

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Luiz Carlos Cichota

**AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL
CRÔNICA SUBMETIDOS À HEMODIÁLISE E SUA ASSOCIAÇÃO COM O
METABOLISMO DO FERRO E ESTRESSE OXIDATIVO**

Santa Maria, RS
2016

Luiz Carlos Cichota

**AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA
SUBMETIDOS À HEMODIÁLISE E SUA ASSOCIAÇÃO COM O METABOLISMO DO
FERRO E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Santa Maria,RS
2016

Luiz Carlos Cichota

**AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA
SUBMETIDOS À HEMODIÁLISE E SUA ASSOCIAÇÃO COM O METABOLISMO DO
FERRO E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 14 de junho de 2016:

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Jose Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)

Liliane de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)

Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Dra. (ULBRA)

Michele Rorato Sagrillo, Dra. (UNIFRA)

Santa Maria,RS
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa, nossa filha e meus pais, que entenderam o quanto era importante esse e sempre me apoiaram. Essa conquista é deles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Grande Arquiteto do Universo que nos protege e ilumina nossas vidas.

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

A minha esposa Vera e nossa filha Luiza, pelo apoio e paciência que tiveram durante esse tempo. Obrigado por estarem sempre presentes em todos os momentos. Espero fazer por merecer tê-las ao meu lado. Amo vocês!

Ao meu orientador, Professor Dr. Rafael, pela oportunidade, confiança, e principalmente paciência para transmitir ensinamentos. Agradeço pelos momentos de dedicação e capacidade de crítica construtiva, bem como por estar sempre preocupado em direcionar-me no caminho certo. Tenho muita admiração e principalmente respeito pelo exemplo de profissional e ser humano. Muito obrigado!

À professora Dra. Patricia, pelo carinho, incentivo e encorajamento em todos os momentos. Obrigado pela amizade e companheirismo que faziam momentos difíceis serem simplificados com bom humor. Meu carinho e respeito a você.

Aos meus colegas de laboratório, José, Lara, Luiz, Naiara, Natieli, Manuela, Vanessa e Yãnaí, que sempre estiveram presentes em todas as etapas desta minha jornada acadêmica. Obrigado pela amizade, disponibilidade e principalmente pelo respeito com que me trataram.

A meus colegas de laboratório, Etiane, Guilherme e Bruna, que colaboraram nas análises laboratoriais e na revisão dos artigos científicos. Sou muito grato pela dedicação e respeito de vocês. Durante esse tempo fomos amigos, colegas e até irmãos. Sentirei saudades! Quero que sintam, a cada passo, que Deus protege vocês.

À Professora Dra. Ivana, pela disponibilidade do seu laboratório para realização de pesquisas que contribuíram para nosso trabalho. Muito obrigado!

Aos médicos, Dr. Paulo e Dr. Jean, responsáveis pela clínica de hemodiálise da Fundação Hospitalar Santa Terezinha de Erechim, RS, pela disponibilidade e auxílio nas pesquisas do nosso trabalho. Muito obrigado.

Ao diretor da Fundação Hospitalar Santa Terezinha de Erechim, RS, Rafael Ayub, que permitiu a realização do trabalho nesse local. Obrigado.

Aos meus colegas do curso de Farmácia da URI Erechim, que representam um grande apoio e jamais esquecerei os momentos de companheirismo que juntos partilhamos.

À UFSM e ao PPGCF, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos demais familiares e amigos, pelas palavras de incentivo, que, mesmo de longe, sempre me ajudaram a ir em frente e não desistir.

A todos aqueles que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Oração não é pedir. É um anseio da alma. É uma admissão diária das próprias fraquezas. É melhor na oração ter um coração sem palavras do que palavras sem coração.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA SUBMETIDOS À HEMODIÁLISE E SUA ASSOCIAÇÃO COM O METABOLISMO DO FERRO E ESTRESSE OXIDATIVO

