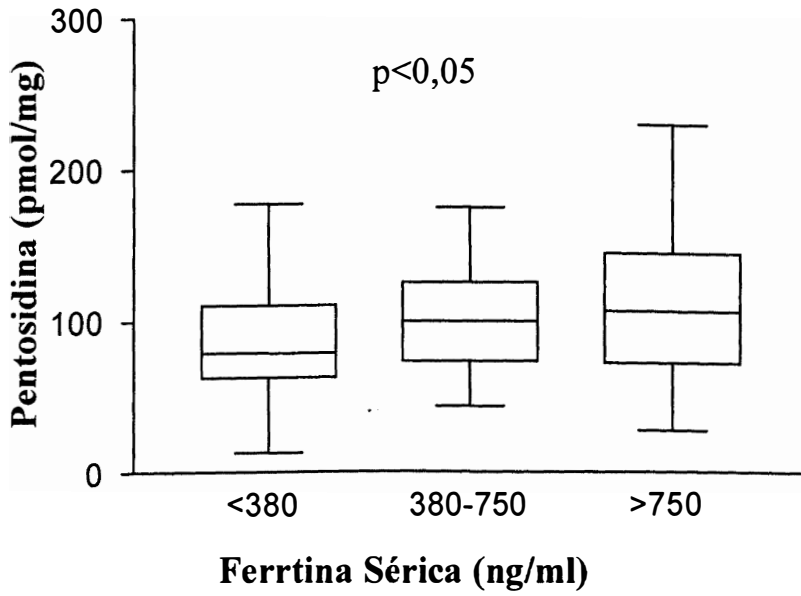
<sup>a</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão: <sup>b</sup> Valores expressos como mediana e intervalos.

**Tabela 4.** Características clínicas e dialíticas de acordo com a dose acumulada de ferro intravenoso.

|  | Dose de ferro<br>< 600 mg/<br>seis meses<br>(n=62) | Dose de ferro<br>> 600 mg/seis<br>meses (n=53) | Valor p |
|--|--|--|---------|
| Idade (anos) <sup>a</sup>                        | 47 ± 14  | 46 ± 12  | NS      |
| Sexo masculino (%)                               | 60   | 40   | NS      |
| Alb-S(g/l)                                       | 34 ± 3,3   | 36 ± 3,2                                       | NS      |
| Ferritina (ng/ml) <sup>b, c</sup>                | 445 (16-1500)                                      | 650 (104-1500)                                 | <0,05   |
| Hct (%)  | 31 ± 6   | 36 ± 5   | <0,0001 |
| PCRas (mg/l) <sup>b</sup>                        | 3,6 (0,2 -150)                                     | 3,3 (0,1-62)                                   | NS      |
| IL-6 (pg/ml) <sup>b, c</sup>                     | 5 (0,9-19)   | 4,1 (1,2-19)                                   | NS      |
| Pentosidina plasmática<br>(pmol/mg) <sup>b</sup> | 102 (13-233)                                       | 93(37-230)                                     | NS      |
| Dose de ferro<br>(mg/6 meses) <sup>a</sup>       | 409 ± 79   | 1146 ± 373                                     | <0,0001 |
| Hepatite C (%)                                   | 42   | 57   | <0,05   |

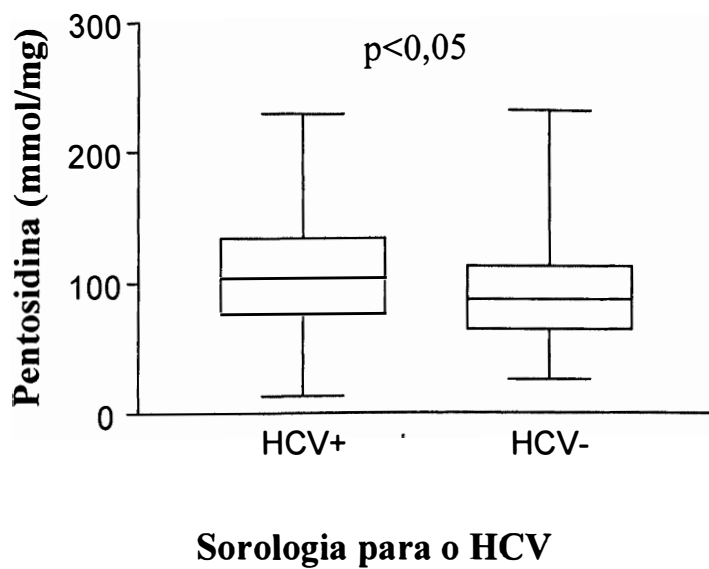
<sup>a</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão; <sup>b</sup> Valores expressos como mediana e intervalos

**Figura 1.** Níveis plasmáticos de pentosidina de acordo com os tercís de ferritina.





**Figura 2.** Níveis de pentosidina de acordo com a sorologia HCV.



## 6. SEGUNDO ARTIGO EM INGLÊS

### **The influence of hepatitis C and iron replacement therapy on plasma pentosidine levels in hemodialysis patients.**

Marcelo M. Nascimento <sup>1, 3, 4</sup>, Mohamed E. Suliman<sup>4</sup>, Annette Bruchfeld <sup>4</sup>, Shirley Y. Hayashi<sup>4</sup>, Roberto C. Manfro <sup>3</sup>, Roberto Pecoits-Filho <sup>2,4</sup>, Maria A. Pachaly <sup>1</sup>, Luciana Renner <sup>1</sup>, Peter Stenvinkel <sup>4</sup>, Miguel C. Riella <sup>1,2</sup> and Bengt Lindholm. <sup>4</sup>

Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná-Brazil <sup>1</sup>; Pontificia Universidade Católica do Paraná-Brazil <sup>2</sup>; Post-Graduate Medical Sciences: Nephrology Program of Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Brazil <sup>3</sup>; Divisions of Renal Medicine and Baxter Novum, Department of Clinical Science, Karolinska Institutet, Huddinge University Hospital, Stockholm, Sweden <sup>4</sup>.

#### **Adress for correspondence:**

Bengt Lindholm, MD, PhD

Baxter Novum and Renal Medicine

Department of Clinical Science

Karolinska Institutet

K-56 Huddinge University Hospital.

S-141 86 Stockholm

Sweden

Tel: +46(8) 58582601/ Fax: +46(8) 6897730

E-mail: [bengt.lindholm@klinvet.ki.se](mailto:bengt.lindholm@klinvet.ki.se)

## Abstract

**Background:** Chronic liver disease and intravenous iron therapy (IVIT) can enhance oxidative stress (OS). The aim of this study was to assess the influence of hepatitis C (HCV) and IVIT on OS in hemodialysis (HD) patients.

**Methods:** A total of 115 HD patients (47% males, age  $47 \pm 13$  years) were placed in two groups according to the presence (HCV+) or absence (HCV-) of serum antibodies against HCV. Plasma pentosidine, high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), interleukin-6 (IL-6) and alanine aminotransferase (ALT) levels were measured. The patients were also analysed according to the tertiles of serum levels of ferritin: Group 1 (ferritin  $< 380$  ng/ml), Group 2 (ferritin 380-750ng/ml) and Group 3 (ferritin  $>750$ ng/ml). The cumulative iron dose was recorded during 6 months prior to the study.

**Results:** HCV + patients had higher median levels of plasma pentosidine, ALT (mean  $\pm$  SD): (104.5 range 13.3-230.5 vs. 87.4, range 25.6-183.7pmol/mg) and ( $30 \pm 21$  vs.  $20 \pm 24$ UI/l) than HCV- patients. Age, gender, S-Alb, IL-6 and CRP did not differ according to HCV serology. The patients with the highest levels of ferritin (Group 3) presented with higher median levels of pentosidine (pmol/mg) and mean  $\pm$  SD cumulative dose of iron (mg/last six months) (106, range, 27-230) ( $900 \pm 474$ ) compared to ferritin Group 1 (99, range 43-175;  $p < 0.05$ ) ( $745 \pm 478$ ) and ferritin Group 2 (79, range 13-177;  $p < 0.05$ ) ( $694 \pm 532$ ;  $p < 0.05$ ) patients. Plasma pentosidine showed a positive correlation with age (Rho= 0.18;  $p = 0.05$ ), HCV (Rho=0.19;  $p = 0.03$ ) and ferritin (Rho= 0.19;  $p = 0.03$ ). Moreover, there were significant correlations between ferritin and hematocrit (Rho=0.22;  $p < 0.01$ ) and the cumulative dose of iron (Rho=0.19;  $p = 0.03$ ).

**Conclusion:** the combination of hepatitis C and IVIT, resulting in iron overload, may intensify the oxidative stress in HD patients.

**Key Words:** Hepatitis C, ferritin, hemodialysis, oxidative stress, pentosidine.

**Running title:** Increased pentosidine in HD patients with HCV and hyperferritinemia.

## Introduction

The main cause of mortality in patients with chronic kidney disease (CKD) is cardiovascular disease (CVD) [1]. The presence of inflammation and oxidative stress (OS) may contribute to cardiovascular disease (CVD) in CKD patients. Furthermore, in uremia the circulating levels of advanced glycation end-products (AGEs) are elevated and may promote atherosclerosis [2]. AGEs constitute a heterogeneous class of structures, such as pentosidine, N<sup>ε</sup>-carboxymethyl-lysine and imidazole, which are formed by non-enzymatic glycation and oxidation reactions between carbohydrate-derived carbonyl compounds, and protein and amino groups (Maillard reaction) [3]. The accumulation of AGEs in CKD patients seems to be independent of serum glucose, but is associated with inflammation, OS, malnutrition and low residual renal function [4].

Hepatitis C, which infects 170 million people world-wide, is not an unusual condition in Brazilian hemodialysis (HD) patients. The prevalence of HCV antibodies is high in Brazilian HD centres (range, 20% to 50%) [5, 6]. Increased oxidative stress (OS) is a common feature of chronic liver disease [7] and in patients with HCV infection, increased levels of markers of lipid peroxidation have been demonstrated in the liver, serum and leukocytes [8].

Anemia in patients with CKD is usually treated by administration of subcutaneous erythropoietin (EPO) and intravenous iron therapy (IVIT). Recently, it has been suggested that administration of large doses of parenteral iron may be associated with increased morbidity and mortality in HD patients [9]. Moreover, iron increases the formation of ROS, leading to lipid peroxidation,. The aim of this study was investigate the influence of serological HCV status and iron replacement therapy on pentosidine levels in a cohort of HD patients.

