

SIMONE GONÇALVES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE PACIENTES HEMODIALISADOS, QUANTO AO ESTRESSE
OXIDATIVO E ESTADO NUTRICIONAL – HUB.**

BRASÍLIA -DF

2008

Simone Gonçalves de Almeida

**AVALIAÇÃO DE PACIENTES HEMODIALISADOS, QUANTO AO ESTRESSE
OXIDATIVO E ESTADO NUTRICIONAL – HUB.**

Trabalho submetido à defesa em: 03/07/2008

Tese apresentada à banca examinadora

a título de defesa de tese de doutoramento

no programa de pós-graduação em

Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dr^a. Egle Machado de Almeida Siqueira

BRASÍLIA -DF

2008

A cada dia que vivo,
mais me convenço
de que o desperdício
da vida está no amor
que não damos,
nas forças que não usamos,
na prudência egoísta
que nada arrisca,
e que, esquivando-se
do sofrimento,
perdemos também
a felicidade.
(Carlos Drummond de Andrade)

Banca Examinadora:

Presidente da Banca: Prof^a. Dr^a. Egle Machado de Almeida Siqueira

Departamento de Biologia Celular – Instituto de Ciências Biológicas - UnB

2° Membro: Prof^a. Dr^a. Adriana Pederneiras

Departamento de Ciências da Saúde – Curso de Nutrição - UCB

3° Membro: Prof. Dr. Joel Paulo Russomano Veiga

Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Medicina - UnB

4° Membro: Prof. Dr. José Garrofe Dórea

Departamento de Nutrição – Faculdade de Ciências da Saúde - UnB

5° Membro: Prof^a. Dr^a. Sandra Fernandes Arruda

Departamento de Nutrição – Faculdade de Ciências da Saúde - UnB

Agradecimento Especial

À Prof^a. Dr^a. Egle Machado de Almeida Siqueira pelo estímulo e paciência durante a realização deste estudo. Agradeço sinceramente pela amizade.

Agradecimentos

Deus me iluminou e me conduziu para a conclusão desta etapa, agradeço a Ele pela força, e por ter guiado meu caminho.

Aos pacientes em hemodiálise do Hospital Universitário de Brasília.

À equipe de profissionais do Hospital Universitário de Brasília, em especial ao bioquímico Robério do Laboratório do HUB.

A professora Sandra Arruda pela constante amizade e colaboração nas análises de estresse oxidativo.

Às colegas de laboratório Juliana e Cibele pela amizade e estímulo para a vida universitária.

À minha querida irmã (Andréa Almeida) pela presença constante e auxílio.

Ao constante incentivo do meu namorado Clebson Rodrigues.

Agradeço a todos os amigos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Agradeço ainda aos membros desta banca examinadora, pelo pronto aceite na participação e colaboração desta tese.

E finalmente aos maiores colaboradores de todos, aos meus pais, por estarem presentes em todos os momentos difíceis, sempre me ajudando e me apoiando nas decisões tomadas; sendo os principais incentivadores da minha formação.

Sumário

<i>Abreviaturas e Siglas</i>	11
<i>Apresentação</i>	15
<i>Resumo Geral</i>	18
Resumo	19
1. Introdução Geral	22
1. Introdução Geral	23
1.1 Doença Renal Crônica	23
1.2 Ferro em Processos Patológicos	28
1.3 Paciente Renal e Estado Nutricional	31
1.4 Referências Bibliográficas	35
2. Justificativa	40
2.1 Referências Bibliográficas	42
3. Objetivos	43
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4. Metodologia	45
4.1 Local do Estudo e Amostra	46
4.2 Sujeitos	47
4.2.1 Critérios de Inclusão	47
4.2.2 Critérios de Exclusão	47
4.3 Desenho Experimental	47
4.4 Comitê de Ética	48
4.5 Avaliação Nutricional	49
4.5.1 Ingestão Dietética	49
4.5.2 Análise Antropométrica	50
4.5.3 Análise Bioquímica	54
4.5.3.1 Avaliação do Estado de Estresse Oxidativo	55
4.5.3.1.1 Preparo das Amostras	55
4.6 Metodologia do Pareamento	58
4.6.1 Sujeitos	58
4.7 Análise Estatística	59
4.8 Referências Bibliográficas	60
5. Capítulo 1: Papel adverso do ferro no organismo	62
Resumo	64
Abstract	66
Introdução	68
Método	68
Revisão de literatura	69
Considerações finais	77
Referências Bibliográficas	78
6. Capítulo 2: Protein carbonyl correlated positively with ferritin and negatively with hemoglobin in malnourished patients submitted to hemodialysis.	83
Abstract	85
Introduction	87
Methods	87
Results	92
References	100
7. Apêndices	105
7.1 Apêndice 1	106
7.2 Apêndice 2	108

Lista de Tabelas e Figuras

Lista de Tabelas e Figuras

Metodologia:

Tabela 1: Estado nutricional segundo adequação de peso.....51

Tabela 2: Estado nutricional segundo adequação de prega cutânea tricpital.....52

Tabela 3: Estado nutricional segundo adequação da circunferência muscular do braço53

Capítulo 2:

Table 1. Levels of hemoglobin (Hb), Ferritin, Lipid peroxidation (MDA) and Protein carbonyl (PC) in health volunteers and in hemodialysis patients..... 99

Table 2. Characteristics of hemodialysis patients with normal nutritional status and malnourished.....100

Figure 1. Pearson's correlation between serum protein carbonyl and ferritin in patients submitted to maintenance hemodialysis with mild to moderate malnutrition.....95

Figure 2. Pearson's correlation between serum protein carbonyl and hemoglobin in patients submitted to maintenance hemodialysis with mild to moderate malnutrition....95

Abreviaturas e Siglas

AI: ingestão adequada

BTH: butilhidroxitolueno

CB: circunferência do braço

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

CMB: circunferência muscular do braço

CuSO₄: sulfato de cobre

DCNT: doença crônica não transmissível

DNA: ácido desoxirribonucleico

DRC: doença renal crônica

EAR: necessidade média estimada

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetraácetico

EPO: eritropoetina

EROs: espécies reativas de oxigênio

g: gramas

h: horas

Hb: hemoglobina

HCL: ácido clorídrico

HCM: hemoglobina corpuscular média

HUB: Hospital Universitário de Brasília

i.v.: intravenoso

ICC: instituto central de ciências

IMC: índice de massa corporal

IRE: elemento responsivo do ferro

IRP: insuficiência renal progressiva

IRP: iron responsible proteins

K: potássio

Kcal: kilocalorias

Kg: Kilograma

Kt/V: clearance do dialisador por tempo e volume

MDA: malondialdeído

min: minuto

mRNA: ácido Ribonucléico - mensageiro

Na₂CO₃: carbonato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

ND: nefropatia diabética

OMS: Organização Mundial de Saúde

PB: perímetro braquial

PC: proteína carbonilada

PCR: proteína C reativa

PCT: prega cutânea triçiptal

PTH: paratormônio – paratireóide

rHuEPO: eritropoetina humana recombinante

RL: radicais livres

TBA: tiobarbitúrico

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

Tf: transferrina

UnB: Universidade de Brasília

VCM: volume corpuscular médio

Apresentação

O Trabalho “Avaliação de pacientes hemodialisados, quanto ao estresse oxidativo e estado nutricional – HUB” foi realizado no período de agosto 2004 a maio de 2008 no Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília.

Esta tese está estruturada na forma de artigos de acordo com as normas desta pós-graduação. Os dois artigos foram redigidos segundo as exigências específicas da revista a qual foi publicada ou submetida. As referências bibliográficas foram estruturadas conforme exigência das revistas. A parte referente à Introdução Geral e Metodologia Geral foi redigida segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2002). Os apêndices encontram-se no final da tese.

A metodologia geral, apesar de descrita nos três artigos, consta como tópico a parte apresentada de maneira mais detalhada. Assim como, o resumo em inglês, os objetivos e justificativa da tese.

O primeiro artigo “Papel Adverso do Ferro no Organismo”, consiste em uma revisão bibliográfica sobre “metabolismo e homeostase do ferro, bem como as causas e conseqüências da deficiência e sobrecarga de ferro”. Publicado na revista de Comunicação em Ciências da Saúde. “SIQUEIRA, E. M. A. S.; ALMEIDA, S. G.; ARRUDA, S. F. Papel Adverso de Ferro no Organismo. **Ciênc Saúde**. v.17, n. 3, p. 229 – 236. 2006.”

O segundo artigo “Associação entre biomarcadores de estresse oxidativo e ferritina sérica em pacientes hemodialisados” foi submetido à revista Journal of Renal Nutrition, onde parte dos resultados da pesquisa são apresentados. Participaram do

trabalho Joel Paulo Russomano Veiga, Simone Gonçalves de Almeida, Sandra Fernandes Arruda, Cibele Ferreira Neves, Egle Machado de Almeida Siqueira.

Resumo Geral

Resumo

Introdução: Devido a seu potencial redox, o ferro tornou-se o metal mais comumente utilizado na maioria dos sistemas biológicos. Entretanto, devido a essa versatilidade química, o ferro pode transferir elétrons para o oxigênio molecular, capaz de promover a oxidação de diversas moléculas e danos oxidativos celulares. Assim, tanto a deficiência quanto o excesso de ferro no organismo são responsáveis por um amplo espectro de doenças, variando desde a anemia até a sobrecarga. A suplementação com ferro parenteral e a administração de eritropoetina humana recombinante (rHuEPO) é à base do tratamento da anemia nos pacientes com Doença Renal Crônica (DRC) terminal em tratamento dialítico. A administração intravenosa repetida de ferro aumenta o estresse oxidativo nesse grupo de indivíduos.

Objetivos: Verificar possíveis correlações e/ou associações entre os níveis de estresse oxidativo em pacientes renais, submetidos ou não a ferroterapia; além do estado nutricional.

Metodologia: Foram utilizadas as bases de dados Medline, Scielo e Lilacs, além de documentos governamentais e não-governamentais e sites na Internet para a revisão publicada sobre ferro. Para a pesquisa de campo, foram incluídos 35 dos 54 pacientes assistidos no programa de hemodiálise do Hospital Universitário de Brasília, foi realizado um estudo transversal, não probabilístico, com caráter analítico e descritivo. Os níveis séricos de malondialdeído (MDA) e de proteína carbonilada foram utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo. O estado oxidativo e de ferro dos pacientes com DRC foi comparado ainda com um grupo controle, constituído de 35 indivíduos

saudáveis, pareados pela idade, sexo e situação sócio-econômica. O estado nutricional dos pacientes foi avaliado por meio de parâmetros antropométricos [índice de massa corporal (IMC), adequação da circunferência muscular do braço (CMB) e adequação da prega cutânea tricípital (PCT)], exames bioquímicos (albumina sérica, ferro sérico, transferrina e ferritina séricas) e avaliação do consumo da dieta por meio de recordatório alimentar 24 horas de três dias.

Resultados: Anemia e sobrecarga de ferro foi observada nos pacientes hemodialisados, apesar do consumo médio de ferro dietético estar acima da recomendação e da utilização de rHuEPO e de ferro i.v em 80% e 25,70% dos pacientes, respectivamente. Pacientes com ferritina sérica ($125,7 \pm 21,0$ ng/mL) apresentaram níveis mais baixos de proteína carbonilada sérica em relação aos pacientes com ferritina sérica alta ($318,5 \pm 37,6$ ng/mL). Os pacientes renais apresentaram maiores níveis de ferritina sérica, de MDA e de proteína carbonilada sérica em relação a indivíduos saudáveis. Os resultados evidenciaram prevalência de 34% de desnutrição nos pacientes hemodialisados (PCT e/ou CMB \leq 5 percentil do padrão de referência). A média do percentual de peso ideal, IMC e da CMB estavam adequados, entretanto, a adequação da PCT indicou desnutrição moderada, evidenciando uma perda de gordura corporal em ambos os sexos dos pacientes. Com relação à dieta, os achados desta pesquisa revelaram consumo de energia de $27,9 \pm 8,8$ Kcal/kg/dia. Quanto aos dados hematimétricos e a idade dos pacientes conforme o estado nutricional; não foi observada diferença significativa entre as variáveis hematimétricas avaliadas neste estudo.

Conclusão: Indubitavelmente, a anemia é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, que precisa ser combatida. Porém, considerando-se o papel adverso do ferro no organismo e o fino equilíbrio alcançado através do controle de sua absorção e excreção, bem como, da multiplicidade de fatores e nutrientes envolvidos nesta homeostase, estratégias de combate à anemia devem ser pontuais, direcionadas apenas para grupos de risco. Quanto a positiva correlação entre PC e ferritina sérica sugere-se uma relação entre estresse oxidativo e e estdo de desnutrição em pacientes hemodialisados.

Palavras-chave: ferro, anemia, estresse oxidativo, doenças degenerativas, hemodiálise, ferritina.

1. Introdução Geral

1. Introdução Geral

1.1 Doença Renal Crônica

A doença renal crônica (DRC) condiciona a perda irreversível da função renal, torna o paciente dependente de uma terapia de substituição renal (diálise ou transplante) para evitar o desenvolvimento de uremia potencialmente fatal. Visto que a função de excreção de catabólitos é resultante principalmente da filtração glomerular, a DRC consiste assim em uma perda progressiva da filtração glomerular que pode ser avaliada clinicamente pela medida da depuração de creatinina em urina de 24 horas. Nestas condições os pacientes apresentam comprometimento do estado nutricional em decorrência da constante inapetência e dos distúrbios metabólicos gerados pela DRC e suas intercorrências (infecções, sangramentos, etc.) (ROMÃO, 2004). Devido a DRC os pacientes em hemodiálise na sua grande maioria, apresentam anemia em consequência da ausência ou baixos níveis de eritropoetina e/ou deficiência de ferro. (IFUDU, 2001).

A doença renal crônica (DRC) consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins (glomerular, tubular e endócrina). Em sua fase mais avançada (chamada de fase terminal de doença renal crônica - DRC), os rins não conseguem mais manter a normalidade do meio interno do paciente (ROMÃO, 2004).

A prevalência de DRC está aumentando em todo o mundo, constituindo um importante problema de saúde pública. As informações obtidas junto à Sociedade

Brasileira de Nefrologia e ao Ministério da Saúde são semelhantes: a prevalência de pacientes mantidos em programa crônico de diálise dobrou nos últimos dez anos. Em 1994, haviam 24.000 pacientes mantidos em programa dialítico, no ano 2004, somavam 59.153 pacientes. A incidência de novos pacientes cresce cerca de 8% ao ano (maior que a taxa de crescimento observada no USA, que é de 4,1% ao ano) (XUE et al., 2005), correspondendo a um gasto de 1,4 bilhões de reais ao ano, gastos com o programa de diálise e transplante renal no Brasil (ROMÃO, 1999; BASTOS et al., 2004).

Apesar dos avanços no tratamento da DRC, no Brasil, a morbi-mortalidade permanece elevada, a sobrevida gira em torno de 79% e 41%, no primeiro e no quinto ano de diálise, respectivamente (SESSO, 2003). A desnutrição protéico-energética (DPE) é um importante fator que contribui para esse quadro nosológico, apresentando elevada prevalência nestes pacientes, que pode variar de 10% a 54% dependendo do parâmetro utilizado (MARCKMANN, 1998).