AUTOR: Luiz Carlos Cichota

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

A doença renal crônica (DRC) é a condição na qual os rins perdem a capacidade de efetuar funções básicas. A hemodiálise é o tratamento alternativo mais utilizado para esses pacientes, porém esse tratamento expõe tais indivíduos ao estresse oxidativo, o qual constitui importante fator de risco para lesão no DNA. A diminuição da capacidade funcional dos rins pode desencadear sérios problemas de saúde para esses pacientes, como a anemia, a qual possui significativo impacto sobre a qualidade de vida dos mesmos, necessitando ser corrigida com terapias adjuvantes, principalmente de ferro intravenoso. No entanto, o ferro é um metal oxidativo que potencializa o estresse oxidativo, podendo resultar em um aumento no dano ao DNA. Assim, o objetivo do estudo foi investigar a associação entre o metabolismo do ferro, estresse oxidativo e DNA livre circulante em pacientes com doença renal e submetidos à hemodiálise. Foram mensurados ferro, ferritina, transferrina, capacidade antioxidante total (TAC), estado oxidante total (TOS) e albumina modificada pela isquemia (IMA), bem como lesão no DNA pelo ensaio Picogreen[®] em quarenta pacientes com DRC submetidos à hemodiálise e quarenta indivíduos controle. Observou-se que o dano no DNA foi significativamente elevado nos pacientes com DRC submetidos à hemodiálise, quando comparado com o grupo controle. Além disso, foi demonstrada uma associação entre o aumento do dano ao DNA na DRC com os níveis séricos de ferritina e decréscimo da taxa de filtração glomerular (TFG). Constatou-se, também, que uma única sessão de hemodiálise não promoveu aumento do dano ao DNA. Além disso, foi verificado que os pacientes com DRC submetidos à hemodiálise e que utilizavam terapia com ferro intravenoso obtiveram maiores níveis de DNA livre circulante em relação aos que não utilizavam esta terapia. Neste estudo, observou-se, ainda, que os pacientes que utilizavam a terapia com ferro intravenoso apresentaram uma diminuição dos níveis de antioxidantes (TAC) e um aumento significativo dos níveis de oxidantes (TOS e IMA). Desta forma, consideramos que os eventos que acometem os pacientes com DRC, tais como aumento do estoque de ferro, declínio da função renal, desequilíbrio oxidativo, bem como o tratamento com ferro intravenoso, podem ser fatores que contribuem diretamente para o aumento do dano ao DNA.

Palavras-chave: Doença Renal Crônica. Hemodiálise. Dano ao DNA. Ferro. Ferritina. Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF DNA DAMAGE IN PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE UNDERGOING HEMODIALYSIS AND ITS ASSOCIATION WITH IRON METABOLISM AND OXIDATIVE STRESS

AUTHOR: Luiz Carlos Cichota

ADVISOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Chronic kidney disease (CKD) is a condition in which the kidneys lose their ability to perform basic functions. Hemodialysis is the most commonly used alternative treatment for these patients, however, it exposes these individuals to oxidative stress, which is an important risk factor for DNA damage. The decrease in functional capacity of the kidneys can trigger serious health problems for these patients, such as anemia, which has significant impact on their quality of life and needs to be corrected with adjuvant therapy, primarily intravenous iron. However, iron is an oxidative metal that enhances the oxidative stress, which may result in an increase in DNA damage. Thus the aim of the study was to investigate the association between iron metabolism, oxidative stress and free circulating DNA in patients with renal disease undergoing hemodialysis. Iron levels, ferritin, transferrin, total antioxidant capacity (TAC), the total oxidant status (TOS) and Albumin modified by ischemia (AMI) and damage DNA in the test Picogreen[®] were measured in forty CKD patients undergoing hemodialysis and forty control subjects. We observed that the DNA damage was significantly elevated in patients with CKD undergoing hemodialysis when compared to the control group. Furthermore, we demonstrated an association between the increase in DNA damage in the CKD with serum ferritin levels and decreased glomerular filtration rate (GFR). We also noticed that a single hemodialysis session did not increase DNA damage. Moreover, this study also found out that patients with CKD undergoing hemodialysis who used intravenous iron therapy had higher circulating free DNA levels than those who did not use therapy with iron. In this study, we also observed that patients who used intravenous iron therapy had a decrease in antioxidant levels (TAC) and a significant increase in oxidant levels (TOS and IMA). Thus, we speculate that the events that affect patients with CKD, such as an increase in the stock of iron, declining renal function, oxidative imbalance and treatment with intravenous iron may be factors that directly contribute to increased DNA damage.

Keywords: Chronic Kidney Disease. Hemodialysis. DNA damage. Iron. Ferritin. Oxidative stress.