## Subjects and Methods

### *Patients and study design*

A total of 115 HD patients (56 males; median age of 47, range 16-89 years) in three dialysis centres in the city of Curitiba (Paraná-Brazil) were enrolled in the study. The main inclusion criterion was at least 6 months of HD treatment. Patients with chronic inflammatory disease (i.e., rheumatic diseases) and active infection, as well

as hepatitis B, defined by the serum detection of Hbs antigen, were excluded from the study. The clinical and dialysis data are shown in Table 1. The causes of renal failure were: chronic glomerulonephritis (n=54), hypertensive nephrosclerosis (n=32), diabetic nephropathy (n=13), and other causes (n=16). All patients were hemodialysed 3 times weekly with modified cellulosic membranes (cellulose acetate or derivatized cellulose).

The mean dose of IVIT (weekly mean maintenance dose of 50-100 mg), and sub-cutaneous erythropoietin (mean dose of 75U/Kg, range 50 to 100 U/Kg) was recorded during 6 months preceding the beginning of the study. The patients were divided by tertiles according to their ferritin levels and were also placed in two groups depending on the presence (HCV+) or absence (HCV-) of antibodies against hepatitis C. The Ethics Committee of Hospital Evangélico de Curitiba approved the study protocol.

#### *Biochemical Analysis*

The HD patients were investigated on a mid-week, before dialysis session. Venous blood samples were collected from the HD patients and control subjects in the morning after an overnight fast. Plasma samples were separated from blood cells and stored at -70°C pending analyses. Serum albumin (S-Alb) was determined by the bromocresol green method. High-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and alanine aminotransferase (ALT) were measured in the plasma by the nephelometry method. Plasma interleukin-6 (IL-6) levels were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Orthodiagnostic System, Raritan, NJ, USA). Serum ferritin was measured by the Immulite method. The diagnosis of hepatitis C was done by the detection of anti-HCV antibodies by a second generation enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-2, Anti-HCV test, Ortho, Raritan, NJ, USA) based on six consecutive measurements performed monthly before the initiation of this study.

#### *Pentosidine measurements*

Plasma pentosidine was determined by reverse-phase HPLC as described originally by Odetti et al [10] and modified by Miyata et al [11]. Briefly, 50 µl of plasma were lyophilized and then hydrolyzed by 50 µl 6N HCl at 110°C under nitrogen atmosphere for 16 h, subsequently neutralized with 100 µl of 5N NaOH and 200 µl of

0.5M phosphate buffer (pH 7.4), then filtered through a 0.45  $\mu$ m-Millipore filter and diluted 20-fold with phosphate-buffered saline (PBS). Filtered samples (50  $\mu$ l) were then injected into C18 reverse-phase analytical column (218TP104, Vydac, Separation Group, Hesperia, CA) using online fluorescence detector at excitation/emission wavelengths of 335/385 nm. A linear solvent gradient was used as described by Wilker *et al* [12], in which solvent A was 0.01 M heptafluorobutyric acid (HFBA) in water and solvent B was 60% acetonitrile + 40% H<sub>2</sub>O + 0.01 M HFBA.

The elution profile was as follows: 0-3 min, 0% B; 3-20 min, 0-30% B; 20-25 min, 30% B; 25-35 min, 30-100% B; 36-45 min, 0% B linear gradient. The flow rate was maintained at 1 ml through the chromatographic run. Synthetic pentosidine was used for calculation of plasma levels. Since plasma pentosidine is mainly present as protein bound and albumin is the only protein linking pentosidine [11] and free pentosidine represents 3-4 % of total circulating pentosidine [13] the plasma pentosidine concentrations in pmol per liter were, therefore, corrected for serum albumin and expressed as pmol per mg of albumin [14].

### *Statistical Analysis*

Data are presented as mean  $\pm$  SD, or median and range as appropriate a p value below 0.05 was considered to be significant. A comparison between two groups was performed using Student t-test for normally distributed variables whereas the Mann-Whitney's U-test was used for non-normally distributed variables. A comparison between three groups was performed using ANOVA test. The analysis of categorical variables was made by the analysis of contingency tables. For non-normally distributed variables, correlations were performed with the Spearman rank tests. The difference was considered significant when the p-value was less than 0.05.

## **Results**

### *Clinical Data and Correlations*

The clinical characteristics of the patients are given in Table 1. As expected a significant negative correlation was found in the patients between S-alb and hsCRP (Rho = -0.21; p=0.02), and between S-alb and malnutrition (SGA) (Rho=-0.21; p=



0.03). In the HD patients, plasma pentosidine correlated with age (Rho=0.22; p=0.001) and ferritin (Rho=0.19; p=0.03). A positive correlation was found between IL-6 and age (Rho=0.38; p<0.0001), between IL-6 and hsCRP (Rho=0.48; p<0.0001) and an inverse correlation was observed between IL-6 and S-Alb (Rho= -0.20; p=0.004). The cumulative dose of iron was  $776 \pm 498$  mg in the six months preceding the evaluation. The cumulative dose of iron correlated with Hct (Rho=0.38; p<0.0001) and ferritin (Rho=0.20; p=0.02). Finally, a significant correlation was found between ferritin and Hct (Rho=0.23; p=0.001), but no significant correlations were found between ferritin and hsCRP and IL-6, respectively.