A doença renal crônica e o tratamento hemodialítico provocam uma sucessão de situações para o paciente renal crônico, que compromete o aspecto não só físico, como psicológico, com repercussões pessoais, familiares e sociais. Na convivência com esses pacientes, ficou clara a importância da intervenção do nutricionista na busca de solução nas limitações provocadas pela DRC e o tratamento. O doente renal crônico vivencia brusca mudança em seu estilo de vida, convive com limitações, com o tratamento doloroso que é a hemodiálise, com o pensar na morte. Por outro lado, vislumbra a possibilidade de submeter-se ao transplante renal com a expectativa de melhorar sua qualidade de vida.

A relativa abundância de ferro nos alimentos e a existência de um fino ajuste entre o status deste no organismo e sua absorção no intestino contrariam as estatísticas mundiais, quanto à alta prevalência de anemia.

A anemia é uma grave consequência da DRC, sendo causada principalmente pela produção renal insuficiente de eritropoetina. Esta deficiência provoca incapacidade física e mental, sendo responsável pela redução de sobrevida e da qualidade de vida desses pacientes (ROMÃO, 2004).

A eritropoetina (EPO), uma glicoproteína produzida principalmente no rim, em resposta a hipóxia. É o principal mediador humoral da eritropoiese. Ela é responsável pela sobrevivência, proliferação e diferenciação dos progenitores eritróides e sua forma sintética recombinante, tem sido largamente utilizada no tratamento da anemia em pacientes renais. A hipóxia, devido à insuficiência respiratória ou cardíaca, anemia, e outros, são detectados por um sensor de oxigênio em certas células renais que respondem a este estímulo e aumentam a produção de eritropoetina. Este hormônio atua na medula óssea, estimulando a síntese e diferenciação de eritroblastos. Os eritroblastos sofrem um processo de multiplicação e diferenciação complexo na medula óssea, até atingir o seu estado definitivo de maturação, quando então, entram na corrente sanguínea sob a forma de eritrócitos. (BRON et al., 2001).

A anemia na doença renal crônica é multifatorial e está presente na maioria dos pacientes renais. Há suspeitas de que as toxinas urêmicas também possam inibir a eritropoiese e ainda, reduzir o tempo de vida dos eritrócitos (NISSENSON e STROBOS, 1999). A anemia pode ser agravada por perdas sanguíneas pelo trato gastrointestinal, por inflamação, por deficiência de folato ou da vitamina B₁₂. A dieta

hipoprotéica pode levar a deficiência em ferro. Uma vez instalada, a anemia aumenta os riscos de acidentes cardiovasculares, desfavorece a atividade cognitiva e emocional e compromete a qualidade de vida dos pacientes renais (MANN, 1999).

No início da década de 90, vários estudos já indicavam o emprego da eritropoetina humana recombinante (rHuEpo) no tratamento da anemia, em pacientes com insuficiência renal progressiva. Porém, justamente devido ao aumento da eritropoiese estimulada pela rHuEpo, os pacientes, freqüentemente, desenvolvem deficiência funcional de ferro (saturação de transferrina é < 20%). Vários estudos têm demonstrado que deficiência de ferro é o fator mais freqüente responsável pela reduzida resposta dos pacientes renais à terapia com rHuEpo. Entretanto, outros fatores, como infecções, inflamações crônicas, toxicidade de alumínio, hiperparatireodismo secundário, deficiência orgânica da medula óssea, perda de sangue oculta, hemólise, não são incomuns. Porque há grande necessidade por ferro nos progenitores de eritropoetina, é essencial que se mantenham ferritina sérica e níveis de saturação de transferrina acima de 300 mg/L e 30%, respectivamente. (TARNG et al., 1999).

Adversamente, pacientes renais podem apresentar níveis de ferritina elevado. Aqueles com proteinúria podem apresentar distúrbio no metabolismo de ferro devido ao aumento de excreção urinária de transferrina que tanto pode gerar deficiência como o excesso de ferro sérico, (BRANTEN et al., 2004). O aumento de ferro sérico livre, não ligado a transferrina, promove o aumento de síntese de ferritina através dos *iron responsible element* (IRE) e das *iron responsible proteins* (IRP) elementos reguladores da tradução do mRNA da ferritina (DE FREITAS e MENEHINI, 2001).

A anemia não tratada é associada a diversas anormalidades fisiológicas observadas nessa população, incluindo insuficiência cardíaca, hipertrofia ventricular, angina, redução da atividade cognitiva, alterações menstruais e disfunção sexual. Essas condições pioram a qualidade de vida e dificultam a reabilitação dos pacientes, aumentando a morbimortalidade e sobrevida desses (ROMÃO,1999).

Atualmente, a suplementação de ferro intravenosa tem sido indicada principalmente para pacientes renais que recebem rHuEpo, como melhor tratamento na redução da resistência a eritropoetina e manutenção dos valores hematimétricos adequados. Porém, devido ao efeito pró - oxidante do ferro no organismo (PIERRE e FONTECAVE, 1999; ANDREWS, 2000), o emprego da ferroterapia i.v. em pacientes renais tem gerado polêmica, uma vez que a sobrecarga de ferro poderia levar a geração de radicais livres via reação de Fenton e, conseqüentemente, aumentar os danos oxidativos nesses pacientes. Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado aumento de danos oxidativos associados à administração de ferro i.v. (AGARWAL et al., 2004, MARUYAMA et al., 2007).

Em razão da variabilidade de respostas dos pacientes renais ao tratamento da anemia, esses pacientes podem apresentar status de ferro distintos e conseqüentemente, diferentes níveis de danos oxidativos. Desta forma, a investigação do estado nutricional em ferro associado à ingestão de ferro e danos oxidativos, poderão estabelecer correlações importantes para o tratamento destes pacientes.

1.2 Ferro em Processos Patológicos

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERMO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos. Assim como na formação das ERMO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular. Este tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo, que designa uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes (ROVER JUNIOR et al., 2001).

Estudos *in vivo*, *in vitro* e achados clínicos suportam a evidência de que o ferro, através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres (RL), tem participação na iniciação e promoção da carcinogênese (VALKO et al., 2006; DEUGNIER, 2003). Os danos ao DNA celular e aos lipídios provocados pelas EROs e RL parecem ser os responsáveis pelo desenvolvimento e rápida proliferação de células carcinogênicas (VALKO et al., 2006).

O impacto de programas de fortificação de ferro aplicados de maneira generalizada à população vem sendo discutido (MARTÍNEZ-NAVARRETE et al., 2002). Entre indivíduos com adequado estado nutricional de ferro e idosos, o excesso de estoque corporal desse mineral parece estar associado a maior incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e ao envelhecimento precoce. Isso se daria por meio do envolvimento do ferro como catalisador de reações de formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres (LEVENSON e TASSABEHJI, 2004; POLLA et al., 2003; VALKO et al., 2006; ARMUTCU et al., 2004). A alta prevalência de excesso de ferro entre homens nos Estados Unidos tem sido também atribuída a mudanças no hábito alimentar como o alto consumo de carnes e álcool (YUAN e LI, 2003).

A prevalência das DCNT tem aumentado nos últimos anos e tal quadro tende a se intensificar com o envelhecimento da população. Entre 1980 e 2000, a população brasileira com 65 anos ou mais aumentou em 47%, passando a representar 8,6% da população total, ultrapassando os 7% estabelecidos como referência pela Organização

Mundial de Saúde (OMS) para caracterizar uma população envelhecida. Estima-se que até 2025, o Brasil esteja entre as 10 maiores populações de idosos do mundo. No Brasil, a mortalidade por DCNT, aumentou de 34,4% em 1979 para 48,3% em 2003 (BRASIL, 2006).

As doenças e agravos crônicos não transmissíveis ganham papel de destaque no cenário da saúde pública mundial. Ao contrário do que se pensava esse crescente aumento não está limitado aos países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento a população sofre com o aumento da incidência destas doenças que se somam aos graves problemas das doenças transmissíveis. Em 2001, as doenças crônicas contribuíram com aproximadamente 60% dos 56,5 milhões de óbitos no mundo e 46% das doenças globais (WHO/FAO, 2003).

Doenças relacionadas à aterosclerose, como infarto do miocárdio, estão entre as maiores causas de morte, em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Como os fatores de risco explicam somente em parte estas mortes, têm sido desenvolvidos estudos com objetivo de investigar a relação entre ferro e doenças cardiovasculares. Estudos histopatológicos demonstram que o ferro em excesso é incorporado por macrófagos que aderem as placas ateroscleróticas, tornando-as mais instáveis. Esse excesso também aumenta a peroxidação a lipídios, proteínas e DNA (YUAN e LI, 2003; TUOMAINEN et al. 1998; SALONEN et al. 1992).

1.3 Paciente Renal e Estado Nutricional

O suporte nutricional é muito importante nos pacientes hemodialisados, uma vez que estes pacientes apresentam alto risco para desenvolver desnutrição, em consequência do hipercatabolismo e à reduzida ingestão de nutrientes. Nos últimos anos, a desnutrição protéico-calórica tem sido considerada como um fator relevante na evolução dos pacientes em hemodiálise. Sua presença está associada a um maior número de complicações e à maior frequência e duração das internações hospitalares. Manifestações como alergia cutânea e outras alterações do sistema imunológico, observadas em pacientes desnutridos em hemodiálise, sugerem que a desnutrição protéico-calórica possa propiciar o desenvolvimento de infecções e sepse. Outras consequências adversas da desnutrição é a diminuição da velocidade de cicatrização das feridas e o maior risco de trombose. A ocorrência repetida destas e outras complicações acabam por redundar na redução da sobrevida dos hemodialisados desnutridos (MAPRIL et al., 2005).

Diversos fatores podem ser responsáveis pela desnutrição nesses pacientes, incluindo distúrbios gastrointestinais, acidose metabólica, fatores associados ao procedimento dialítico, alterações hormonais, distúrbios no metabolismo protéico e energético, ingestão alimentar deficiente, devido principalmente à anorexia, náuseas e vômitos (MARTINS e RIELLA, 2001), além das doenças associadas ou intercorrentes (diabetes mellitus, insuficiência cardíaca e infecções) que podem também contribuir na fisiopatogênese da desnutrição (BERGSTROM, 1995).

Os amplos distúrbios metabólicos e nutricionais, ocorrência freqüente na desnutrição protéico-calórica, e a evidência de que a dieta pode desacelerar a progressão da doença renal, indicam que a terapia nutricional é crítica no tratamento da insuficiência renal crônica. O estado nutricional deve ser avaliado por um conjunto de parâmetros nutricionais que inclui além de métodos subjetivos, como a avaliação subjetiva global, métodos objetivos, como a antropometria, marcadores bioquímicos e inquérito alimentar (NKF-K/DOQI, 2000).

O ferro, elemento essencial à vida, desempenha grande variedade de funções fisiológicas e bioquímicas no organismo dos seres vivos (LEVENSON e TASSABEHJI, 2004; POLLA, 2003). Sua deficiência compromete o desenvolvimento cognitivo, aumenta a morbimortalidade materna e infantil, reduz a capacidade de trabalho e a resistência imunológica (LEVENSON e TASSABEHJI, 2004; BEARD e CONNOR, 2003; BOVELL-BENJAMIN e GINARD, 2003). Considerada a carência nutricional de maior magnitude no mundo, a anemia ferropriva, atinge aproximadamente 20% da população mundial (MARTÍNEZ-NAVARRETE et al., 2002). Estudos no Brasil apontam para prevalências de 15 a 50% entre crianças e 30 a 40% entre gestantes (BRASIL, 2006). Com o objetivo de combater essa deficiência, o Ministério da Saúde tornou obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico, através da Resolução da Anvisa RDC n° 344 de 13 de dezembro de 2002 (BRASIL, 2006).

Em estudo realizado por CUPPARI et al., (1989) avaliou o estado nutricional de cem pacientes, de dez centros de hemodiálise de São Paulo, utilizando o inquérito nutricional e a análise antropométrica, não foi observada alteração no peso dos pacientes, porém a prega cutânea triçiptal (PCT), estava diminuída, principalmente nas

mulheres (69%) e um perímetro braquial (PB), baixo, principalmente nos homens (79%), sendo que ambos os parâmetros pioraram com a hemodiálise.

Vários estudos comparativos apontavam a maior eficácia da via parenteral de ferro tanto na redução da dose de rHuEpo, como no tratamento da anemia nos pacientes renais em relação à suplementação oral (MACDOUGALL et al., 1996; FISHBANE et al., 1995). MACDOUGALL (1999) atribuiu esta vantagem da suplementação i.v. sobre a oral à maior disponibilidade do ferro para a demanda aumentada durante o tratamento com rHuEpo que freqüentemente deve exceder a quantidade máxima de ferro que pode ser suprida via oral. Entretanto, em estudos mais recentes, realizados em pacientes pré-diálise, com insuficiência renal progressiva (IRP), tratados com 300 mg de ferro (hidroxi-sacarato de ferro) i.v. não foi observada diferença significativa quanto à resposta na hemoglobina e à dose de rHuEpo quando comparados com pacientes IRP tratados com 600 mg/d de ferro oral (STOVES et al., 2001; TRIVEDI e BROOKS, 2003).

ARGARWAL et al., (2004) observaram um aumento significativo da peroxidação lipídica no plasma e urina, bem como, aumento da proteinúria e enzimúria nos pacientes com DRC, pré-diálise, 15 a 30 min após receberem uma dose de 100 mg/5min de hidroxi-sacarato de ferro i.v. Devido ao aparecimento precoce de proteínas na urina, os autores sugerem que o dano oxidativo observado nos lipídios tenha sido acompanhado de danos nos túbulos renais e possivelmente aumento da permeabilidade glomerular. Considerando que a saturação máxima de transferrina, 73%, foi alcançada somente após 3 horas da aplicação da i.v. e, que o estresse oxidativo ocorreu no momento em que havia uma substancial concentração de

transferrina disponível para ligar-se ao ferro livre, os autores sugerem ainda que o efeito tóxico da dose i.v. ocorra direto no endotélio, independente da saturação de transferrina nos indivíduos tratados com hidróxi-sacarato de ferro.

Considerando os novos avanços na compreensão do metabolismo do ferro (PONKA, 2000), os múltiplos fatores que interferem na homeostase deste (YAMAJIB et al., 2001), a associação de acúmulo de ferro nos tecidos com doenças crônicas degenerativas (EATON e QIAN, 2002), e os efeitos adversos observados em pacientes renais (BESARAB et al., 1999), a avaliação do status de ferro, função renal e o estresse oxidativo em pacientes com insuficiência renal, suplementados ou não com ferro, poderão fornecer evidências quanto a possíveis correlações entre níveis séricos de ferro e danos oxidativos. Poderão ainda fornecer evidências quanto a vantagens ou desvantagens do tratamento da anemia nesses pacientes, uma vez que tanto a injúria momentânea causada pela administração de ferro i.v. pode ser contrabalançada pelos benefícios da repleção de ferro e tratamento da anemia, quanto o estresse oxidativo e a injúria renal gerados pela sobrecarga de ferro, podem acelerar a falência dos rins e o aparecimento de outras doenças.

1.4 Referências Bibliográficas

ANDREWS, N. Iron Metabolism: Iron deficiency and iron overload. **Annu Rev Genomics Hum. Genet.**, v. 1, p. 75-98, 2000.

ARGARWAL, R. et al. Oxidative stress and renal injury with intravenous iron in patients with chronic kidney disease. **Kidney Int.**, v. 65, n. 6, p. 2279-2289, 2004.