LISTAS DE TABELAS

ARTIGO I

Table 1 - Baseline characteristics and biochemical parameters of the study population.....49

Table 2 - Multiple regression analysis of cell-free DNA in plasma as a dependent variable adjusting for GFR, gender, diabetes, hypertension, total cholesterol, triglycerides, and ferritin.....50

MANUSCRITO I

Table 1 - Baseline characteristics and biochemical parameters of the study population.....62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Marcadores do metabolismo do ferro na DRC.....	27
Figura 2 - Estrutura do DNA dupla-hélice.....	30
Figura 3 - Mecanismos patológicos presentes no dano a estrutura do DNA.....	37

ARTIGO I

Figure 1 - Circulating cell-free DNA in plasma of HD patients and health controls. Data are presented as median and interquartile range. *P = 0.0017.	51
--	----

MANUSCRITO I

Figure 1 - (A) Circulating cell-free DNA in plasma, (B) serum ischemia-modified albumin (IMA), (C) serum total antioxidant capacity (TAC) and (D) serum total oxidant status (TOS) of hemodialysis patients not treated with IVIR or submitted to IVIR therapy. Data are expressed as mean and standard deviation or median and interquartile ranges.....	63
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs: Produtos finais de glicação avançada
ALT: Alanina aminotransferase
ANOVA: Análise de variância
AST: Aspartato aminotransferase
CAT: Catalase
CEP: Comitê de ética em pesquisa
CK: Creatina quinase
CK-MB: Creatina quinase fração MB
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
Cys C: Cistatina C
DM: Diabetes *mellitus*
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DRC: Doença renal crônica
DRD: Doença renal do diabetes
DSBs: Quebras duplas da cadeia do DNA
dsDNA: DNA em dupla fita
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: Enzimaimunoensaio
EPO: Eritropoietina
ERNs: Espécies reativas de nitrogênio
EROs: Espécies reativas de oxigênio
GGT: Gama-Glutamiltransferase
GSH: Glutationa reduzida
GSH-Px: Glutationa-Peroxidase
GSH-Rd: Glutationa-Redutase
HAS: Hipertensão arterial sistêmica
Hb: Hemoglobina
HBP: Hiperplasia prostática benigna
HD: Hemodiálise
HDF: Técnica de hemodiafiltração
HNO₂: Ácido nitroso
H₂O₃: Óxido nitroso

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HOCl: Ácido hipocloroso
IAM: Infarto agudo do miocárdio
IMA: Albumina modificada pela isquemia
IC: Insuficiência cardíaca
IRP: Proteínas reguladoras do ferro
IRA: Insuficiência renal aguda
IRP: Proteínas reguladoras do ferro
MNs: Ensaio micronúcleos
MPO: Mieloperoxidase
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintase
O₂⁻: Superóxido
OONO⁻: Peroxinitrito
OH[•]: Radical Hidroxila
OMS: Organização mundial da saúde
8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PNs: Buds nucleares
PSA: Antígeno prostático específico
RO[•]: Alcoxila
ROO[•]: Peroxila
-SH: Grupo tiol
SOD: Superóxido dismutase
SSBs: Quebras simples da cadeia do DNA
TAC: Capacidade antioxidante total
TFG: Taxa de filtração glomerular
TOS: Estado oxidante total
TUNEL: *Terminal Deoxyribonucleotidyltransferase Mediated Deoxyuridine Triphosphate Nick end Labeling Assay*

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	15
2	INTRODUÇÃO.....	16
2.1	DOENÇA RENAL.....	17
2.1.1	Definição e patogênese.....	17
2.1.2	Complicação na doença renal.....	18
2.2	ANEMIA NA DOENÇA RENAL.....	19
2.3	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA RENAL.....	20
2.4	TÉCNICAS DIALÍTICAS NA DOENÇA RENAL.....	21
2.5	DOENÇA RENAL E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	22
2.6	DOENÇA RENAL E BIOMARCADORES DO METABOLISMO DO FERRO.....	25
2.7	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.....	29
2.7.1	Dano ao DNA.....	30
2.8	AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA.....	31
2.8.1	Ensaio de Fragmentação de DNA por fluorimetria com corante Picogreen®	31
2.8.2	Outros ensaios.....	33
2.9	DANO AO DNA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	35
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS.....	39
4.1	ARTIGO CIENTÍFICO I.....	39
4.2	MANUSCRITO I.....	52
5	DISCUSSÃO.....	64
6	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. APRESENTAÇÃO

As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no **ARTIGO CIENTÍFICO I** e **MANUSCRITO I**, representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico e manuscrito contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** desta tese, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do artigo e manuscrito estão mencionadas nos mesmos.