#### *Comparison between patients according to HCV serology*

The basal clinical and laboratory characteristics of the two groups, HCV+ (n=62) and HCV-(n=53) respectively, are given in Table 2. The mean time on HD treatment was significantly increased in the HCV+ ( $6.1 \pm 3.0$  years) compared to the HCV- ( $3.9 \pm 2.7$  years) patients (p<0.001). The HCV+ patients had significantly higher levels of ALT and plasma pentosidine than HCV- patients (Figure 3). The median level of serum hsCRP (mg/l) was lower in the HCV+ than in the HCV- group, but this difference was not statistically significant (p= 0.08). Finally, there was no difference in the levels of IL-6 between the two groups.

#### *Comparison among patients according to ferritin tertiles and iron dose*

The patients were subdivided in tertiles according to the serum levels of ferritin (Table 3): Group 1 (n=39; ferritin < 380ng/ml), Group 2 (n= 37; ferritin from 380 to 750 ng/ml) and Group 3 (n= 39; ferritin >750 ng/ml). The patients in Group 3 had significantly higher median levels of pentosidine (Figure 2) as compared to the other two groups. Furthermore, the dose of iron was significantly higher in Group 3 as compared to Group 1 and Group 2, and an increased prevalence of females was observed in Group 1 as compared with the two other groups. On the other hand, age, time on HD, serum Alb, hsCRP, IL-6 and presence of hepatitis C were not significantly different among the three groups.

The patients' characteristics according to the median dose of iron are displayed in Table 4. Ferritin, hematocrit, time on HD and the prevalence of HCV were significantly higher in the group of patients with increased cumulative dose of iron

(>600 mg /6 months). On the other hand, age, gender, pentosidine, hsCRP, IL-6, S-alb and prevalence of malnutrition did not differ between the two groups.

## Discussion

The main findings of this study suggest that presence of HCV was associated with higher plasma pentosidine levels, indicating increased OS in this group of patients. To the best of our knowledge, our study is the first to report a correlation between HCV infection and increased levels of AGEs, specifically pentosidine. Under OS, the formation of AGEs such as pentosidine is the result of increased formation of reactive carbonyl compounds, formed by the autooxidation of carbohydrates and lipids [15]. The increased levels of pentosidine, in the HCV+ patients and in patients with high levels of ferritin, suggest that the combination of HCV and intravenous iron therapy may play a role in the elevation of this AGE.

Patients on HD are an important risk group for HCV infection. The prevalence of HCV in HD patients in Brazil differs from one region to another from 20% to 50% [5]. HCV infection stimulates the production of ROS by activated macrophages, and reactive aldehydes can directly activate hepatocytes, transforming them to myofibroblasts, thereby leading to hepatic fibrosis and cirrhosis. However, there is lack of studies on the role of HCV on OS in HD population. Köken et al [16] studied the levels of malondialdehyde and carbonyl content in a cohort of HD patients, and found that HCV+ patients presented higher levels of these OS markers compared to both controls, and HCV- HD patients.

HCV infection may result in increased liver iron accumulation. The increase in iron stores may be due to release from damaged hepatocytes, action by the virus itself or to due to genetic factors [17]. Furthermore, persistent HCV infection has recently been associated with atherosclerosis. Ishizaki et al demonstrated that HCV infection in non-renal patients, detected by the presence of HCV core protein, was significantly associated with the presence of carotis artery plaque (diagnosed by high-resolution B-mode ultrasonography) [18].

Most HD patients require iron supplements to replace the continuous blood losses caused by the HD procedure. The absolute or relative iron deficiency, from the

exhaustion of marrow iron stores to deliver adequate iron, is a common cause of failure of the erythropoietin (EPO) response [19]. Therefore, the administration of iron is a prerequisite for an adequate erythropoiesis. The safety and the side effects of intravenous iron have been debated in the past few years. Feldman et al [9] evaluating the impact of parenteral iron administration on the survival and rate of hospitalization among 5833 HD patients in the US showed an elevated risk of mortality in patients receiving more than 1000 mg of iron dextran over a period of 6 months. Moreover, intravenous iron administered in HD patients to correct anemia can release free iron, which may react with hydrogen peroxide to produce the hydroxyl radical oxidants. The resulting oxyradicals have the potential to damage cellular lipids, nucleic acids, proteins and carbohydrates [20].

It seems that increased levels of ferritin, in the current study, were associated to the iron replacement therapy. The average of iron given to the patients followed the recommended weekly dose, ranging from 50 to 100 mg. The higher prevalence of women in the highest ferritin tertile and the higher prevalence of HCV+ patients in the group with higher cumulative dose of iron might imply that the amount of iron given to women and HCV+ patients need to be adjusted. In addition, in the present study, there was a significant correlation between the cumulative iron dose, ferritin and Hct, but not between ferritin and CRP and IL-6, respectively. Moreover, the group that presented with the highest serum levels of ferritin had the highest levels of pentosidine as well.