ARMUTCU, F.; GUREL, A; AKER, A. Serum iron concentrations, lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in Turkish iron miners. **Environmental Geochemistry and health.**, v. 26, p. 1 – 4, 2004.

BASTOS, M. G. et al. Doença renal crônica: problemas e soluções. **J Bras Nefrol.**, v. 26, n. 4, p. 201-215, 2004.

BEARD, J. L.; CONNOR, J. R. Iron status and neural functioning. **Annu Rev Nutr.**, v. 23, p. 4158, 2003.

BERGSTROM, J. Why are dialysis patients mal-nourished? **Am J Kidney Dis.**, v. 26, p. 229-41, 1995.

BESARAB, A.; FRINAK, S.; YEE, J. An indistinct balance: the safety and efficacy of parenteral iron therapy. **J Am Soc Nephrol.**, v. 10, p. 2029-2043, 1999.

BOVELL-BENJAMIN, A. C.; GINARD, J. X. Novel approaches and application of contemporary sensory evaluation practices in iron fortification programs. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.**, v. 43, n. 4, p. 379 – 400, 2003.

BRANTEN, A. J. et al. Serum ferritin levels are increased in patients with glomerular diseases and proteinuria. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 19, n. 11, p. 2754-2760, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável.** Edição especial, 2005. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/nutricao/publicacoes.php> . Acesso em: 01 de maio 2006.

BRON, D.; MEULEMAN, N.; MASCAUX, C. Biological basis of anemia. **Seminars In Oncology**, v. 8, p. 1-6, 2001.

CUPPARI, L.; DRAIBE, A. S.; ANÇÃO, M. S. Avaliação nutricional em pacientes renais Crônicos em programa de hemodiálise. Estudo multicêntrico. **Rev Ass Med Brasil**, v. 35, p. 9-14, 1989.

DE FREITAS, J. M.; MENEGHINI, R. Iron and its sensitive balance in the cell. **Mutat Res**, v. 18, n. 475(1-2), p. 153-159, 2001.

DEUGNIER, Y. Iron and liver cancer. **Alcohol**, v. 30, p. 145 – 150. 2003.

EATON, J. W.; QIAN, M. Molecular bases of cellular iron toxicity. **Free Radic. Biol Med**, v. 32, n. 9, p. 833-840, 2002.

FERREIRA, A. L. A. e MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, n.1, p.61-68, 1997.

FISHBANE, S.; FREI, G. L.; MAESAKA, J. Reduction in recombinant human erythropoietin doses by the use of chronic intravenous iron supplementation. **Am J Kidney Dis**, v. 26, p. 41-46, 1995.

FRAZER, D. M.; ANDERSON, G. J. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? **Blood Cells Mol Dis**, v. 30, n. 3, p. 288-297, 2003.

GARDI, C. et al. Effect of free iron on collagen synthesis, cell proliferation and MMP-2 expression in rat hepatic stellate cells. **Biochem Pharmacol**, v. 64, n. 7, p. 1139-1145, 2002.

IFUDU, O. Maximizing response to erythropoietin in treating HIV – associated anemia. **Cleve Clin J Méd**, v. 68, n. 7, p.643-648, 2001.

JEHN, M.; CLARK, J. M.; GUALLAR, E. Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S.adults. **Diabetes Care**, v.27, n. 10, p. 2422-2428, 2004.

KALANTAR-ZADEH, K. K.; RODRIGUEZ, R. A.; HUMPHREYS, M. H. Association between serum ferritin and measures of inflammation, nutrition and iron in haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant.**, v.19, p.141–149, 2004.

KASSAB-CHEKIR, A. et al. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. **Clin Chim Acta.**, v. 338, n.1-2, p. 79-86, 2003.

LEVENSON, C. W.; TASSABEHJI, N. M. Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. **Ageing Research.**, v. 3, n. 251 – 263, 2004.

LUND, E. K. et al. Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunteers. **Am J Clin Nutr.**, v. 69, p. 250-255, 1999.

MACDOUGALL, I. C. et al. A randomized controlled study of iron supplementation in patients treated with erythropoietin. **Kidney Int.**, v. 50, p. 1694-1699, 1996.

MACDOUGALL, I. C. Strategies for iron supplementation: oral versus intravenous [Erythropoietin and Iron: Iron Therapy in Renal Failure Patients]. **Kidney Intern.**, v. 55, S 69, p. 61-66, 1999.

MANN, J. F. E. What are the short-term and long-term consequences of anaemia in CRF patients. **Nephrol Dal Transplant.**, v. 14, S 2, p. 29-36, 1999.

MAPRIL, J. et al. Avaliação nutricional numa população em hemodiálise. **Rev Port Nefrol Hipert.**, v.19, n. 1, p.37-45, 2005.

MARCKMANN, P. Nutritional status of patients on hemodialysis and peritoneal dialysis. **Clin Nephrol.**, v. 29, n. 2, p. 75-8. 1998.

MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. et al. Iron deficiency and iron fortified foods – a review. **Food Research International.**, v. 35,p. 225 – 231, 2002.

MARTINS, C.; RIELLA, M. C. Nutrição e hemodiálise. In: RIELLA, Martins C. **Nutrição e o rim**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 114-31.

NISSENSON, A. R.; STROBOS, J. Iron deficiency in patients with renal failure. **Kidney Int Suppl.**, v. 69, p. 18-21, 1999.

NKF-K/DOQI Clinical practice guidelines for nutrition in chronic kidney disease. **Am J Kidney Dis.**, v.35, S2, p. 140, 2000.

PIERRE, J. L; FONTECAVE, M. Iron and activated oxygen species in biology. **The basic chemistry BioMetals.**, v . 12, p. 195–199, 1999.

POLLA, A. S.; POLLA, L. L.; POLLA, B. Iron as the malignant spirit in successful ageing. **Ageing Research.**, v. 2, p. 25 – 37, 2003.

PONKA, P. Iron metabolism: physiology and pathophysiology. **The J Trace Elements in Experimental Medicine.**, v. 13, p. 73-83, 2000.

ROMÃO JUNIOR, J. E. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. **J Bras Nefrol.**, v. 26, SI 1, p. 1 -3, 2004.

ROMÃO JUNIOR, J. E.; CANZIANI, M. E.; BARRETTI, P. Anemia na insuficiência renal crônica: novas tendências. **J Bras Nefrol.**, S1, p. 1 – p. 10, 1999.

ROVER JUNIOR, L; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova.**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

SALONEN, J. T. et al. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. **Circulation.**, v..86, p. 803 – 811, 1992.

SESSO, R. Inquérito epidemiológico em unidades de diálise no Brasil. **J Bras Nefrol.**, v. 22, S 2, p.23-26, 2003.

STOVES, J.; INGLIS, H.; NEWSTEAD, C. G. A randomized study of oral vs intravenous iron supplementation in patients with progressive renal insufficiency treated with erythropoietin. **Nephrol Dialysis Transplantation.**, v. 16; p. 967-974, 2001.

TARNG, D. C. et al. Erythropoietin hyporesponsiveness: from iron deficiency to iron overload [Erythropoietin and Iron: Iron Therapy in Renal Failure Patients]. **Kidney Intern.**, v. 55, S 69, p.107 - 118, 1999.

TRINDER, D. et al. Molecular pathogenesis of iron overload. **Gut.**, v. 51, p. 290-295, 2002.

TRIVEDI, H. S.; BROOKS, B. J. Erythropoietin therapy in pre-dialysis patients with chronic renal failure: lack of need for parenteral iron. **Am J Nephrol.**, v. 23, p. 78-85, 2003.

TUOMAINEN, T. P. et al. Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men. **Circulation**, v. 97, p. 1461 – 1466, 1998.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 31 – 40, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION OBESITY. **Report of a joint expert consultation.** World Health Organization, Geneva, 2003.

XUE, J. L. et al. Forecast of the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2010. **J Am Soc Nephrol.**, v. 16, p. 1164-1165, 2005.

YAMAJIB, S. et al. Zinc regulates the function and expression of the iron transporters DMT1 and IREG1 in human intestinal Caco-2 cells. **FEBS Letters.**, v. 507, p. 137-141, 2001.

YUAN, X. M.; LI, W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. **Ann Med.**, v. 35, p. 578 – 591, 2003.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis.** 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999.

2. Justificativa

2. Justificativa

A alta prevalência de anemia em pacientes crônicos renais é comum, sendo que a base para o tratamento da anemia consiste na administração de eritropoetina humana recombinante (rHuEPO) e na suplementação parenteral de ferro. De acordo com as diretrizes atualmente preconizadas KDOQI, 2006 recomenda-se administrar Fe i.v. associado ao tratamento com rHuEPO mesmo em pacientes com status adequado de ferro (ABENSUR e ALVES, 2000). Entretanto, devido ao papel adverso que o ferro exerce no organismo, como o seu efeito pró - oxidante, vários estudos têm alertado quanto ao risco de aumento de estresse oxidativo e, conseqüentemente, aumento de danos celulares nesses pacientes, o que contribuiria para o agravamento da doença renal (YOSHIMURA et al., 2005; BISHU e AGARWAL, 2006 e MARUYAMA et al., 2007). Assim, a identificação de correlação ou associação do estado nutricional e estado oxidativo em pacientes com DRC, hemodialisados cronicamente, tratados ou não com ferro acrescenta evidências que devem ser consideradas na avaliação e tratamento da anemia nesses pacientes.

2.1 Referências Bibliográficas

ABENSUR, H.; ALVES, M. A. R. Diretrizes da Sociedade Brasileira de nefrologia para a condução da anemia na insuficiência renal crônica. **J Bras Nefrol.**, v. 22, p.1-3, 2000.

BISHU, K.; AGARWAL, R. Acute injury with intravenous iron and concerns regarding long-term safety. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v.1, p. 19-23, 2006.

MARUYAMA, Y.; NAKAYAMA, M.; YOSHIMURA, K.; NAKANO, H.; YAMAMOTO, H.; YOKOYAMA, K.; LINDHOLM, B. Effect of repeated intravenous iron administration in haemodialysis patients on serum 8-hydroxy-20-deoxyguanosine levels. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 22, p. 1407–1412, 2007.

YOSHIMURA, K.; NAKANO, H.; YOKOYAMA, K.; NAKAYAMA, M. High iron storage levels are associated with increased DNA oxidative injury in patients on regular hemodialysis. **Clin Exp. Nephrol.**, v. 9, p. 158-163, 2005.

3. Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente estudo visou verificar possíveis correlações e/ou associações entre os níveis de estresse oxidativo em pacientes renais, submetidos ou não a ferroterapia; além do estado nutricional.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o estado nutricional e consumo de nutrientes dos pacientes renais.
- Determinar o estado nutricional referente ao ferro nos pacientes renais.
- Avaliação do estado inflamatório no soro dos pacientes
- Avaliação do estresse oxidativo no soro dos pacientes.

4. Metodologia

4. Metodologia

Neste item encontram-se descritas as metodologias utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho de forma detalhada, uma vez que nos trabalhos publicados ou submetidos esta descrição é sucinta.

4.1 Local do Estudo e Amostra

O estudo foi realizado no Serviço de Nefrologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), que possui 54 pacientes inseridos no programa de hemodiálise regular. Foram incluídos no estudo, os pacientes maiores de 18 anos de idade, em programa de hemodiálise há pelo menos seis meses, e que não apresentavam nenhum outro tipo de doença consumptiva. Com base nos parâmetros citados, o grupo amostral foi constituído por 35 pacientes, correspondendo a 64,81% da população em diálise, no referido hospital, (16 homens e 19 mulheres). A coleta de dados sócio-econômicos, identificação completa do paciente, exames bioquímicos e anamnese alimentar foram realizados através de consulta ao prontuário e entrevista em novembro de 2005.

4.2 Sujeitos

4.2.1 Critérios de Inclusão

Pacientes dos dois gêneros, acima de 18 anos, com doença renal crônica (DRC) em programa de hemodiálise, há pelo menos seis meses, anêmicos ou não, [Ferritina sérica] entre 100 a 500 ng/mL ou saturação da transferrina sérica < 20%).

4.2.2 Critérios de Exclusão

Pacientes com patologias associadas ao metabolismo de ferro (talassemia, anemia falciforme, desordem na hematopoiese e outras); transplantados, com asma, com vírus da imunodeficiência humana (HIV), com câncer, artrite reumática, alcoolismo, doença hepática (vírus C ou B da hepatite) ou doenças inflamatórias. Pacientes nos quais a transfusão de sangue é necessária (HB < 8g/dL ou hematócrito < 20 %) ou que apresentam sangramento gastrointestinal, infecção urinária ou sistêmica, durante o período de estudo.

4.3 Desenho Experimental

Os pacientes que satisfizeram os critérios de inclusão e exclusão, após assinarem um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), (APÊNDICE 1), sobre o conteúdo e objetivos deste estudo, foram avaliados, segundo a presença ou não de anemia com componente de privação de ferro (hemoglobina, ferritina e saturação de transferrina). Entre o intervalo de sete a quinze dias após a última administração de ferro por via parenteral, amostras de sangue foram colhidas, em tubos com e sem ácido etilenodiaminotetraácetico (EDTA) e GSH. O frasco contendo anticoagulante, EDTA, foi utilizado para a obtenção de hemograma completo. As

amostras sem coagulante, foram utilizadas para determinação da ferritina sérica [FE], concentração de ferro sérico [Fe], peroxidação lipídica (malondialdeído – MDA), proteínas oxidadas (proteína carbonilada) e demais exames. Ao final da hemodiálise eram colhidas amostras de sangue para realizar uréia pós-diálise.

Todos os pacientes foram submetidos a três sessões de hemodiálise por semana com emprego de membrana biocompatível (Polissulfona), dialisato na base de Bicarbonato, máquinas individuais de proporção com fluxo de sangue de 300-350 ml/min, e fluxo de diálise de 500 ml/min. Segundo portaria interministerial que regulamenta o tratamento de substituição da função renal, os capilares podem ser reutilizados até 12 vezes. A água é tratada por equipamento de osmose reversa e sua composição e presença de possíveis contaminantes são controladas segundo normas técnicas vigentes. A dose de diálise é determinada pela técnica da cinética da uréia (Kt/V). (BRASIL, 2000). Quanto a utilização de medicação utilizaram-se inibidores de conversão de angiotensina, bloqueadores de canal de cálcio, bloqueadores do receptor da angiotensina 2, quelantes de fósforo e análogos da vitamina D (calcitriol). As estatinas e agentes antioxidantes (vitamina C ou E), não foram usadas.

4.4 Comitê de Ética

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEP/FS, UNB Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília - e obtendo aprovação (Registro do Projeto nº. 015/2005). Todos os pacientes concordaram em participar do estudo por meio de leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que lhes foi fornecido.

4.5 Avaliação Nutricional

4.5.1 Ingestão Dietética

- Recordatório de 24 horas (APÊNDICE 2). Foram aplicados três recordatórios 24h a cada participante, sendo dois recordatórios referentes a dias de semana e um a dia de final de semana. Este método tem a vantagem do baixo custo e menor tempo de administração. A aplicação foi realizada pela pesquisadora e uma nutricionista previamente treinada.
- Para avaliar a ingestão média de energia, proteína, carboidrato, lipídio, ferro, cálcio, fósforo e vitamina A foi empregado o método recordatório 24 horas. O registro foi feito em medidas caseiras sendo posteriormente convertidas em gramas, utilizando para análise da composição da dieta um banco de dados criado no Excel a partir das Tabelas de Composição de Alimentos (PHILLIPI, 2001 e NEPA, 2004). Para os alimentos fortificados com ferro, utilizou-se *USDA-Food Composition Products* (USDA, 2006), já que as tabelas brasileiras ainda não consideram a fortificação das farinhas de trigo e milho.