2. INTRODUÇÃO

A doença renal é a condição na qual os rins perdem a capacidade de efetuar suas funções básicas. Entre essas condições existe a insuficiência renal aguda (IRA), quando ocorre súbita e rápida perda da função renal; e a doença renal crônica (DRC), quando a perda é lenta, progressiva e irreversível, determinando uma queda na taxa de filtração glomerular (TFG) até níveis inferiores a 15% do normal. Essa disfunção pode levar ao acúmulo de substâncias nitrogenadas, como ureia e creatinina, que apresentam elevação em seus níveis basais (LEE et al., 2009). Estima-se que no mundo o número de pacientes com DRC tratados cresce a uma taxa anual de, aproximadamente, 8 a 10% (ZHANG et al., 2015). No Brasil, o número estimado de pacientes em diálise é de 100.397, sendo que representa um dos mais importantes problemas de saúde pública, uma vez que foram observadas taxas de prevalência de DRC de 500 pacientes por milhão da população. Além disso, o número estimado de pacientes que iniciaram tratamento dialítico em 2013 foi 34.161, correspondendo a uma taxa de incidência de 170 pacientes por milhão da população (SBN, 2013).

Várias patologias levam à DRC e, dentre elas, as mais importantes são a hipertensão arterial, diabetes *mellitus* (DM) e a glomerulonefrite (GARNEATA, 2008). A DRC possui um mecanismo de destruição renal progressiva e irreversível, incluindo a adaptação e hipertrofia dos néfrons funcionais, que passam a realizar, em um primeiro momento, a hiperfiltração glomerular. Este processo envolve um aumento de carga de trabalho dos néfrons remanescentes, os quais eventualmente morrem, limitando, assim, a capacidade de filtração dos rins, causando um estado de intoxicação generalizado, conhecido como uremia. Esta pode levar ao aparecimento de complicações como anemia, doença óssea, desnutrição e acidose metabólica (MOTA, 2000). Além disso, esta toxicidade pode levar a um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), e o estresse oxidativo é considerado um fator que está envolvido na patogênese da DRC (ROEHRS et al., 2009). Na DRC, a perda da funcionalidade dos rins torna necessário, para a grande maioria dos pacientes, utilizar terapia de reposição renal, como a hemodiálise (HD) (MALLICK e GOKAL, 1999). Neste contexto, a HD também está relacionada com o estresse oxidativo (MIRCESCU et al., 2005). Outro fator contribuinte associado à doença renal é a anemia, a qual deve ser corrigida com terapias adjuvantes, principalmente de ferro intravenoso. No entanto, o ferro é um metal de alto potencial oxidativo, sendo que participa da reação de Fenton, que parece potencializar ainda mais o estresse oxidativo (KOVESDY, 2009). Além disso, cabe ressaltar que o DNA é mais

suscetível ao ataque das EROs do que proteínas e lipídeos de membrana. Esta instabilidade genômica nos pacientes com DRC pode ser induzida por fatores como o estado urêmico, inflamação crônica, uso de ferro intravenoso e HD, associados ao aumento do estresse oxidativo (KUO et al., 2008). Portanto, ensaios que avaliam o dano à estrutura do DNA, como quebra de fitas simples e duplas, possuem importância significativa na avaliação da genotoxicidade destes pacientes (SCHUPP et al., 2010; TOVBIN et al., 2012). Alguns estudos demonstraram que pacientes com DRC apresentam um aumento no dano ao DNA (OPATRINA et al., 2009; ERSSON et al., 2013; CORREDOR et al., 2015). No entanto, não foi avaliado se pacientes com DRC apresentam aumento de DNA livre circulante, utilizando a técnica de Picogreen[®], a qual apresenta importantes vantagens, como rapidez e alta sensibilidade para a mensuração das concentrações de DNA livre em amostras de plasma (KRUSZEWSKI et al., 2012).