These findings are in accordance with other reports. Lim et al [21] studied 50 HD patients according to the levels of ferritin, and showed that patients with the highest levels of ferritin, had the highest levels of plasma lipid peroxides. More recently, Tovbin et al [22] found that intravenous iron was associated with an increase in a marker of protein oxidation, AOPP (advanced oxidation protein products). Similarly, Drüeke et al [23] demonstrated a correlation between increased common carotid artery intima-media thickness with AOPP, plasma ferritin and the cumulative annual intravenous iron doses, indicating a possible role of intravenous iron therapy in OS.

Some shortcomings should be considered in the current study. Firstly, the diagnosis of HCV infection was based on an indirect test. Despite the fact that HCV+

patient showed higher levels of ALT, suggesting the presence of chronic infection, the presence of anti-HCV negativity with HCV RNA positivity is not rare in HD patients [24]. Secondly, despite the fact that ferritin was not correlated with the other two inflammatory parameters (IL-6 and CRP) in this study, ferritin levels are known to be affected by inflammation [25]. Finally, histological evaluation by liver biopsy could have better characterized the extension of liver injury and its association with HCV, ferritin and pentosidine.

In summary, the results of this study suggest that oxidative stress reflected by elevated levels of plasma pentosidine, was increased in patients with serologic evidence of HCV infection, as well as in patients with higher serum levels of ferritin. These results suggest that oxidative stress might be enhanced in HD patients with a chronic infection influencing the liver, and that elevated ferritin levels due in part to intravenous iron therapy, could enhance this effect. Further studies are necessary to confirm the possible relationships between hepatitis C, intravenous iron therapy and oxidative stress in HD patients.

**Acknowledgements:** This study was supported by Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden and by a grant from the Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Illinois, USA. Marcelo M. do Nascimento was the recipient of a scholarship from Capes, Brazil (Process #BEX0291/02)

## References

1. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32(5 Suppl 3): S112-9.
2. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62(5): 1524-1538.
3. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; 46: 223-34.
4. Suliman ME, Heimbürger O, Barany P, *et al.* Plasma Pentosidine is associated with inflammation and malnutrition in ESRD patients but does not predict outcome. *JASN* 2003; 15(6): in press.
5. Carneiro MA, Martins RM, Teles SA, Silva SA, Lopes CL, Cardoso DD, Vanderborght BO, Yoshida CF. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patients in Central Brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(6): 765-9.
6. Busek SU, Baba EH, Tavares Filho HA, Pimenta L, Salomao A, Correa-Oliveira R, Oliveira GC. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(6): 775-8.
7. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, *et al.* Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61(11): 4365-70.
8. Boya P, de la Pena A, Beloqui O, Larrea E, Conchillo M, Castelruiz Y, Civeira MP, Prieto J. Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31(5): 808-14.
9. Feldman HI, Santanna J, Guo W, Furst H, Franklin E, Joffe M, Marcus S, Faich G. Iron administration and clinical outcomes in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(3): 734-44.
10. Odetti P, Fogarty J, Sell DR, Monnier VM. Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes* 1992; 41(2): 153-9.
11. Miyata T, Ueda Y, Shinzato T, Iida Y, Tanaka S, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Maeda K. Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(8): 1198-206.

12. Wilker SC, Chellan P, Arnold BM, Nagaraj RH. Chromatographic quantification of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived product in tissue proteins: comparison with pentosidine. *Anal Biochem* 2001; 290(2): 353-8.
13. Friedlander MA, Wu YC, Elgawish A, Monnier VM. Early and advanced glycosylation end products. Kinetics of formation and clearance in peritoneal dialysis. *J Clin Invest* 1996; 97(3): 728-35.
14. Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, Ito T, Nangaku M, Iwata H, Kurokawa K. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 244: 45-49.
15. Miyata T, Fu MX, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Thorpe SR, Baynes JW. Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: is there oxidative stress in uremia? *Kidney Int* 1998; 54(4): 1290-5.
16. Koken T, Serteser M, Kahraman A, Gokce C. Oxidative stress markers in hepatitis C infected hemodialysis patients. *J Nephrol* 2002; 15(3): 302-7.
17. Hezode C, Cazeneuve C, Coue O, *et al.* Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. *J Hepatol* 1999; 31(6): 979-84.
18. Ishizaka Y, Ishizaka N, Takahashi E, Unuma T, Tooda E, Hashimoto H, Nagai R, Yamakado M. Association between hepatitis C virus core protein and carotid atherosclerosis. *Circ J* 2003; 67(1): 26-30.
19. Hsu CY, McCulloch CE, Curhan GC. Iron status and hemoglobin level in chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(11): 2783-6.
20. Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* 2001; 55(6): 333-9.
21. Lim PS, Wei YH, Yu YL, Kho B. Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(11): 2680-7.
22. Tovbin D, Mazor D, Vorobiov M, Chaimovitz C, Meyerstein N. Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: role of inflammation. *Am J Kidney Dis* 2002; 40(5): 1005-12.
23. Drueke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, Descamps-Latscha B, Guerin AP, Marchais SJ, Gausson V, London GM. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation* 2002; 106(17): 2212-7.

24. Hinrichsen H, Leimenstoll G, Stegen G, Schrader H, Folsch UR, Schmidt WE. Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in haemodialysis patients: a multicentre study in 2796 patients. *Gut* 2002; 51(3): 429-33.
25. Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med* 1974; 290(22): 1213-6.