Os valores obtidos de consumo de energia e macronutrientes foram comparados às recomendações específicas para pacientes em hemodiálise (MARTINS e RIELLA, 2001). Quanto às vitaminas e aos oligoelementos utilizou-se o método proposto para avaliação de adequação da ingestão de nutrientes às necessidades do indivíduo saudáveis, utilizando os novos valores de referências das *Dietary Reference Intakes* (NRC, 2003). Esse método não é adequado para vitamina A, assim, empregou-se a porcentagem de adequação de consumo para este nutriente. Para os demais

nutrientes, foram abordados os aspectos sobre a utilização de inquéritos alimentares baseados em métodos que permitam uma estimativa quantitativa a mais acurada possível, sendo necessárias medidas repetidas, em dias não consecutivos. O consumo alimentar é ajustado pelas variâncias intra e interpessoal, obtendo-se uma distribuição corrigida por esses valores. A partir da construção da curva de distribuição utilizando-se os parâmetros corrigidos estimados (média e desvio-padrão), pode-se aplicar o método EAR (*estimate average requirement*) como ponto de corte para verificar a proporção de indivíduos cuja ingestão do nutriente está inadequada. Esse número corresponde à área da curva abaixo desse valor de referência.

4.5.2 Análise Antropométrica

- Após a sessão de hemodiálise foram obtidas as seguintes medidas antropométricas: peso corporal pós-diálise, estatura, prega cutânea tricipital (PCT), e a circunferência do braço (CB). Posteriormente calculou-se o índice de massa corporal (IMC), circunferência muscular do braço (CMB).
- ✓ **Peso:** O peso corporal representa o somatório dos compartimentos de minerais, água corporal total (intra e extracelular), glicogênio, proteína e gordura. O peso foi aferido com os indivíduos sem sapatos e menor quantidade de roupas possível, com o valor expresso em kilogramas. Utilizou-se balança plataforma da marca Filizola (São Paulo, Brasil), com capacidade de 150 kg e precisão de 100g, calibrada em cada mensuração com peso de 10 kg. **Estatura:** A estatura foi usada em associação com o peso na avaliação do estado nutricional, compondo o

índice de massa corporal. Para a obtenção da estatura, os indivíduos foram colocados sobre a plataforma da balança, de costas para o seu marcador, com os pés unidos, em posição ereta, com o olhar no horizonte. A leitura foi realizada no 0,5 centímetros mais próximo, quando a haste horizontal da barra vertical da escala da estatura encostou-se à cabeça do indivíduo. O **Índice de Massa Corporal** (IMC) foi calculado mediante a fórmula $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m)}$. Foram interpretados como indicadores, baixo peso < 18,5 Kg/m²; eutrofia entre 18,5 e 24,9 kg/m²; sobrepeso entre 25,0 e 29,9 Kg/m²; obesidade classe I entre 30,0 e 34,9 Kg/m²; obesidade classe II entre 35 e 39,9 Kg/m² e obesidade classe III > 40,0 Kg/m². (WHO, 1998). Ainda se empregou da Adequação do Peso (%), onde =

$$\text{Adequação Peso (\%)} = \frac{\text{peso atual} \times 100}{\text{peso ideal}}$$

Peso ideal – o cálculo do peso ideal ou desejável é pela utilização do índice de massa corporal (IMC): $\text{Peso ideal} = \text{IMC desejado Kg/m}^2 \times \text{estatura (m)}$.

Tabela1: Estado nutricional segundo adequação de peso.

Adequação Peso (%)	Estado Nutricional
< 70	Desnutrição grave
70,1 --- 80	Desnutrição moderada
80,1 --- 90	Desnutrição leve
90,1 --- 110	Eutrofia
110,1 --- 120	Sobrepeso
> 120	Obesidade

Fonte: Blackburn e Bistran, 1977

- ✓ **Prega cutânea:** A prega cutânea tricaptal (PCT) é um bom indicador da quantidade de tecido adiposo subcutâneo e guarda boa correlação com o total de gordura corporal. O aparelho utilizado foi plicômetro científico com pressão uniforme de 10g/mm e sensibilidade 0,1 mm da marca Cescorf (Porto Alegre, Brasil). **Aferição da prega cutânea do tríceps:** O local de medição da PCT foi o ponto médio entre o acrômio da escápula e o olécrano da ulna. O ponto médio foi obtido com o braço flexionado em 90°. Após a marcação do ponto médio, pinçou-se o correspondente ao subcutâneo, mensurando-o com o plicômetro. Foram feitas três medidas, assumindo-se como resultado final à média das três mensurações. (FRISANCHO, 1981).

$$\text{Adequação da PCT (\%)} = \frac{\text{PCT obtida (mm)}}{\text{PCT percentil 50}} \times 100$$

Tabela 2: Estado nutricional segundo adequação de prega cutânea tricaptal.

Adequação PCT (%)	Estado Nutricional
< 70	Desnutrição grave
70 --- 80	Desnutrição moderada
80 --- 90	Desnutrição leve
90 --- 110	Eutrofia
110 --- 120	Sobrepeso
> 120	Obesidade

Fonte: Frisancho, 1990.

✓ **Circunferência:** As medidas das circunferências sozinhas ou em combinação com as pregas cutâneas são medidas de crescimento e podem indicar o estado nutricional e o padrão de gordura corporal. Foi utilizada fita métrica inextensível e inelástica com comprimento de 150 cm, com graduação de 0,1 cm.

Circunferência muscular braço (CMB): Este parâmetro avalia a reserva de tecido muscular (sem correção da área óssea). É obtido a partir dos valores da circunferência do braço (CB) e da prega cutânea tricipital (PCT):

A seguinte fórmula foi empregada no cálculo da circunferência muscular do braço.

$$\text{CMB (cm)} = \text{CB (cm)} - (\text{PCT em mm} \times 0,314)$$

O cálculo de adequação CMB é realizado por meio da fórmula abaixo classificando o estado nutricional.

$$\text{Adequação da CMB (\%)} = \frac{\text{CMB obtida (cm)} \times 100}{\text{CMB percentil 50}}$$

Tabela 3: Estado nutricional segundo adequação da circunferência muscular do braço.

Adequação CMB (%)	Estado Nutricional
< 70	Desnutrição grave
70 --- 80	Desnutrição moderada
80 --- 90	Desnutrição leve
90	Eutrofia

Fonte: Blackburn e Bistran, 1977

- A classificação do estado nutricional baseou-se na adequação das medidas da PCT e CMB, classificando o estado nutricional de acordo com (BLACKBURN, 1977). Foram considerados com desnutrição ou com risco de desnutrição os pacientes com valores de PCT e/ou CMB \leq percentil 5 do padrão de referência.
- Todas as pregas cutâneas foram realizadas no braço contrário a fistula arteriovenosa.

4.5.3 Análise Bioquímica

Hemograma completo, ferro sérico, uréia, creatinina sérica, PCR, saturação de transferrina, albumina, PTH, cálcio, fósforo e potássio foram realizados com técnicas padronizadas no Laboratório de Análises Clínicas do HUB. Demais análises como proteína carbonilada, malondialdeído (MDA) e ferritina sérica foram realizadas no laboratório de Biofísica na Universidade de Brasília.

- Hemograma completo foi obtido em contador de célula Cell-Dyn 3700SL, no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário.
- [Ferritina]_{sérica} foi determinada por método imunoenzimático, ELISA, utilizando o Kit da Katal biotechnology - Brazil.
- [Fe]_{sérico} foi aferido no equipamento ARCHITECT C 8000, com Kit específico da Sinermed, pelo método ferrozine.
- A creatinina sérica foi determinada por método colorimétrico cinético (Folin modificado) no equipamento MEGA da Bayer.
- A dosagem da PCR – Proteína C Reativa foi feita por método nefelometria no equipamento BM2, Date Behring, Alemanha.

- A Transferrina foi aferido no equipamento MEGA da Bayer, com Kit específico da Sinermed.
- A saturação de transferrina foi calculada pela fórmula: Saturação de transferrina (%) = ferro (mg/dL)/transferrina (mg/dL) x 100
- A Albumina foi aferida no equipamento ARCHITECT C 8000, empregando-se o método utilizado foi o verde bromocresol.
- A uréia foi aferida pelo equipamento ARCHITECT C 8000, pelo método uréase.
- O cálcio foi realizado no equipamento ARCHITECT C 8000, pelo método arsenazo III.
- O fósforo foi realizado no equipamento ARCHITECT C 8000, pelo método fosfomolibdato.
- O potássio foi realizado no equipamento AVL 9000180 pelo método eletrodo íon seletivo.
- O PTH foi realizado no equipamento IMMULITE pelo método quimiluminescência.
- A eficiência da diálise foi estimada por meio do cálculo do Kt/V pela fórmula de (DAUGIRDAS, 1993).

4.5.3.1 Avaliação do Estado de Estresse Oxidativo

4.5.3.1.1 Preparo das Amostras

- A colheita de sangue foi realizada entre os dias 07 a 11 de novembro do ano de 2005. Foi colhida dos pacientes em diálise do HUB, em jejum de 12 horas, durante a hemodiálise, uma amostra de 8mL de sangue em tubos com tampa de polietileno a vácuo, com gel separador. Esta amostra transportada imediatamente, a

temperatura ambiente, para o Laboratório de Biofísica da UnB. Os pacientes que realizavam hemodiálise no período vespertino foram orientados para a colheita de sangue no período da manhã. As amostras de sangue foram centrifugadas (3500 rpm por 10 minutos) para obtenção do soro, que foi transferido para um eppendorf, em seguida adicionou-se EDTA e GSH na concentração final de 1,34 e 0,65 mmol/L respectivamente; imediatamente os tubos foram colocados em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C , para a determinação da concentração de ferritina e biomarcadores de estresse oxidativos. Para os demais exames o sangue foi colhido pelo próprio laboratório do HUB, seguindo os procedimentos padronizados do hospital: paciente em jejum, no horário de 07:00h às 08:00h da manhã, antes da sessão da hemodiálise, em tubos com e sem EDTA a depender do exame.

Peroxidação lipídica: Níveis de malonaldeído (MDA) sérico: foi realizado segundo o método descrito por (WASOWICZ et al., 1993). Foi detectado por fluorescência baseado na reação entre MDA e ácido de tiobarbitúrico (TBA). Em 50 μL de soro, 1 mL de água MilliQ e 1 mL de TBA 29 mmol/L em ácido acético foram adicionados a cada tubo, agitado e aquecido em banho de água a 100°C durante 1 hora. Depois de esfriar, 25 μL de HCl 5 mol/L e 3,5 mL de n-butanol, foram adicionados aos tubos foram agitados durante 5 segundos em vórtex. A fase alcoólica foi separada através de centrifugação a $900 \times g$ durante 10 minutos. A fluorescência da amostra foi determinada a 547 nm com excitação a 525 nm, em fluorimêtro (FP-777 JAS - CO). Uma curva padrão foi preparada utilizando soluções padrão 1,1,3,3- tetraetoxipropano (Sigma, Alemanha) na faixa de concentração de 0 – 0,150 $\mu\text{mol/L}$, linearidade de 0,9816.

Proteína carbonilada sérica: Determinada segundo o método descrito por (RICHERT et al., 2002). Este método consiste em precipitação de proteínas totais do soro, e conseqüente formação de um complexo entre o grupo carbonil das proteínas oxidadas e o composto 2,4 dinitrofenilhidrazina, detectado e quantificado por espectrofotometria (376 nm). Para tanto 50 μ L de soro em 950 μ L de Tris HCl 25mmol/L uréia 6mmols/L pH 9,0. A amostra foi dividido então em 3 alíquotas de 200 μ L (volume de soro com aproximadamente 500 mg de proteína); sendo um total de 5 alíquotas, incluindo um branco sem dinitrofenilhidrazina e reservando uma para análise de proteínas totais. Adicionar 200 μ L de TCA 20%, centrifugar 13000 rpm/1 min e descartar o sobrenadante. Em seguida ressuspender o pelete em 200 μ L de Tris HCl 25 mM uréia 6mol/L pH 9 e adicionar a amostra 700 μ L de 2,4 dinitrofenilhidrazina 0,2% em HCl 2 mol/L e ao Branco 700 μ L de HCl 2 mol/L . Agitar por 15 min a 4°C no shaker em velocidade máxima. Adicionar 700 μ L de TCA 20%, centrifugar 13000 rpm / 1 min, descartar o sobrenadante e lavar três vezes com 1 mL de etanol: acetato de etila 1:1 a temperatura ambiente, desintegrar o pelete com uma ponteira. Agitar no vórtex e centrifugar a 13000 rpm / 1 min a cada lavada. Após a terceira lavagem deixar o pelete secar ao ar. Ressuspender em 500 μ L de guanidina 6 mol/L em fosfato de potássio 500 mol/L pH 2,5. Agitar no vórtex e posteriormente agitar por 30 min no shaker a 4°C. Determinar a absorbância de 376 nm. O processo de análise para proteínas totais consiste em retirara 2 μ L da alíquota de soro homogeneizado com Tris HCl 25 mol/L uréia 6 mol/L pH 9, adição de 198 μ L de água MiliQ e 1 mL de solução X (0,2 mL de CuSO₄ 1%; 0,2 mL de tartarado de Na e K 1% - estes sofrem uma mistura e depois acrescentam-se 20mL Na₂CO₃ 2% em NaOH 0,1 mol/L). Agitar no vórtex, deixando

descansar por 10 minutos. Adicionar 100 μ L de Folin e agitar no vórtex. Deixar descansar por 20 minutos. Ler absorbância a 660 nm. (LOWRY et al.; 1951)

4.6 Metodologia do Pareamento

4.6.1 Sujeitos

Para o pareamento foram selecionados indivíduos saudáveis, com idade, sexo e padrão sócio-econômico semelhante aos pacientes renais. Esses indivíduos considerados saudáveis foram selecionados de uma amostra de moradores, conforme a idade e sexo para formar o pareamento, residentes nas cidades de São Sebastião e Sobradinho no Distrito Federal, participantes do estudo piloto do projeto “*Prevalência dos fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis no Distrito Federal*” (VIVA), desenvolvido pela Universidade de Brasília e Secretaria de Saúde do Distrito Federal, cuja seleção dos participantes e colheita de sangue estão descritos detalhadamente em (YOKOTA et al., 2007). As amostras do sangue dos indivíduos saudáveis foram transportadas para o laboratório, sendo tratadas conforme descrito para a amostra de sangue dos pacientes em hemodiálise. O soro foi armazenado a – 70 °C para a análise de ferritina e estresse oxidativo. Esses indivíduos saudáveis foram considerados no presente estudo como grupo controle, para as análises comparativas entre indivíduos saudáveis e pacientes.

Consumo alimentar de ferro dos indivíduos saudáveis foi descrito por YOKOTA et al., 2007; onde foi aplicado questionário com perguntas sobre o consumo de frutas e hortaliças. A aplicação foi realizada por nutricionistas e alunas do curso de nutrição da

Universidade de Brasília previamente treinadas. Os dados de consumo alimentar foram inseridos em planilha do Excel para cálculo da composição nutricional, com base nas tabelas de composição de alimentos da (USDA, 2006 e PHILIPPI 2001).