Considerando que o tratamento de HD e a terapia com ferro intravenoso são fatores que estão associados a um aumento do processo oxidativo (KOVESDY, 2009), e que este aumento da geração de EROs pode provocar um importante efeito deletério no material genético celular (ERSSON et al., 2013), torna-se relevante a investigação do efeito destes ambos tratamentos sobre o dano ao DNA em pacientes com DRC. Assim, este estudo visa avaliar o dano ao DNA induzido por HD e pela terapia com ferro intravenoso, bem como associar o dano nesta macromolécula com marcadores do estresse oxidativo e metabolismo do ferro, e ainda com a taxa de filtração glomerular, em pacientes com DRC.

2.1 DOENÇA RENAL

2.1.1 Definição e patogênese

Define-se doença renal quando os rins não são capazes de remover os produtos de degradação metabólica do organismo ou de realizar as funções reguladoras. As substâncias normalmente eliminadas na urina acumulam-se nos líquidos corporais em consequência da excreção renal comprometida, ocasionando, assim, um desequilíbrio nas funções endócrinas e metabólicas, bem como distúrbios hidroeletrólíticos e acidobásicos (KAO et al., 2010).

A doença renal é uma patologia sistêmica e que consiste na via final comum de várias patologias dos rins e do trato urinário (JOHNSON et al., 2014). Existem algumas situações que lesam o rim agudamente, outras levam anos para o dano tornar-se aparente. As doenças que lesam as diferentes estruturas dos rins incluem as nefrites, o DM, a hipertensão arterial,

infecções urinárias, obstruções das vias urinárias e as hereditárias (CHANG e KRAMER, 2011).

2.1.2 Complicações na doença renal

O número de pessoas que sofrem de doenças renais é muito grande. Essas doenças se manifestam de diversas formas e podem ser agrupadas em duas categorias principais: a IRA e a DRC (MIGUEL et al., 1988; FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Na IRA, os rins param de funcionar abruptamente, por completo ou quase, sendo que sua etiologia se divide em três fases: pré-renal, que são doenças que provocam hipoperfusão renal, sem comprometer a integridade do parênquima, estimando-se que 55% dos pacientes nesta fase desenvolvem hipovolemia provocada por hemorragias e diminuição no débito cardíaco na insuficiência cardíaca (IC); já na fase renal, as doenças como glomerulonefrite, esclerodermia, lúpus e necrose tubular, provocadas por drogas, afetam diretamente o parênquima renal; por fim, a fase pós-renal constitui-se de doenças associadas à obstrução do trato renal, que podem ser descritas como neoplasias de próstata, colo de útero e bexiga, fibrose retroperitoneal, entre outras (PALEVSKY, 2008). A diminuição abrupta da filtração glomerular na IRA resulta em retenção de produtos nitrogenados, distúrbios eletrolíticos e alterações no equilíbrio acidobásico (LEVEY et al., 2009).

A DRC é a evolução da IRA não tratada, caracterizando-se pela perda irreversível da função dos néfrons (BEVILACQUA, 1995). A nefropatia diabética, hipertensão e glomerulonefrite primária são as causas mais frequentes da DRC (RIELLA, 2003). A DRC relaciona-se, principalmente, à diminuição do ritmo de filtração glomerular, porém ocorrem também disfunções no controle do equilíbrio hidroeletrólítico e acidobásico. Essas alterações ocorrem pela deterioração das funções bioquímicas e fisiológicas de todos os sistemas do organismo, secundária ao acúmulo de catabólitos (toxinas urêmicas) (MOTA, 2000). Também podem ocorrer complicações crônicas, como hipertensão sistêmica e intrarrenal, que promove a nefrosclerose, como também progressão do dano imunológico e proteinúrico. Ocorrem alterações no metabolismo do cálcio, fósforo, fosfato e vitamina D, geralmente levando à secreção excessiva do hormônio paratireoide, resultando em hiperparatireoidismo secundário. Afeta, também, o sistema nervoso central e periférico, assim como as funções endócrinas e reprodutoras (INRIG et al., 2006).

2.2 ANEMIA NA DOENÇA RENAL

A anemia é uma grave complicação da DRC, causada principalmente pela produção renal insuficiente de eritropoietina (EPO). Esta é uma glicoproteína produzida principalmente pelos rins, sendo considerada como o principal mediador humoral da eritropoiese, responsável pela sobrevivência, proliferação e diferenciação dos progenitores eritroides. Sua forma sintética recombinante tem sido utilizada no tratamento da anemia em pacientes renais (BRON et al., 2001).