## Legends to figures

**Figure 1.** Plasma pentosidine levels in 115 HD patients subdivided in three groups according to tertiles of ferritin.

**Figure 2:** The pentosidine content according to HCV serology.

**Table 1.** Clinical and biochemical characteristics and plasma pentosidine levels in 115 HD patients.

| <b>Clinical and biochemical characteristics</b> | <b>HD patients<br/>(n=115)</b> |
|---|--------------------------------|
| <b>Age (years)<sup>a</sup></b>                  | 47 ±13                         |
| <b>Male gender (%)</b>                          | 48                             |
| <b>Diabetes mellitus (%)</b>                    | 11                             |
| <b>Malnutrition (SGA &gt;1) (%)</b>             | 53                             |
| <b>hsCRP (mg/l)<sup>b</sup></b>                 | 3.6 (0.2 -150)                 |
| <b>IL-6 (pg/ml)<sup>b</sup></b>                 | 4.3 (0.9-19.6)                 |
| <b>S-albumin (g/l)<sup>a</sup></b>              | 36±3.7                         |
| <b>Ferritin (ng/ml)<sup>c</sup></b>             | 491(16-1500)                   |
| <b>Plasma pentosidine (pmol/mg)<sup>b</sup></b> | 981(131-2331)                  |
| <b>Time on HD (years)<sup>a</sup></b>           | 5.1 ± 3.1                      |

<sup>a</sup> Values are expressed as means ± SD : <sup>b</sup> Values are expressed as median and range.

**Table 2:** Clinical and dialysis characteristics according to HCV serology.

|   | HCV + group<br>n=62 | HCV - group<br>n=53 | p value |
|---|---------------------|---------------------|---------|
| Age (years) <sup>a</sup>                  | 45 ± 11             | 49 ± 15             | NS      |
| Prevalence of males (%)                   | 48                  | 47                  | NS      |
| Time on HD (years) <sup>a</sup>           | 6.1 ± 3.0           | 3.9 ± 2.7           | <0.001  |
| Serum albumin (g/l) <sup>a</sup>          | 35 ± 4.1            | 35 ± 3.4            | NS      |
| ALT (UI/l) <sup>a</sup>                   | 30 ± 21             | 20 ± 24             | <0.001  |
| hsCRP (mg/l) <sup>b</sup>                 | 3.3 (0.2-62)        | 4.8 (0.3-150)       | NS      |
| IL-6 (pg/ml) <sup>b</sup>                 | 4.6(0.9-19)         | 4.2 (0.98-19.64)    | NS      |
| Plasma pentosidine (pmol/mg) <sup>b</sup> | 104.5 (13-270)      | 87.4 (25.6-183.7)   | <0.05   |
| Ferritin (ng/ml) <sup>b</sup>             | 555 (16-1500)       | 483 (54-1500)       | NS      |
| Malnutrition (SGA=B or C) (%)             | 46                  | 54                  | NS      |

<sup>a</sup> Values are expressed as means ± SD; <sup>b</sup> values are expressed as median and range;

**Table 3:** Clinical and dialysis characteristics in 115 HD patients placed in three groups. according to the tertiles of ferritin

|  | Group 1<br>(Ferritin<br><380 ng/ml)<br>n=39 | Group 2<br>(Ferritin<br>380-750ng/ml)<br>n=37 | Group 3<br>(Ferritin<br>>750ng/ml)<br>n=39 | p value |
|--|---|---|--|---------|
| <b>Age (years) <sup>a</sup></b>          | 45 ± 12                                     | 49 ± 14                                       | 47 ± 14                                    | NS      |
| <b>Prevalence of males (%)</b>           | 65  | 37  | 41   | <0.05   |
| <b>Time on HD (years) <sup>a</sup></b>   | 4.3 ± 2                                     | 5.4 ± 3.4                                     | 5.3 ± 3                                    | NS      |
| <b>Serum Albumin (g/l) <sup>a</sup></b>  | 35 ± 3.2                                    | 35 ± 4.2                                      | 36 ± 3.3                                   | NS      |
| <b>Ferritin <sup>a</sup></b>             | 228 ± 89                                    | 527 ± 106                                     | 1201 ± 261                                 | <0.001  |
| <b>hsCRP (mg/l)<sup>b</sup></b>          | 4.8 (0.2-54)                                | 3.6 (0.2-150)                                 | 3.3 (0.2-62.7)                             | NS      |
| <b>IL-6 (pg/ml)</b>                      | 4.6(0.9-19)                                 | 4.8(0.9-18)                                   | 4.2(1.2-19)                                | NS      |
| <b>Pentosidine (pmol/mg)<sup>a</sup></b> | 79 (13-177)                                 | 99 (43-175)                                   | 106 (27-230)                               | <0.05   |
| <b>HCV (%)</b>                           | 55  | 45  | 56   | NS      |
| <b>Iron dose (mg /six months)</b>        | 745 ± 478                                   | 694 ± 532                                     | 900 ± 474                                  | <0.05   |
| <b>Hct (%)</b>                           | 32 ± 5                                      | 33 ± 6  | 35 ± 6                                     | <0.05   |
| <b>SGA= B or C (%)</b>                   | 54  | 51  | 56   | NS      |