4.7 Análise Estatística

Foi utilizado o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade das distribuições de todas as variáveis estudadas (programa SPSS *for Windows*, versão 13.0 (SPSS, 2004)). Para verificar diferença entre as médias e medianas das variáveis, foram utilizados os testes t de “student” ou Mann Witney. Conforme a distribuição destas – os testes t de “student” ou Mann Witney foi empregado para comparar variáveis contínuas e o teste qui quadrado e exato de Fischer para variáveis categóricas. Uma análise de regressão de logística binária foi empregada para avaliar a correlação entre o estado nutricional (variável dependente) e os níveis de ferritina, MDA, Proteína Carbonilada, PCR (variáveis independentes). Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

4.8 Referências Bibliográficas

BLACKBURN, G. L.; BISTRAN, B. R. Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient. **JPEN.**, v. 1, p. 11-22, 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM nº 82, de 3 de janeiro de 2000. Política Nacional da Atenção ao portador de doença renal.

DAUGIRDAS, J. T. Second generation logarithmic estimates of single pool variable volume K_t/V : an analysis of error. **J Am Soc Nephrol.**, v. 4, p. 1205-1213, 1993.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. United States Department of Agriculture. Food and Nutrition Information Center. **Food composition**: nutrient data laboratory. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acesso em 20 de abr. 2006.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. United States Department of Agriculture. Agricultural research service. Nutrient data laboratory. Food composition products. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/> Acesso em: 23 de mar. 2006.

FRISANCHO, A. R. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. **Am J Clin Nutr.**, v. 34, p. 2540-2545, 1981.

FRISANCHO, A. R. **Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status**. University of Michigan, 1990, 189 p.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent., **J Biol Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265 - 275, 1951.

MARTINS, C.; RIELLA, M. C. Nutrição e hemodiálise. In: RIELLA, Martins C. **Nutrição e o rim**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.114-131.

NATIONAL ACADEMIV PRESS – NRC. **Dietary reference intakes: applicayions in dietary assessment**. Washington DC: National Academiv Press, 2003. 256 p.

NEPA; UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2004. 42 p.

PHILLIPI, S. T. **Tabela de composição de alimentos**: suporte para decisão nutricional. 1. ed, Brasília: FINATEC, 2001. 107 p.

RICHERT, S. et al. Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age. **Archives of biochemistry and biophysics.**, v. 397, n. 2, p. 430 – 432, 2002.

STATICAL Package for the Social Sciences for Windows. Student version. Release 13.0 Marketing Departamento, Chicago, 2004.

WASOWICZ, W.; NEVE, J.; PERE, A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituricAcid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. **Clin. Chem.**, v. 39, n. 12, p. 2522-2526, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION OBESITY. **Presenting and managing the global epidemic**. Reporto f a WHO consulting on obesity. Geneve, 1998.

YOKOTA, R.T.C. et al. Prevalência de fatores de risco para doenças crônicas não-transmissíveis em duas regiões do Distrito Federal. **Com. Ciências Saúde.**, v. 18, n. 4, p. 289-296, 2007.

5. Capítulo 1: *Papel adverso do ferro no organismo*

5. Capítulo 1: Papel adverso do ferro no organismo

The adverse role of iron in the organism

“Siqueira EMAS, Almeida SG, Arruda SF. Papel Adverso de Ferro no Organismo. Ciênc Saúde. 2006;17(3):229-236”

Egle Machado de Almeida Siqueira¹

Simone Gonçalves de Almeida²

Sandra Arruda¹

¹ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

² Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

Correspondência

Egle Machado de Almeida Siqueira

Campus Universitário Darcy Ribeiro

ICC - Sul, Módulo 3 Asa Norte

Brasília, Distrito Federal, Brasil

70790-160

eglemasi@unb.br

Resumo

Introdução: Devido a seu potencial redox, o ferro tornou-se o metal mais comumente utilizado na maioria dos sistemas biológicos. Nos seres vivos, exerce função essencial como cofator nas reações de transferência e conservação de energia, além de participar de vários outros processos como o transporte de oxigênio e síntese de biomoléculas. Entretanto, devido a essa versatilidade química, o ferro pode transferir elétrons para o oxigênio molecular, capazes de promover a oxidação de diversas moléculas e danos oxidativos celulares. Assim, tanto a deficiência quanto o excesso de ferro no organismo são responsáveis por um amplo espectro de doenças, variando desde a anemia até a sobrecarga. Esta revisão focaliza os recentes progressos no estudo do metabolismo e da homeostase do ferro, bem como as causas e conseqüências da deficiência e sobrecarga de ferro.

Método: Foram utilizadas as bases de dados Medline, Scielo e Lilacs, além de documentos governamentais e não-governamentais e sites na Internet.

Considerações finais: Indubitavelmente, a anemia continua sendo um dos principais problemas atuais de saúde pública, atingindo principalmente crianças menores de 24 meses e gestantes, devendo ser severamente combatida. Entretanto, o acentuado aumento da expectativa de vida ocorrido neste último meio século, que vem modificando as pirâmides demográficas de idade na direção da senilidade, tem contribuído para o aumento na prevalência de doenças crônicas não transmissíveis devido ao processo de envelhecimento. Assim, políticas de saúde pública que visam combater deficiências nutricionais devem considerar os fatores de risco para a

população idosa que começa a representar uma fração significativa das populações em todos os países.

Palavras-chave: ferro, anemia, estresse oxidativo, homeostase do ferro, doenças degenerativas, envelhecimento precoce.

Abstract

Introduction: Due to its potential redox, the iron became the most common metal used in the majority of biological systems. It exerts essential function as a cofactor in the transference and conservation of energy reactions. Besides, it participates of several other processes such as the oxygen transport and molecular biosynthesis. However, its chemical versatility, allows the iron to transfer electrons to the molecular oxygen, which are capable to cause molecular oxidation and oxidative cellular damages. Thus, the iron deficiency as well as the iron excess in the organism may be responsible for an ample specter of illnesses, varying from anemia until iron overload. This article, focus the recent progresses in the study of iron metabolism and homeostasis, as well as the causes and consequences of deficiency and overload of iron.

Method: The databases Medline, Scielo and Lilacs have been consulted, besides governmental and not-governmental documents and sites in Internet.

Final considerations: Undoubtless, anemia continues to be one of the main current problems in public health, predominantly in children under 24 months of age and in pregnant women, and it must be seriously faced. However, the increase of life expectancy observed in the last half century, have modified the age demographic pyramid in the direction of senility, and have contributed for the increase in the prevalence of the chronic noninfectious diseases due to the aging processes. Thus, public health policies that aim to combat nutritional deficiencies must consider the risks factors for aged people, that begins to represent a significant part of the populations in all the countries.

Key words: iron, anemia, oxidative stress, iron homeostasis, degenerative diseases and precocious aging.

Introdução

O excesso de ferro é letal, entretanto sua escassez é incompatível com a vida. O ferro é essencial para várias funções metabólicas dos seres vivos¹. Em humanos, a deficiência compromete o desenvolvimento cognitivo, aumenta a morbimortalidade materna e infantil, reduz a capacidade de trabalho e a resistência imunológica^{2,3}. Por outro lado, o envolvimento do ferro na formação de radical hidroxil, via reação de Fenton⁴, e a associação de processos patológicos e envelhecimento precoce com o acúmulo de ferro em tecidos⁴, alertam para sua toxicidade. Embora exista um eficiente mecanismo molecular mediado pelo próprio *status* de ferro que regula sua absorção e armazenamento mantendo a homeostase do ferro no organismo⁵, dietas extremamente deficientes ou com excesso de ferro, ou ainda, a deficiência de outros micronutrientes, podem interferir nessa homeostase, resultando na deficiência ou acúmulo de ferro tecidual. A presente revisão discute o papel adverso do ferro no organismo, focalizando os recentes progressos no estudo do metabolismo e da homeostase desse elemento, bem como as causas e conseqüências da deficiência de ferro, e ainda, adverte para o risco de sobrecarga de ferro na população idosa.

Método

Para esta pesquisa foram utilizadas as bases de dados Medline, Scielo e Lilacs, além de documentos governamentais e não-governamentais e sites na Internet. Utilizando como referências os termos estresse oxidativo, doenças degenerativas e envelhecimento precoce.

Revisão de literatura

1 A escassez é incompatível com a vida

O ferro é um elemento fundamental para várias funções metabólicas da maioria dos seres vivos, com exceção de alguns microrganismos da família *Lactobacillus*⁴, participa no transporte de oxigênio, síntese de DNA, reações redox na cadeia de transporte de elétrons, além de fazer parte da estrutura molecular de diversas proteínas e enzimas⁵. Portanto, o ferro é um elemento essencial para as transformações de energia que ocorrem nos sistemas biológicos, sem o qual, a vida não seria possível. Apesar de sua essencialidade, os valores de referência diárias de ferro para indivíduos saudáveis foram recentemente revisadas pelo *Institute of Medicine's and Food and Nutrition Board*⁶. Com exceção do valor de referência para mulheres entre 19 e 30 anos (que foi alterado de 15 para 18 mg/ dia), há uma tendência de redução para todas as faixas etárias em relação às recomendações de 1989. Para crianças de 1 a 3 anos, 4 a 8 anos e 9 a 13 anos, cujo valor de referência era de 10 mg/dia, houve mudanças para 7, 10 e 8 mg/dia, respectivamente. Para homens e mulheres, acima de 13 anos de idade, nos quais os valores de referência variavam de 10 a 12 mg/dia e 10 a 30 mg/dia, hoje apresentam variação de 8 a 11 mg/ dia e 15 a 27 mg/dia, respectivamente. Para definição desses valores foram levados em consideração perdas férreas basais, perdas menstruais, exigências fetais em gravidez, demanda aumentada durante crescimento para a expansão de volume de sangue, entre outros⁶.

2 Deficiência de ferro no organismo

Embora seja um dos minerais mais abundantes na crosta terrestre, a deficiência de ferro é um dos problemas nutricionais mais comuns, que acomete populações em todo

o mundo, mesmo nos países mais desenvolvidos⁷. Anemia nutricional é definida como um estado em que a concentração de hemoglobina no sangue é baixa em consequência da carência de um ou mais nutrientes essenciais, qualquer que seja a origem dessa carência⁸. Alguns autores acreditam que 90% da anemia mundial decorram da deficiência de ferro⁹ ou anemia ferropriva que é o resultado de um longo período de balanço negativo entre a quantidade de ferro biodisponível ingerido e a necessidade orgânica desse elemento¹⁰. Essa deficiência constitui sério problema de saúde pública, porque compromete o desenvolvimento físico e cognitivo das crianças, aumenta a morbimortalidade materna e infantil, reduz a capacidade de trabalho do indivíduo e a resistência imunológica^{2,3}, fatores determinantes do empobrecimento e da reduzida qualidade de vida das populações.

3 Metabolismo e biodisponibilidade

Para que ocorra a absorção do ferro inorgânico (Fe+3), forma encontrada nos alimentos de origem vegetal, é necessária a sua redução à forma ferrosa (Fe+2). Alguns compostos, como o ácido ascórbico, açúcares e aminoácidos, formam quelatos de baixo peso molecular com o ferro, facilitando sua absorção intestinal que é mediada por proteínas transportadoras de ferro, localizadas na superfície luminal das membranas dos enterócitos duodenais¹¹. Vários fatores podem reduzir a absorção do ferro no intestino, tais como, as fibras alimentares que aceleram o trânsito dos alimentos no lúmen, o fitato e os polifenóis que formam quelatos insolúveis, reduzindo a biodisponibilidade do ferro¹². Diferente do ferro inorgânico, o ferro heme, proveniente das carnes, é altamente biodisponível e sua absorção independe da ação do ácido ascórbico ou de agentes quelantes. Após a absorção do grupo heme na mucosa

intestinal, o ferro é liberado do anel porfirínico pela ação da enzima heme-oxigenase⁴. Nos vertebrados, o ferro é transportado, entre os sítios de absorção, armazenamento e utilização, por uma glicoproteína plasmática denominada de transferrina (Tf), que se liga firmemente e de forma reversível ao ferro. A transferrina é reconhecida por receptores de membrana celulares específicos (TfR), cruciais para a captação de ferro pelas células. Após a liberação intracelular do complexo Tf-TfR, o ferro penetra em compartimentos funcionais ou é armazenado na ferritina^{1,4,11}. Devido à menor biodisponibilidade do ferro inorgânico, acreditava-se que indivíduos vegetarianos apresentassem maior incidência de deficiência de ferro e anemia em relação a indivíduos onívoros. No entanto, um estudo comparativo revelou que embora os indivíduos vegetarianos apresentassem menor concentração de ferritina sérica, eles não eram mais deficientes ou anêmicos que os indivíduos onívoros¹³. Alguns autores¹⁴ verificaram que apesar da absorção de ferro em uma dieta lactoovovegetariana ser menor que a de uma dieta não vegetariana, após oito semanas de consumo das dietas, as concentrações de hemoglobina, transferrina saturada, protoporfirina eritrocitária ou ferritina sérica não sofreram alterações. Os autores observaram, no entanto, uma redução significativa na excreção da ferritina fecal nos indivíduos lactoovovegetarianos, sugerindo uma adaptação fisiológica que compensa a redução na absorção de ferro inorgânico.

4 Sensível regulação molecular da homeostase do ferro

Além da adaptação fisiológica, a regulação da absorção de ferro intestinal parece ser o mecanismo mais importante na manutenção de sua homeostase no organismo. Devido a esse mecanismo, em uma dieta humana normal (13 a 18 mg de ferro/dia), apenas

1mg do ferro dietético é absorvido. Na deficiência, a absorção pode atingir um máximo de 4 mg, enquanto em indivíduos com excesso de ferro, a absorção pode ser reduzida a 0,5 mg¹¹. Vários autores têm descrito um mecanismo molecular que regula a absorção intestinal do ferro em função do *status* desse elemento no organismo^{1,2,11}. Esse fino ajuste entre a absorção e *status* de ferro é mediado por proteínas responsivas ao ferro, que regulam a síntese da ferritina, do receptor de transferrina, dos transportadores e outras proteínas envolvidas no metabolismo de ferro¹¹. Entretanto, a existência de um fino mecanismo molecular da regulação da absorção do ferro inorgânico no intestino, mediado pelo próprio *status* de ferro, bem como um mecanismo de adaptação fisiológica que regula a excreção de ferritina fecal, conforme a maior ou menor biodisponibilidade de ferro dietético, somados ao fato da relativa abundância de ferro nas dietas, geram questões dicotômicas, tais como: se há este ajuste que permite regular a absorção do ferro dietético conforme a necessidade do indivíduo, por que existem então tantos anêmicos no mundo? E, ainda, dada à importância do ferro no sistema biológico, por que durante o processo evolutivo o organismo humano não aumentou sua eficiência na absorção deste?

5 Influência de outros micronutrientes na homeostase do ferro

A ocorrência de outros fatores, diferente da disponibilidade de ferro dietético, pode perturbar a homeostase do ferro, provocando um balanço negativo desse no organismo. Em um estudo realizado em 1998¹⁵, foi observado que o ferro reduzia significativamente a absorção do zinco quando ambos foram administrados simultaneamente em solução, sugerindo uma competição entre os dois elementos.

Vários estudos sugerem um efeito positivo tanto da vitamina A quanto dos carotenóides na absorção de ferro^{16,17}.