A anemia também pode estar relacionada ao estresse oxidativo, pois a oxidação favorece a formação de pontes de dissulfeto (-SS-) nas proteínas contendo grupamentos tiól (-SH). As pontes de dissulfeto oxidam estas proteínas prejudicando suas funções. Esta oxidação é reversível às custas da ação de compostos oxidantes, como a GSH. A membrana do eritrócito contém grande número de grupos -SH que podem ser oxidados a dissulfetos (de R-SH a R-SSG), levando à desnaturação das proteínas da membrana (GUYTON e HALL, 2011). Neste processo resulta lesão intracelular, com oxidação da hemoglobina a metemoglobina (MHb), que precipita e forma corpúsculos de Heinz. O componente lipídico da membrana eritrocitária também está sujeito à agressão oxidativa (GANZ, 2003). Assim, a associação dos fenômenos da lipoperoxidação, formação de corpúsculos de Heinz e oxidação dos grupos -SH poderão promover a lesão da membrana do eritrócito, levando a um aumento da rigidez de deformidade destes, o que os torna suscetíveis à hemólise (KUMBASAR et al., 2012).

A anemia na doença renal é multifatorial, pois existem suspeitas de que as toxinas urêmicas também possam inibir a eritropoiese e, ainda, reduzir o tempo de vida dos eritrócitos (NISSENSON e STROBOS, 1999). Atualmente, a suplementação de ferro intravenoso é indicada principalmente para pacientes renais que recebem a EPO, como melhor tratamento para a manutenção dos índices hematimétricos adequados. Porém, devido ao efeito pró-oxidante do ferro no organismo, o emprego deste em pacientes renais demonstra preocupação, uma vez que a sobrecarga de ferro poderia levar a geração de radicais livres via reação de Fenton. 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 (TRIVEDI e BROOKS, 2003).

2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA RENAL

A taxa de filtração glomerular (TFG) é a melhor medida geral da função renal e a mais facilmente compreendida, pois mede o volume e concentração de água filtrada fora do plasma pelas paredes dos capilares glomerulares nas cápsulas de Bowman, por unidade de tempo. Ela é definida como a capacidade dos rins de eliminar uma substância do sangue e é expressa como o volume de sangue que é completamente depurado em uma unidade de tempo (TILLEY et al., 2004; TILLEY et al., 2006; LEE et al., 2008). Normalmente, o rim filtra o sangue e elimina os produtos finais do metabolismo proteico, enquanto preserva solutos específicos, proteínas (particularmente albumina) e componentes celulares (GUYTON, 2011).

Na prática clínica, a TFG é avaliada por meio da mensuração de níveis de substâncias que são normalmente produzidas pelo corpo (LEVEY et al., 2009). A ureia, o primeiro marcador endógeno utilizado, não é completamente confiável, já que seus níveis são mais vulneráveis a mudanças por razões não relacionadas com a TFG. Uma dieta com alto consumo de proteínas, destruição tecidual, hemorragia gastrointestinal e terapia com corticosteroides pode determinar um aumento nos níveis de ureia plasmática, enquanto uma dieta pobre em proteínas e doença hepática podem levar a uma redução da mesma. Além disso, 40% a 50% da ureia filtrada pode ser reabsorvida pelos túbulos, embora a proporção esteja reduzida na DRC (FENTON et al., 2010).

A creatinina plasmática foi considerada o marcador endógeno cujo perfil mais se assemelhava àquele de uma substância endógena ideal para medir a TFG. A creatinina é quase exclusivamente um produto do metabolismo da creatina e da fosfocreatina no músculo esquelético, embora a ingestão de carne também possa contribuir levemente para os níveis dessa substância no sangue (LEVEY et al., 2014). A creatinina é livremente filtrada nos glomérulos e não é reabsorvida, mas até 15% é ativamente secretada pelos túbulos proximais. As duas maiores limitações para utilizar a creatinina como marcador da TFG são: como a creatinina é produzida nos músculos, a creatinina sérica depende da massa muscular e deveria ser ajustada para fatores relacionados à massa muscular quando utilizada como parâmetro para determinação da TFG; e a relação inversa da creatinina com a TFG não é uma relação direta, o que significa que o nível de creatinina só aumentará após a TFG ter decaído para cerca de 50% a 60% de seu nível normal (MOTA, 2000). Assim, o uso isolado da creatinina sérica para estimar a TFG é insatisfatório e leva a atrasos no diagnóstico e no tratamento da DRC (PINTO et al., 2004).