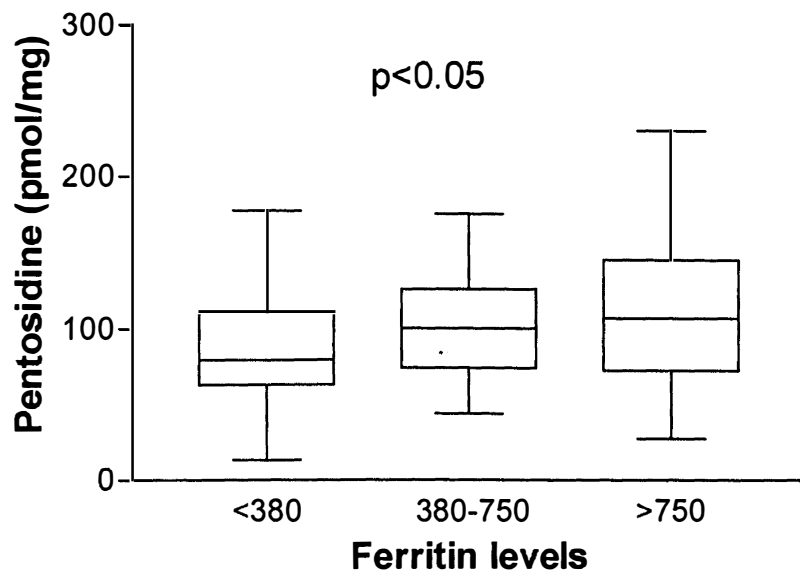
<sup>a</sup> Values are expressed as means ± SD; <sup>b</sup> values are expressed as median and range.

**Table 4:** Clinical and dialysis characteristics according to the accumulated dose of intravenous iron.

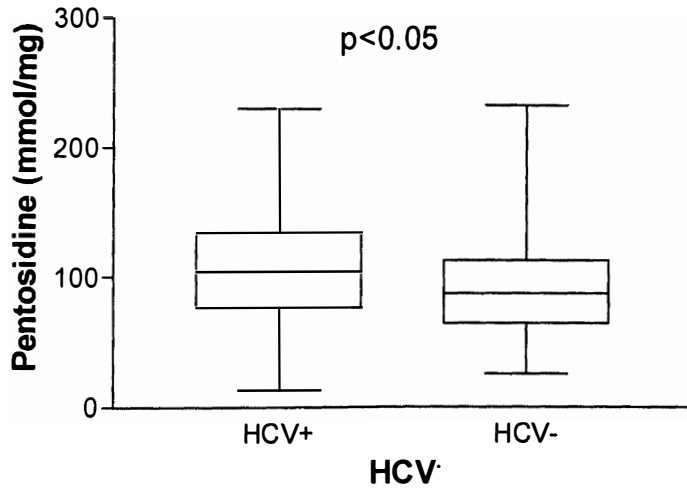
|   | <i>Iron dose<br/>&lt; 600 mg/ six<br/>months (n=62)</i> | <i>Iron dose<br/>&gt; 600 mg/six<br/>months<br/>(n=53)</i> | <i>p value</i> |
|---|---|--|----------------|
| <b>Age (years)<sup>a</sup></b>                      | 47±14   | 46±12  | NS             |
| <b>Male gender (%)</b>                              | 60  | 40   | NS             |
| <b>S-Albumin</b>                                    | 34±3.3  | 36±3.2   | NS             |
| <b>Ferritin (ng/ml)<sup>b, c</sup></b>              | 445(16-1500)  | 650(104-1500)  | <0.05          |
| <b>Hct (%)</b>                                      | 31±6  | 36±5   | <0.0001        |
| <b>hsCRP (mg/l)<sup>b</sup></b>                     | 3.6 (0.2 -150)  | 3.3 (0.1-62)   | NS             |
| <b>IL-6 (pg/ml)<sup>b, c</sup></b>                  | 5 (0.9-19)  | 4.1 (1.2-19)   | NS             |
| <b>Plasma pentosidine<br/>(pmol/mg)<sup>b</sup></b> | 102 (13-233)  | 93(37-230)   | NS             |
| <b>Iron dose<br/>(mg/six months)<sup>a</sup></b>    | 409 ± 79  | 1146± 373  | <0.0001        |
| <b>Hepatitis C (%)</b>                              | 42  | 57   | <0.05          |

<sup>a</sup> Values are expressed as means ± SD; <sup>b</sup> values are expressed as median and range

**Figure 1.** Plasma pentosidine levels according to tertiles of ferritin.



**Figure 2.** Plasma pentosidine according to HCV serology.



## 7 CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nestes dois estudos nos quais analisou-se o perfil inflamatório e a presença de estresse oxidativo em uma população em pacientes em terapia renal substitutiva com hemodiálise, concluímos que:

- 1) A prevalência de inflamação e desnutrição, em uma amostra da população brasileira na população brasileira em hemodiálise, é semelhante à descrita em estudos em outras populações.
- 2) A presença de inflamação persistente ao invés da elevação ocasional parece ter um impacto maior na sobrevida dos pacientes em hemodiálise.
- 3) O uso de ferro endovenoso, associado à infecção pelo HCV, está relacionado ao aumento do estresse oxidativo.