Alguns autores sugerem o envolvimento da vitamina A na homeostase do ferro no organismo^{18,19}. E ainda, pacientes com a ceruloplasmina hereditária ou deficiência de cobre apresentam baixos níveis de ferro plasmático, porém significativo acúmulo de ferro no fígado, pâncreas, cérebro e rim. Acredita-se que essa sobrecarga de ferro seja devida à redução da atividade da ferroxidase cobre dependente da ceruloplasmina, que seria responsável pela oxidação do Fe²⁺ a Fe³⁺, forma na qual é liberado dos enterócitos para transferrina plasmática^{20,21}. Portanto, a deficiência múltipla de microelementos no organismo pode alterar o *status* de ferro produzindo a anemia ferropriva.

6 Perda de sangue e processos inflamatórios

Parasitoses intestinais, bem como a perda excessiva de sangue no período reprodutivo em mulheres, além de outros, são exemplos de processos que produzem um balanço negativo do ferro no organismo e que podem, portanto, levar a anemia ferropriva²². Um estudo realizado em gestantes em South Malawi (África) evidenciou a importância das inflamações crônicas na determinação da anemia em mulheres²³.

7 Condições socioeconômicas

Estima-se que cerca de 2 a 3 bilhões de pessoas no mundo sofram de deficiência de ferro e desse total, 1 a 2 bilhões tenham anemia ferropriva. Porém, a maior incidência de ambas ocorre nos países em desenvolvimento³. No Brasil, a incidência maior de anemia concentra-se em algumas áreas menos desenvolvidas. A carência de inquéritos populacionais amplos dificulta a avaliação do problema para toda a

população. A anemia está freqüentemente associada com condições socioeconômicas desfavoráveis, acarretando diferenças na sua distribuição por regiões brasileiras, registrando-se maiores índices nas áreas mais pobres do país. Estudos realizados nos estados da Paraíba e São Paulo evidenciaram tendência ao aumento da freqüência de anemia apesar dos avanços terapêuticos e do aumento do conhecimento sobre as formas de profilaxia²⁴. Um estudo realizado em São Paulo mostrou que as famílias de menor poder aquisitivo e nível de escolaridade apresentavam maior prevalência de anemia, evidenciando o estreito relacionamento da condição socioeconômica com a etiologia da doença^{25,26}.

8 O excesso de ferro é letal

Quanto à segunda questão, a aparente incoerência evolutiva referente à baixa eficiência dos sistemas biológicos para a captação do ferro dietético, resulta, na verdade de um eficiente sistema de proteção do organismo contra potenciais danos oxidativos mediados pelo ferro²⁷.

9 Toxicidade do ferro no organismo

O ferro é essencial para a vida porque tem a capacidade de receber e transferir elétrons, participando como catalisador das reações redox que ocorrem nas células. Exatamente devido à alta reatividade, o ferro torna-se potencialmente tóxico, uma vez que catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), transferindo um elétron para o oxigênio molecular (O_2), produzindo o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é o precursor do peróxido de hidrogênio²⁷. Esse último, o H_2O_2 , por sua vez, reage com o Fe^{+2} gerando o potente radical hidroxil ($HO\bullet$), através da reação de Fenton²⁷. Tais espécies radiculares podem promover a oxidação de diversas moléculas e organelas

promovendo danos celulares²². O acúmulo de ferro nos tecidos, células e organelas tem sido associado a diversos processos patológicos, tais como câncer, doenças hepáticas e cardíacas, diabetes, disfunções hormonais e do sistema imunológico e mesmo doenças crônicas degenerativas^{28,29,30}. Um estudo realizado em homens voluntários demonstrou que a suplementação da alimentação com sulfato ferroso, na concentração de 19 mg de ferro/dia, durante duas semanas, resultou em um aumento nas concentrações de ferro e radicais livres nas fezes desses indivíduos³¹. Esses resultados corroboram com a tese de aumento de suscetibilidade a processos carcinogênicos em indivíduos suplementados com ferro. O fígado é um dos órgãos mais afetados pelos altos níveis de ferro no organismo, pois as células hepáticas constituem o principal sítio de armazenamento desse elemento, assim, a ingestão em excesso induz a um acúmulo de ferro hepático. Tais efeitos podem levar a uma disfunção hepática e desencadear o processo de fibrogênese^{28,29}, devido ao excesso de ferro que parece estimular a síntese de colágeno, iniciando a fibrogênese e, conseqüentemente, a necrose hepatocelular²⁸. Além disso, danos no DNA causados pelos radicais livres gerados, podem induzir uma proliferação e diferenciação desordenada das células troncohepáticas, resultando em carcinoma hepático²⁹. Elevados estoques de ferro têm sido associados com um risco aumentado para infarto do miocárdio, assim como diversos dados sugerem que níveis decrescentes do íon podem prevenir algumas doenças^{30,32}.

10 Envolvimento do ferro em processo patológico

O envolvimento do ferro em processos neurodegenerativos, como o Mal de Alzheimer, tem sido identificado³³. Nessa patologia, as alterações na homeostase do ferro foram

evidenciadas através do aumento dos níveis séricos de uma proteína que se liga ao ferro, denominada p97. O acúmulo de ferro está relacionado com o aparecimento das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares, típicos dessa enfermidade³⁴. Acredita-se que o acúmulo de ferro nos neurônios provoque a peroxidação lipídica das membranas dessas células, tornando-as mais susceptíveis a toxinas, que causam disfunção celular³⁵. Outras patologias ligadas ao excesso de ferro no organismo são as formas hereditárias. Uma das mais comuns e mais conhecidas é a hemocromatose hereditária, doença autossômica recessiva geralmente resultante de uma mutação homocigota no gene Hfe³⁶. Indivíduos com essa deficiência absorvem de duas a três vezes mais ferro que indivíduos normais²². Com a evolução da doença os pacientes podem desenvolver processos inflamatórios no fígado progredindo para fibrose e cirrose, além da incidência de carcinoma.

11 Envelhecimento celular

A teoria do envelhecimento pela oxidação é fundamentada na perda do equilíbrio entre agressores oxidantes e defensores antioxidantes, e na evidência de que muitas doenças associadas à idade são causadas pelo aumento da produção ou exposição a oxidantes e subseqüentes doenças oxidativas³⁷. Devido ao envolvimento do ferro na produção de EROs, a quelação do ferro ou a sua privação controlada tem sido apontada como uma terapia alternativa para as patologias associadas ao estresse oxidativo e envelhecimento³⁸. Polla et al., em uma revisão sobre o efeito do ferro no organismo³⁸, associam a maior longevidade em mulheres com a deficiência crônica de ferro ao longo de sua vida reprodutiva, devido à menstruação e gravidez. As autoras concluem ainda que o acúmulo de ferro no organismo seja um fator oxidante e sua

privação relativa preveniria inúmeras lesões orgânicas e, conseqüentemente, retardaria o envelhecimento e a morte do indivíduo.

Considerações finais

Indubitavelmente, a anemia é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, que precisa ser combatida. Porém, considerando-se o papel adverso do ferro no organismo e o fino equilíbrio alcançado através do controle de sua absorção e excreção, bem como, da multiplicidade de fatores e nutrientes envolvidos nesta homeostase, estratégias de combate à anemia devem ser pontuais, direcionadas apenas para grupos de risco e, ainda, ações complementares tais como: combate e tratamento eficiente das infecções parasitárias intestinais, projetos de saneamento básico e combate à avitaminose A e à deficiência de cobre e de outros micronutrientes envolvidos no metabolismo do ferro, devem ser desenvolvidas simultaneamente, no sentido de otimizar os resultados dos programas. Deve-se considerar ainda o acentuado aumento da expectativa de vida ocorrido neste último meio século ³⁹, que vem modificando as pirâmides demográficas de idade na direção da senilidade, em todo o mundo. Portanto, a redução de fatores de risco para idosos, deveria constar também nas políticas de saúde pública, uma vez que esta começa a representar uma fração significativa das populações em todos os países. Por fim, considerando a atual tendência da indústria alimentícia brasileira em fortificar os alimentos, estudos epidemiológicos longitudinais devem ser encorajados para avaliar o impacto dessa fortificação na incidência de doenças associadas ao estresse oxidativo, principalmente na população mais idosa.

Referências Bibliográficas

1. Beard JL, Dawson H, Piñero DJ. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutrition Reviews*.1996;54(10):295-317.
2. Beard JL, Connor JR. Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr*.2003;23:41-58.
3. Bovell-Benjamin AC, Ginard J-X. Novel approaches and application of contemporary sensory evaluation practices in Iron Fortification Programs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.2003;43(4):379-400.
4. Ponka P. Iron Metabolism: Physiology and Pathophysiology. *The J Trace Elements in Experimental Medicine*.2000;13:73-83.
5. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorganic Biochemistry*. 2002;91:9-18.
6. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington DC: National Academic Press; 2002. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/10026.html>. Acessado em 3/mar/2006.
7. Monsen ER. The ironies of iron. *Am J Clin Nutr*.1999;9:831-832.
8. Organização Mundial de Saúde. Anemias Nutricionais: Informe de um grupo científico. Genebra: OMS (Série de Informes Técnicos, 405);1968.
9. Bellamy C. The State of the World's Children - Focus on Nutrition. UNICEF 1998. Disponível em: <http://www.unicef.org/sowc98/>. Acessado em 4/mar/2006.

10. Tuma RB, Yuyama LKO, Aguiar JPL, Marques HO. Impact of cassava flour fortified with iron amino acid chelate on the hemoglobin level in pre-schools. *Revista de Nutrição*.2003;16(1): 29-39.
11. Miret S, Simpson RJ, Mckie AT. Physiology and Molecular Biology of Dietary Iron Absorption. *Ann Rev Nutr*. 2003;23:283-301.
12. Hallberg L, Hulthén L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *Am J Clin Nutr*.2000;71:1147-60.
13. Haddad EH, Berk LS, Kettering JD, Hubbard RW, Peters WR. Dietary intake and biochemical, hematologic, and immune status of vegans compared with nonvegetarians. *Am J Clin Nutr*.1999; 70(suppl):586S-93S.
14. Hunt JR and Roughead ZK. Nonheme-iron absorption, fecal ferritin excretion, and blood indexes of iron status in women consuming controlled lactoovovegetarian diets for 8 wk. *Am J Clin Nutr* 1999;69:944–52.
15. Whittaker P. Iron and Zinc Interactions in Humans: *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 442S-446S.
16. Garcia-Casal MN, Leets I, Layrisse M. b-Carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J Nutr*. 2000;130:5-9.
17. Layrisse M, Garcia-Casal MN. Strategies for the prevention of iron deficiency through foods in the household. *Nutr Rev*.1997;55(6):233-9.
18. Mwanri L, Worsley A, Ryan P, Masika J. Supplemental Vitamin A Improves Anemia and Growth in Anemic School Children in Tanzania. *J Nutr*. 2000;130: 2691-2696.

19. Roodenburg AJC, West CE, Beguin Y, Van Dijk JE, Van Eijk HG, Marx JJM, Beynen AC. Indicators of erythrocyte formation and degradation in rats with either vitamin A or iron deficiency. *J Nutr Biochem.* 2000;11:223-230.
20. Zouhair K, Attieh ZK, Mukhopadhyay CK, Seshadri V, Tripoulas NA, Fox PL. Ceruloplasmin Ferroxidase Activity Stimulates Cellular Iron Uptake by a Trivalent Cation-specific Transport Mechanism. *JBiol Chem.* 1999;274(2):1116-1123.
21. Yu J, Wessling-Resnick M. Influence of Copper Depletion on Iron Uptake Mediated by SFT, a Stimulator of Fe Transport. *J Biol Chem.* 1998;273(12):6909-6915.
22. Andrews N. Iron Metabolism: Iron deficiency and Iron Overload. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2000;1:75-98.
23. Van den Broek NR, Letsky EA. Etiology of anemia in pregnancy in South Malawi. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(suppl):247S-56S.
24. Capanema FD, Lamounier JÁ, Norton RC, Jácome AAA, Rodrigues DA, Coutinho RL et al. Anemia ferropriva na infância: novas estratégias de prevenção, intervenção e tratamento. *Rev Med Minas Gerais.* 2003;13(4Supl 2):S30-S4.
25. Monteiro CA, Szarfarc SC, Mondinib L. Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Rev Saúde Pública.* 2000;34(6 Suppl):62-72.
26. Monteiro CA, Conde WL, Popkin BM. Is obesity replacing or adding to undernutrition? Evidence from different social classes in Brazil. *Public Health Nutr.* 2002;5(1A):105-12.
27. Pierre JL, Fontecave M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry *BioMetals.* 1999;12:195-199.

28. Gardi C, Arezzini B, Fortino V, Comporti M. Effect of free iron on collagen synthesis, cell proliferation and MMP-2 expression in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol.* 2002 Oct 1;64(7):1139-45.
29. Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK. Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut.* 2002;51:290-295.
30. Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppanen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation.*1992;86:803-811.
31. Lund EK, Wharf SG, Fairweather-Tait S, Johnson IT. Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunteers. *Am J Clin Nutr.*1999;69:250-255.
32. Tuomainen TP, Punnonen K, Nyyssonen K, Salonen J. Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men. *Circulation.*1998;97:1461-1466.
33. Smith MA, Harris PLR, Sayre LM, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94: 9866-9868.
34. Kennard ML, Feldman H, Yamada T, Jefferies WA. Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease. *Nat Med.*1996;2:1230-1235.
35. Keller JN, Pang Z, Geddes JW, Begley JG, Germeyer A, Waeg G, Mattson MP. Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydro-xynonenal. *J Neurochem.*1997;69:273-284.

36. Kowald A, Kirkwood TB. A network theory of ageing: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process. *Mutat Res.*1996 May;316(5-6):209-36.
37. Polla BS. Therapy by taking away: the case of iron. *Biochemical Pharmacology.*1999;57: 1345-1349.
38. Polla AS, Polla LL, Polla B. Iron as the malignant spirit in successful ageing. *Ageing Research Review.*2003;2:25-37.
39. Bongaarts J. Demographic consequences of declining fertility. *Science.* 1998 Oct 16; 282 (5388):419-20.

6. Capítulo 2: Protein carbonyl correlated positively with ferritin and negatively with hemoglobin in malnourished patients submitted to hemodialysis.

6. Capítulo 2: Protein carbonyl correlated positively with ferritin and negatively with hemoglobin in malnourished patients submitted to hemodialysis.

Joel Paulo Russomano Veiga, MD, PhD,[¥] Simone Gonçalves de Almeida, MS,[#] Sandra Fernandes Arruda, PhD,[§] Cibele Ferreira Neves,[§] Egle Machado de Almeida Siqueira PhD*.

[¥] Department of Clinical Medicine, Laboratory of Nephrology, Faculty of Medicine, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

[#] Post-graduate Program in Health Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

[§] Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

* Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

Corresponding author: Joel Paulo Russomano Veiga, MD, PhD. Laboratory of Nephrology and Hemodialysis Unit, Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Brasilia. Asa Norte - Campus Universitario Darcy Ribeiro. Asa Norte, Distrito Federal, Brazil. 70.910.900.

E-mail: joelprv@unb.br. Fax: + 55 61 34485521. Phone: + 55 61 34485598.

Abstract

Protein carbonyl correlated positively with ferritin and negatively with hemoglobin in malnourished patients submitted to hemodialysis.

Background and Objective: Enhanced oxidative stress (OS) is well established in chronic kidney disease. The objective of this study was to evaluate the relationship between markers of OS and iron status in patients on maintenance hemodialysis (HD) with normal and poor nutritional status. Both groups had levels of serum ferritin between 100 and 500 ng/mL.