As conclusões aqui encontradas apontam para a realização de novos estudos na área de inflamação e estresse oxidativo em pacientes urêmicos visando, ao nosso ver, os seguintes aspectos:

- 1) Avaliar o impacto dos marcadores do estresse oxidativo, em especial pentosidina, na sobrevida de pacientes urêmicos.
- 2) Analisar os efeitos do uso parenteral de ferro no parênquima hepático dos pacientes infectados pelo HCV, visando esclarecer se estes representam um grupo com maior susceptibilidade ao efeito do estresse oxidativo provocado pelo uso de ferro por esta via.
- 3) Avaliar o uso de terapias anti-oxidantes nos pacientes em hemodiálise avaliando seus possíveis efeitos no desenvolvimento de doença cardiovascular.

A realização de estudos que analisem o papel da inflamação e de outros fatores de risco ditos não tradicionais, entre eles o estresse oxidativo, nos pacientes urêmicos de nosso país é essencial para que se possa melhor compreender os mecanismos envolvidos nas altas taxas de mortalidade observada em nossos pacientes. Adicionalmente, o enfoque multidisciplinar envolvendo outras especialidades médicas como a cardiologia e a nutrição se tornam necessários visando o melhor atendimento e buscando a melhora da sobrevida dos pacientes com insuficiência renal crônica.



## 8 ANEXOS

### 8.1) Cartas de resposta das revistas em relação a submissão dos artigos

#### 8.1.1) Artigo 1

Original Message -----

**From** AJKD Editorial Manager <deanna.gunderson@co.hennepin.mn.us>

**Date** Thu, 27 Mar 2003 14:52:43 -0500

**To** Bengt.Lindholm@klinvet.ki.se

**Subject** AJKD Acknowledgment & Manuscript Number

---

Mar 27, 2003

Dr Bengt Lindholm

Associated Professor

Department of Renal Medicine and Baxter Novum

Karolinska Institutet

Department of Renal Medicine and Baxter Novum

Huddinge University Hospital, K56

Stockholm 141 86

SWEDEN

Dear Dr. Lindholm:

We received your manuscript "The Prognostic Impact of Fluctuating Levels of C-Reactive Protein in Brazilian Hemodialysis Patients: A Prospective Study" and have assigned it manuscript number AJKD-D-03-00256.

The Editorial Manager tracking system is being built; in the meantime, you may track your manuscript's status via [www.ajkd.org](http://www.ajkd.org) -- Note: when entering the manuscript number, please use "03-" and only the last 4 digits of the number above, eg, an

Editorial Manager manuscript number of AJKD-D-03-00001 would be 03-0001 on [www.ajkd.org](http://www.ajkd.org)).

The editorial office is open 8:00 a.m. to 4:30 p.m.(CST) Monday through Friday. We are receiving many manuscripts and processing them in the order received. Please do not contact the editorial office regarding manuscript status. Information will not immediately appear on [www.ajkd.org](http://www.ajkd.org), so you will need to periodically check this site regarding the status of your manuscript.

We appreciate the opportunity to review your work.

Sincerely,

Deanna Gunderson, Managing Editor  
Anna Gillette, Assistant Managing Editor  
American Journal of Kidney Diseases

tel: 612-347-7770

fax: 612-347-4321

e-mail: [gunde032@umn.edu](mailto:gunde032@umn.edu)

Editorial Manager: <http://ajkd.editorialmanager.com>

## 8.1.2) Artigo 2

Original Message-----

From: Support@ScholarOne.com [[Support@ScholarOne.com](mailto:Support@ScholarOne.com)]

Sent: den 12 juni 2003 13:35

To: Mohamed.El.Saeid.Suliman@medhs.ki.se

Subject: Nephrology Dialysis Transplantation - Manuscript NDT-00644-2003

Mohamed Suliman

NDT-00644-2003

The influence of hepatitis C and iron replacement therapy on plasma  
pentosidine levels in hemodialysis patients

June 12th, 2003

Dear Suliman,

Thank you for having submitted the above manuscript to  
Nephrology Dialysis Transplantation. It will be sent out for review, and you  
should  
hear from us within 6 weeks as to the outcome of the review  
process. If you have any questions concerning the paper, please  
do not hesitate to contact us, quoting your manuscript number.

Yours sincerely,

Ms. Christine Dupont

## 8.2) Relação dos Congressos em que os trabalhos foram publicados

8.2.1) Impacto Prognóstico de Níveis Flutuantes de Proteína C-Reativa em  
Pacientes Brasileiros em Hemodiálise: Um Estudo Prospectivo

Uremic Toxicity Congress, Würzburg, Alemanha,

Março de 2002, categoria pôster

Congresso Brasileiro de Nefrologia, Brasília , Brasil,

Outubro de 2002, categoria pôster

8.2.2) Artigo 2 :Influência da hepatite C e reposição de ferro nos níveis plasmáticos de pentosidina em pacientes em hemodiálise.

International Society of Blood Purification Congress, Uncasville, EUA

Setembro 2003, categoria tema livre

American Society Nephrology Congress, San Diego, EUA

Novembro 2003, categoria pôster