Design: This is a cross-sectional research.

Setting: The study was conducted at the hemodialysis unit of a public university hospital and at its biophysics and clinical laboratories.

Methods: Serum concentration of iron, ferritin, transferrin saturation, malondialdehyde (MDA), protein carbonyl (PC), serum C - reactive protein (CRP) and blood counts were determined in 35 HD patients. These patients' nutritional status was determined by anthropometric and biochemical criteria. Oxidative and iron status was compared among renal subjects with normal nutritional status (n = 23), malnourished (n = 12) and healthy volunteers (n = 35).

Results: Anemia associated with higher levels of ferritin and an enhanced OS was observed in renal subjects when compared with healthy volunteers. Malnourished HD patients were younger and showed higher values of PC and PCR when compared with HD subjects with normal nutritional status. Also, PC was positively correlated with

ferritin and negatively correlated with Hb in malnourished HD patients, but not in those with normal nutritional status.

Conclusion: The positive correlation between PC and serum ferritin concentration suggests that there is a relationship between iron and oxidative status in the malnourished HD patients.

Key words: hemodialysis; iron status; oxidative stress; nutritional status.

Introduction

Anemia is a very common condition in advanced renal disease and contributes to the higher morbimortality observed in this group of patients.^{1,2} Intravenous iron is widely used to maintain adequate iron stores and prevent iron deficiency anemia. The long-term use of intravenous iron has raised concerns with respect to oxidative stress, cellular injury, and accelerated atherosclerosis.³ Recent data suggest that IV iron may increase oxidative stress and induce endothelial-cell injury in chronic kidney disease patients.⁴⁻⁶

Moreover, uremic patients have an increased formation of reactive oxygen species. In addition to excessive parenteral iron administration, other factors such as uremic toxins and hemodialysis, due to factors related to membrane and dialysis-water biocompatibility and a chronic inflammatory state, contribute to intensify this oxidative stress, leading to greater cardiovascular risk.^{7,8} Furthermore, patients undergoing maintenance hemodialysis have a high prevalence of protein-energy malnutrition, inflammation, and enhanced oxidative stress, the so-called “malnutrition-inflammation complex syndrome”.^{9,10}

The aim of the present study is to evaluate oxidative stress in 35 patients on regular hemodialysis and to investigate its possible relationship with nutritional, inflammatory and iron status.

Methods

Fifty-four patients with chronic renal disease submitted to chronic hemodialysis were recruited from one outpatient center of dialysis at the University Hospital of Brasilia. Eligibility criteria included the following: 18 years old or beyond, either male or female,

six or more months on dialysis treatment, absence of malignancy, acute inflammatory diseases, vasculitis, and haemoglobinopathies. Also, eligible subjects needed to have good adherence and stability to dialysis treatment, vascular access to hemodialysis by means of artery-venous shunt, and ferritin levels between 100 and 500 ng/ml. Thirty-five patients met the criteria (19 female and 16 male). The causes of chronic kidney disease were hypertensive nephrosclerosis (13), chronic glomerulonephritis (10), polycystic disease (4), diabetic nephropathy (6), and undetermined (2). A written consent was obtained from the participants according to protocol approved by the Faculty of Health Sciences, University of Brasilia Ethics Committee. Each patient had been undergoing standard bicarbonate HD session three times a week, 4 hours per session, using polysulfone membrane, with a blood flow of 300-350 ml/min, and dialysis flow of 500 ml/min. Prescribed medications included angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium channel blockers, angiotensin II receptors blockers, phosphate binders, and vitamin D analogues. None of the patients received hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), antioxidants agents (vitamins C or E) or anti-inflammatory drugs. A detailed history of all the patients was taken and they underwent clinical examination. Anthropometric data included dry weight (weight after dialysis session), body mass index, and assessment of subcutaneous fat and muscle mass stores, which were determined using a body fat caliper (Cescorf-Brazil). Percentiles of triceps skinfold thickness (TSF), mid-arm-circumference (MAC), and mid-arm-muscle circumference (MAMC) were calculated according to Frisancho.¹¹ The following formula was employed to calculate MAMC: $MAMC (cm) = MAC (cm) - (TSF (mm) \times 0,314)$.¹²

All measurements were taken by the same observer on the opposite side of the artery-venous shunt. Patients were classified as malnourished when values of TSF and/or MAMC were \leq percentile 5 of the standard reference, according to Blackburn.¹³ The patients' dietary intake of energy, protein, carbohydrate, lipids, and iron was calculated based on the averages of three 24-hour dietary intake recalls, which comprised one day of the weekend and two non-consecutive week days. Nutrients, calories, and protein intake were calculated using data of food composition^{14,15}. The values obtained were compared with those specifically recommended for dialysis subjects according to NKF/DOQI.¹⁶

Data for the total dose of iron supplement and erythropoietin administered were obtained from the medical records of each patient. After fifteen days from the last dose of parenteral iron, all patients were subjected to a biochemical assessment. Blood samples were drawn immediately before the hemodialysis session to determine hemoglobin (Hb), hematocrit(Hct), ferritin, transferrin saturation, urea, intact parathormony(iPTH), highly sensitive C reactive protein (CRP), protein carbonyl(PC), and malondialdehyde (MDA). After the dialysis session, more blood was collected to determine post-dialysis urea.

To compare OS in hemodialysis patients and healthy subjects, 35 healthy volunteers paired to age, gender, and social status were included. They were volunteers of the pilot project "Prevalence of risk factors to non-communicable chronic diseases in the Federal District –Brasilia, Brazil", which was a cooperative study developed by the University of Brasilia and the Health Secretary of the Federal District. Participants of this study represented a random sample of the population of the city of São Sebastião, DF. They

were submitted to an interview and samples of blood for Hb, iron status, and OS determinations were drawn the morning after the interview, as described in Yokota.¹⁷

Laboratory analysis

A complete blood count including Hb, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and Hct was done using an automatized cell count (Abbott Cell-Dyn 3700SL, Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Illinois, USA); serum iron, albumin, and urea were measured using an autoanalyser (Mega, Bayer, Germany); serum ferritin was measured by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Katal biotechnology- Brazil); intact parathyroid hormone was measured employing chemiluminescent method; highly sensitive C Reactive protein (CRP) was measured by nephelometric method (Cardiophase hsCRP, Dade Behring, Germany). Transferrin saturation percentage was calculated by means of the formula $TSAT (\%) = \text{Iron}/\text{IBC} \times 100$.

Adequacy of dialysis (eKt/V for urea) was calculated according to the single-compartment model of Daurgidas.¹⁸

Serum malondialdehyde (MDA) was measured by fluorimetric method based on the reaction between MDA and thiobarbituric acid (TBA). 50 μL of serum, 1 mL of deionized water, and 1 mL of TBA 29 mmol/L in acetic acid were added to each tube, agitated, and heated in a water bath at 100°C for 1 hour. After cooling, 25 μL of HCl 5 mol/L and 3.5 mL of n-butanol were added and the tubes were agitated for 5 seconds. The alcoholic phase was separated by centrifugation at 900 x g for 10 minutes. The sample fluorescence was determined at 547 nm with excitation at 525 nm in spectrofluorometer

(FP-777 JAS.CO). The standard curve was prepared using 1,1,3,3-tetraethoxypropane standard solutions (Sigma, Germany) in the concentration range of 0 – 0.150 $\mu\text{mol/L}$, linearity of 0.9816.¹⁹

The concentration of serum protein carbonyl groups was determined by the spectrophotometric method based on the reaction of 2,4-dinitrophenylhydrazine with protein carbonyls. Serum samples containing 500 μg of protein were homogenized in 25 mmols/L Tris, pH 9.0, 6 mols/L urea to a final volume of 200 μL . Next, an equal volume of 20% trichloroacetic acid was added and centrifuged at 9,000 x g for 1 minute to precipitate proteins. The pellet was re-suspended in 200 μL 25 mmol/L Tris, pH 9.0, 6 mols/L urea. 700 μL 0.2% 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) in 2 mols/L HCl were added to the sample and 700 μL 2 mols/L HCl, to a blank tube, respectively. Samples were agitated at 4°C for 15 minutes on a shaker (TE-420, Tecnal) at maximum speed. 700 μL 20% trichloroacetic acid (TCA) were added to precipitate proteins. The pellet was washed three times at room temperature with 1 mL ethyl acetate:ethanol, 1:1, air dried, and re-suspended in 500 μL 500 mols/L potassium phosphate, pH 2.5, containing 6 mols/L guanidine HCl. The mixture was agitated at 4°C for 30 minutes on a shaker. The absorbance was measured at 376 nm¹⁷.

Statistical Analysis

All continuous variables were analyzed for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. The t test or the Mann-Whitney U tests were employed to compare continuous variables. The Chi-square test and the Fisher Exact Test were employed for categorical variables. The association between oxidative stress biomarkers and the analyzed parameters of HD patients with good and poor nutritional status was evaluated

using Pearson's correlations for variables that had a normal distribution and Spearman's rank order correlation for variables that did not exhibit a normal distribution. All statistical analyses and graphic design of the data were done using the SigmaStat[®] 3.11/ SigmaPlot 9.01 for Windows (Systat Software, Inc.,USA,2004) and the Prism 4 for Windows[®](GraphPad Software,Inc.,USA,2005) software packages.

A p value of less than 0.05 was considered significant.

Results

In this study, and according to the NKF-K/DOQI¹⁶, the dietary intake was suitable for all nutrients except for calories and proteins in 57% of HD patients. Using the anthropometric and biochemical criteria, the hemodialysis patients showed a prevalence of 34.3 % of mild to moderate malnutrition.

Comparisons of the levels of Hb, ferritin, and the serum markers of oxidative stress between the 35 healthy volunteers and HD subjects are shown in **Table 1**. Results show that renal subjects have higher levels of ferritin, MDA and PC, and lower levels of Hb in relation to healthy individuals.

Table 1. Levels of hemoglobin (Hb), Ferritin, Lipid peroxidation (MDA) and Protein carbonyl (PC) in health volunteers and in hemodialysis patients.

Variables	Health volunteers N = 35	Renal patients N = 35	P value [#]
Hb (g/dL)	14.0 ± 1.7	10.4 ± 1.8	.000
Ferritin (ng/mL)	77.4 ± 84.2	210 ± 75.5	.000
MDA (μmol/L)	0.3 ± 0.2	2.4 ± 1.1	.000
PC (nmol/mg protein)	total 1.2 ± 0.7	1.90 ± 1.0	.001

[#] t test

The different characteristics of HD subjects and those with normal and poor (malnourished) nutritional status are shown in **Table 2**. Patients with mild to moderate malnutrition were younger, and the gender and diabetic ratios, months on dialysis, Kt/V, ferritin, iron, transferrin saturation, albumin, iPTH, Hb, and MDA were not different for the malnourished and those with normal nutrition. However, malnourished patients showed higher levels of PC and CRP in relation to those with normal nutritional status.

Table 2. Characteristics of hemodialysis patients with normal nutritional status and malnourished.

Characteristics	Overall (n = 35)	Normal Status (n=23)	Nutritional	Malnourished (n=12)	P Value
Age (y)	38.5 ± 19.7	42.8 ± 15.3		30.2 ± 24.8	.016 ^{##}
Male:female	16 : 19	10 : 13		6 : 6	.992 [*]
Diabetic:nondiabetic	6 : 29	4 : 19		2 : 10	1.00 ^{**}
Months on dialysis	29.0 ± 19.5	27.9 ± 17.3		31.0 ± 23.9	.754 ^{##}
Weight (kg)	55.7 ± 7.9	58.1 ± 7.5		51.2 ± 6.9	.013 [#]
BMI (kg/m ²)	22.0 ± 3.3	23.3 ± 3.2		19.5 ± 1.8	< .001 ^{##}
Kt/V	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.3		1.4 ± 0.2	.741 ^{##}
TSF (mm)	13.4 ± 6.1	14.8 ± 5.8		10.7 ± 5.8	.051 [#]
MAMC (cm)	23.4 ± 3.5	24.6 ± 3.5		21.3 ± 2.4	.006 [#]
MAC (cm)	27.7 ± 3.8	29.3 ± 3.5		24.6 ± 2.1	< .001 ^{##}
Ferritin (ng/mL)	210.0 ± 78.5	206.2 ± 73.4		217.2 ± 90.6	.701 [#]
Iron (mg/mL)	64.6 ± 36.7	69.7 ± 41.5		54.7 ± 23.4	.257 [#]
Transferrin saturation (%)	42.8 ± 27.4	44.5 ± 26.3		39.5 ± 30.3	.175 ^{##}
Albumin (g/dL)	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.3		4.2 ± 0.6	.330 ^{##}
i PTH (pg/mL)	292.0 ± 302.9	298.7 ± 284.3		281.7 ± 359.1	.576 ^{##}
Hb (g/dL)	10.2 ± 1.4	10.2 ± 1.4		10.3 ± 1.4	.863 [#]
MDA (μmol/L)	2.4 ± 1.1	2.3 ± 1.0		2.6 ± 1.2	.395 [#]
PC (nmol/mg protein)	1.9 ± 1.0	1.7 ± 0.9		2.4 ± 1.1	.044 [#]
CRP (mg/dL)	0.4 ± 0.3	0.35 ± 0.2		0.7 ± 0.3	.003 ^{##}

BMI, Body mass index; TSF, Triceps skinfold thickness; MAMC, Mid-arm-muscle circumference; MAC, Mid-arm circumference; PTH, Parathyroid hormone; Hb, hemoglobin; MDA, malonaldehyde; PC, Protein Carbonyl; CRP, C-reactive protein. [#] t test; ^{##} Mann-Whitney; ^{**} Fisher Exact Test; ^{*} Chi-square test. Data are expressed as mean ± standard deviation.

Patients on hemodialysis during the study received regular doses of parenteral iron (IV) and erythropoietin (rHuEPO). Such doses were not significantly different for the subjects with good and poor nutritional status (iron iv = 0.97 ± 1.50 vs 0.99 ± 1.45 mg/kg/week, $p = 0.958$; rHuEPO = 122.94 ± 81.31 vs 72.37 ± 79.34 UI/kg/week, $p = 0.085$, Mann-Whitney test). In HD patients with good nutritional condition, serum MDA showed a positive correlation with age ($r = 0.45$, $p = 0.027$) and serum PC showed a negative correlation with BMI ($r = -0.44$, $p = 0.035$), but neither MDA and PC correlated with Ferritin ($p > 0.05$).

In the malnourished group, serum MDA showed a negative correlation with BMI ($r = -0.698$, $p = 0.011$). Serum PC showed a positive correlation with serum ferritin ($r = 0.61$, $p = 0.035$) (Figure 1) and was negatively correlated with Hb. ($r = -0.57$, $p = 0.049$) (Figure 2)

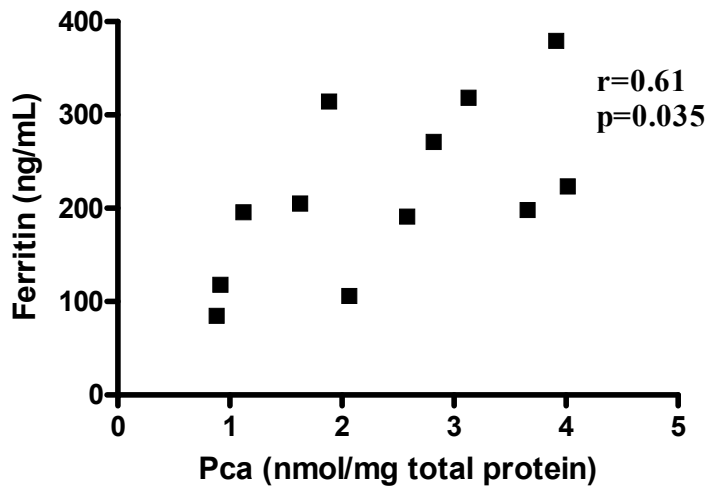


Figure 1. Pearson's correlation between serum protein carbonyl and ferritin in patients submitted to maintenance hemodialysis with mild to moderate malnutrition.

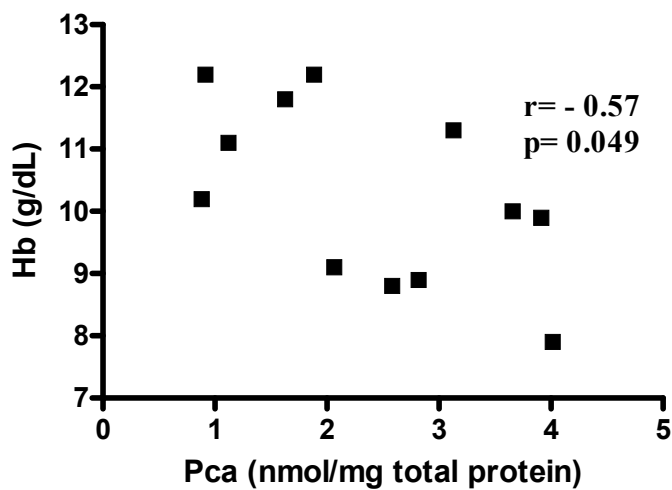


Figure 2. Pearson's correlation between serum protein carbonyl and hemoglobin in patients submitted to maintenance hemodialysis with mild to moderate malnutrition.

Discussion:

The relationship among haematimetrics and iron indices, OS, and nutritional status in 35 hemodialysis patients was analyzed in this study. Hb, serum ferritin and OS, evaluated by the serum concentration of MDA and PC, were also evaluated in 35 healthy volunteers.

Anemia was present in all renal subjects, despite normal levels of serum ferritin (between 100 to 500 ng/mL) and the use of parenteral iron and erythropoietin. The dialysis patients also exhibited higher levels of serum MDA and PCA in relation to the healthy volunteers, a fact which is compatible with the higher oxidative stress previously observed in renal patients.^{8,21,22} A chronic inflammatory status described in hemodialysis patients^{23,24} may contribute to iron functional deficiency by making it difficult to attain the target hematocrit, increasing these individuals' risk of infections and cardiovascular diseases. In addition, an association among biomarkers of inflammation, oxidative stress, and malnutrition in HD patients, called the "oxidative stress complex syndrome", may play a major role in long-term complications affecting morbidity and mortality in HD patients.⁹

In this study, mild to moderate malnutrition and inadequate calorie and protein intake were observed in 34.3% of the dialysis patients. This group of malnourished HD patients exhibited, in relation to dialysis patients with good nutritional status, higher levels of PC and CRP compatible with the presence of protein-energy malnutrition, inflammation, and enhanced oxidative stress. Inflammation and oxidative stress may act synergistically and tend to be involved in the development of long-term complications including malnutrition, atherosclerotic cardiovascular and bone vascular diseases.⁹

The association between oxidative stress and iron status was also investigated. Iron supplements could potentially result in the release of free iron and induce production of free radicals by means of Fenton reaction.^{25,26}

In malnourished and more inflamed HD patients, PC correlated positively with ferritin and negatively with Hb (Figures 1 and 2). These data may suggest that the level of serum ferritin was associated with the oxidative stress evaluated by the serum concentration of PC in the malnourished dialysis patients. We did not observe any association between the markers of oxidative stress and ferritin in patients with good nutritional condition.

Previous evidence has shown that enhanced oxidative stress may be associated with iron load in renal patients submitted to hemodialysis.^{4-6, 27-31} However, the lowest level of ferritin to maintain the control of anemia without inducing oxidative tissue damage and increasing the risk of infections and cardiovascular diseases is still unknown.^{32,33}

Recently, Senol et al³⁴ found that 34 well-nourished HD patients had higher CRP and lipid peroxidation products (red blood cell malondialdehyde) when compared with 22 healthy controls. They did not observe a significant relationship between ferritin and RBC-MDA when they compared HD patients with normal (<800 ng/ml) and high (>800 ng/ml) ferritin levels. The authors concluded that HD patients have higher oxidative and inflammation status, but they could not find a relationship between ferritin level and OS markers in HD patients receiving erythropoietin.

In the present study, HD patients showed lower ferritin cut-off values and approximately 34% showed mild calorie-protein malnutrition. Serum PC and MDA did not show a

significant correlation with ferritin in the group with good nutritional status. However, PC, a marker of protein oxidation, showed a positive correlation with ferritin and a negative correlation with Hb in malnourished patients. This data may suggest that the malnutrition and higher inflammatory status observed in this group of patients may influence the relationship among iron, oxidative stress, and the degree of anemia.

The positive association between PCA and ferritin, the negative correlation between PCA and the serum levels of Hb in malnourished and more inflamed patients, and the absence of any correlation of these parameters in less inflamed HD patients with better nutritional condition suggest that factors other than body iron stores may also influence iron availability in the malnourished patients. The inflammatory process, which results from the production of several cytokines widely described in chronic renal patients, may be involved in the inhibition of iron release from the reticuloendothelial system, thus promoting iron tissue accumulation and iron functional deficiency. Furthermore, enhanced oxidative stress may be associated with rHuEPO resistance in HD patients.³⁵ In addition, hepcidin, an antimicrobial hepatic peptide, which reduces iron intestinal absorption and iron mobilization from body reserves, is down regulated by inflammatory cytokines.³⁶⁻³⁸

The limitations of this study are its relatively small sample size and its cross-sectional nature. The inclusion of patients with relative low values of ferritin concentration (< 500 ng/mL) may, perhaps, explain the similar levels of ferritin concentration observed in patients with good and poor nutritional status. The distinctive lipid and protein oxidation pathways or products stability may be responsible for the differences in the oxidative status observed in our patients.

In conclusion, the positively correlation between protein carbonyl and serum ferritin and the negatively correlation with hemoglobin observed only in HD patients with mild to moderate malnutrition suggest that the nutritional and inflammatory status may change the relationship between iron and oxidative status in HD patients. However, prospective and long-term follow-up studies are needed to confirm this data.

Acknowledgments:

The authors would like to thank Mrs. Carolina Godoy Veiga da Cunha for her revision of the English language and Mr. Robério Antonio Araújo for his technical laboratory assistance. This work was partially supported by CAPES/Brazil.

References

1. Langston RD, Presley R, Flanders WD, et al: Renal insufficiency and anemia are independent risk factors for death among patients with acute myocardial Infarction. *Kidney Int* 64:1398-1405, 2003.
2. Gilbertson DT, Ebben JP, Foley RN, et al: Hemoglobin level variability: associations with mortality. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:133-138, 2008.
3. Garneata L. Intravenous iron, inflammation and oxidative stress: Is iron a friend or an enemy of uremic patients? *J. Renal Nutr* 18:40-45, 2008.
4. Yoshimura K, Nakano H, Yokoyama K, et al: High iron storage levels are associated with increased DNA oxidative injury in patients on regular hemodialysis. *Clin Exp. Nephrol* 9:158-163, 2005.
5. Bishu K, Agarwal R: Acute injury with intravenous iron and concerns regarding long-term safety. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:S19-S23, 2006.
6. Maruyama Y, Nakayama M, Yoshimura K, et al: Effect of repeated intravenous iron administration in haemodialysis patients on serum 8-hydroxy-20-deoxyguanosine levels. *Nephrol Dial Transplant* 22:1407–1412, 2007.
7. Kaysen GA: The microinflammatory state in uremia: Causes and potential consequences. *J Am Soc Nephrol* 12:1549–1557, 2001.
8. Morena M, Delbosc S, Dupuy AM, et al: Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: A potential component of hemodialysis associated inflammation. *Hemodial Int* 9:37-46, 2005.

9. Morena M, Canaud B, Terrier N, et al: Oxidative stress complex syndrome: The dark side of the malnutrition-inflammation complex syndrome. *Hemodial Int* 11:S32–S38, 2007.
10. Ikizler TA: Nutrition, inflammation and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:162-167, 2008.
11. Frisancho AR: New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr* 34:2540-2545, 1981.
12. ASPEN: The ASPEN Nutrition Support Practices Manual, Washington: ASPEN, 1998.
13. Blackburn GL, Bistrian BR: Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient. *JPEN* 1:11-22, 1977.
14. NEPA – UNICAMP: Tabela brasileira de composição de alimentos. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2004. 42p.
15. USDA: Agricultural Research Service - Nutrient Data Laboratory – Food Composition Products. Disposable at URL: [http:// www.nal.usda.gov /fnic/foodcomp/search/](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/) accessed in July, 2007.
16. Clinical Practice Guidelines for Nutrition in Chronic Renal Failure. K/DOQI, National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis* 35(suppl 2):1-140, 2000.
17. Yokota RTC, Vasconcelos TF, Ito MK, et al: Prevalence of risk factors for chronic diseases in two regions of Distrito Federal. *Com Ciências Saúde* 18:289-296, 2007.
18. Daugirdas JT: Simplified equations for monitoring Kt/V, PCRn, eKt/V and ePCRn. *Adv Ren Replace Ther* 2:295-304, 1995.

19. Wasowicz W, Neve J, Pere A: Optimized Steps in Fluorometric Determination of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances in Serum: Importance of Extraction pH and Influence of Sample Preservation and Storage. *Clin Chem* 39:2522-2526, 1993.
20. Richert S, Wehr NB, Stadtman ER, et al: Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age. *Arch Biochem Biophys* 397: 430–2, 2002.
21. Oberg BP, McMennamin E, Lucas FL et al: Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 65: 1009–1016, 2004.
22. Himmelfarb J: Relevance of oxidative pathways in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Cardiol Clin* 23:319–330, 2005.
23. Arici M, Walls J: End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int* 59:407-414, 2001.
24. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G: Traditional and emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl* 85:S105-S110, 2003
25. Siqueira EMA, Almeida SG, Arruda SF: Papel adverso do ferro no organismo. *Comun Ciênc Saúde* 17:229-236, 2006.
26. Swaminathan S and Shah SV: Novel approaches targeted toward oxidative stress for the treatment of chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:143-148, 2008.
27. Lim PS, Wei YH, Yu YL, et al: Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant* 14:2680–2687, 1999.
28. Reddi AS, Bollineni JS, Baskin S, et al: Serum ferritin and oxidative stress in patients undergoing hemodialysis. *Nephron* 86: 202–203, 2000.

29. Agarwal R, Vasavada N, Sachs NG, et al: Oxidative stress and renal injury with intravenous iron in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 65:2279-2289, 2004.
30. Kalantar-Zadeh K, Rodriguez RA, Humphreys MH: Association between serum ferritin and measures of inflammation, nutrition and iron in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 19:141–149, 2004.
31. Zager RA: Parenteral Iron Compounds: Potent Oxidants but Mainstays of Anemia Management in Chronic Renal Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:S24–S31, 2006.
32. Fishbane S, Kalantar-Zadeh K, Nissenson AR: Serum Ferritin in Chronic Kidney Disease: Reconsidering the Upper Limit for Iron Treatment. *Semin Dial* 17:336–341, 2004.
33. Fishbane,S. Upper limit of serum ferritin: Misinterpretation of the 2006 KDOQI Anemia Guidelines. *Seminars Dial* 21: 217-220,2008.
34. Senol E, Ersoy A, Erdinc S, et al: Oxidative stress and ferritin levels in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 23:665–672, 2008.
35. Kato a, Odamaki M, Hishida A. Blood 8-hydroxi-2'-deoxyguanosine is associated with erythropoietin resistance in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 18:931-936, 2003.
36. Deicher R, Hörl WH: Hpcidin: a molecular link between inflammation and anaemia. *Nephrol Dial Transplant* 19:521-523, 2003.
- 37 Oates PS: The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. *Histol Histopathol* 22:791-804, 2007.
38. Hamada Y, Kono TN, Moriguchi Y, et al: Alteration of mRNA expression of molecules related to iron metabolism in adenine-induced renal failure rats: a possible

mechanism of iron deficiency in chronic kidney disease patients on treatment. *Nephrol Dial Transplant* 10:1-6, 2008.

7. Apêndices

7. Apêndice

7.1 Apêndice 1

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
LABORATÓRIO DE BIOFÍSICA, ICC Sul Módulo 03
Serviço de Nefrologia – Unidade de Hemodiálise – HUB

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Fui convidado (a), informado (a) e esclarecido (a) dos objetivos e procedimentos do projeto Avaliação de pacientes hemodialisados, quanto ao estresse oxidativo e estado nutricional – HUB. O presente estudo visou verificar possíveis correlações e/ou associações entre os níveis séricos de ferro, ferritina e saturação de transferrina, ingestão de ferro e os níveis de peroxidação lipídica em pacientes renais, submetidos ou não a ferroterapia.

2. Estou participando de minha livre vontade e estou ciente que será retirada uma amostra de sangue venoso, para exames laboratoriais e os dados do meu prontuário médico serão também utilizados na pesquisa. 3. Fui esclarecido que posso livremente recusar participar do projeto ou recusar continuar participando do mesmo a qualquer momento, bastando comunicar o meu desejo aos pesquisadores responsáveis. 4. Estou ciente que haverá sigilo absoluto com relação à identificação do meu nome quando da publicação dos resultados. 5. Este estudo será realizado pelos pesquisadores MsC Simone Gonçalves de Almeida; Dra. Sandra Fernandes Arruda e uma aluna de Graduação em Nutrição Cibele Ferreira Neves, estas da Universidade De Brasília, sob a coordenação da Professora Doutora Egle Machado de Almeida Siqueira

do Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Biofísica - UNB e do Doutor Joel Paulo Russomano Veiga, do Centro de Nefrologia do Hospital Universitário de Brasília.

6. Posteriormente, se eu desejar, poderei ser informado sobre os resultados dos exames a que me submeti, cujos resultados constarão obrigatoriamente no meu prontuário médico.

7. Em virtude de considerar claras e satisfatórias as informações acima expostas, voluntariamente aceito submeter-me a tal pesquisa.

E ainda se desejar esclarecer alguma dúvida poderei entrar em contato pelo número 61-3397 1847 e 61- 3448 5531 (Simone Gonçalves de Almeida).

Desta forma, eu _____,

concordo em participar do projeto acima referido do qual será:

1. Realizadas medições de peso, altura e prega cutânea.
2. Obtida uma amostra de 5 a 10 ml de sangue durante a hemodiálise, por profissional da área, utilizando material descartável, para estudo das frações do sangue. Sendo que serei informado (a) do resultado deste exame.
3. Coletadas informações sobre os hábitos alimentares.
4. Coletadas informações sobre aspectos sócio-econômicos da família.

Declaro ainda estar ciente que, se eu desejar, poderei desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem prejuízo algum e ainda que os resultados dos exames feitos e os dados do inquérito Nutricional e sócio-econômico serão mantidos em sigilo, podendo ser informado somente ao responsável.

Brasília, _____ de _____ de _____.

Pesquisador _____