Clinicamente, o método mais utilizado para obter informações sobre a TFG é a depuração de creatinina, com coleta de urina ao longo de 24 horas, no qual a excreção de creatinina urinária em 24 horas é dividida pela concentração de creatinina sérica. Infelizmente, depuração de creatinina não preenche o critério de um marcador ideal para TFG, já que, como mencionado anteriormente, a creatinina é excretada não somente via filtração glomerular, mas também via secreção no túbulo proximal (MOTA, 2000). Entretanto, o principal problema com depuração de creatinina é a necessidade de coletar urina por 24 horas, que é inconveniente para os pacientes e, portanto, as coletas são frequentemente imprecisas. Atualmente, a determinação da TFG pela depuração de creatinina tem valores de referência entre 52 a 113 mL/min (FERNANDES et al., 2010).

A definição de DRC também é baseada na documentação do dano renal parenquimatoso. A albuminúria é o principal marcador do dano renal parenquimatoso. A albuminúria (albuminúria > 300 mg/dia) pode ser determinada na urina de 24 horas ou em uma amostra de urina isolada; nesse caso, a concentração de albuminúria é dividida pela concentração de creatinina urinária, a fim de corrigir para a variação no volume urinário (SANTOS et al., 2001). Também pode ser determinada na urina isolada a microalbuminúria, sendo que podem ser empregados vários métodos atualmente disponíveis utilizam anticorpos (radioimunoensaio, turbidimetria, nefelometria e ELISA) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que medem não somente a albumina imunorreativa, mas também a albumina intacta não imunorreativa (WEI et al., 2010).

Outros novos marcadores de dano renal já foram estudados. Dentre eles citamos a cistatina C (Cys C), pois sua determinação plasmática possui alta sensibilidade na avaliação do índice de filtração glomerular (BURON et al., 2011). Também temos a lipocaína associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), molécula de injúria renal-1 (KIM-1 Humana), interleucina-18 (IL-18), N-acetil- β -d-glucosaminidase (NAG), netrina-1, vanina-1, entre outros. Estes biomarcadores contribuem para melhor estratificar corretamente o grau de lesão renal e o risco de desenvolver DRC (PERES et al., 2013).

2.4 TÉCNICAS DIALÍTICAS NA DOENÇA RENAL

A perda grave da função dos rins é uma ameaça à vida e requer a remoção dos produtos tóxicos do metabolismo e a restauração do volume e da composição dos líquidos corporais. O número deste tipo de paciente cresce no mundo a uma taxa anual de, aproximadamente, 7%

(SZUSTER et al., 2012). Na DRC o paciente é submetido a modalidades terapêuticas de substituição renal (OLIVEIRA et al., 2005). Os tratamentos disponíveis são a HD, diálise peritoneal e transplante renal, sendo que estes não proporcionam uma expectativa de cura, mas sim a manutenção do estado de cronicidade (CHUNG et al., 2003).

Na diálise peritoneal o acesso se dá por meio de um cateter localizado na parede abdominal e inserido no peritônio. A solução eletrolítica estéril, conhecida como dialisato, é introduzida pelo cateter e a própria membrana peritoneal serve de filtro via mecanismo osmótico. Existem modalidades diferentes, como a diálise peritoneal ambulatorial contínua, a qual requer quatro trocas de cerca de dois litros de sangue por dia; já na diálise peritoneal automática as trocas são realizadas automaticamente por uma máquina, durante as horas de sono (CEVERO et al., 2008). Quanto à hemodiálise, são realizadas em média duas a três sessões de quatro horas por semana. Neste caso, o acesso vascular é feito através de uma fístula arteriovenosa, cirurgicamente realizada. A filtração do sangue é executada por uma máquina (dialisador) equipada com uma membrana semipermeável, permitindo a passagem de excesso de fluidos, sais e resíduos, retornando ao paciente após limpo (LANKHORST, 2010). O processo de hemodiálise ainda se associa a muitas complicações agudas e crônicas, como a glomerulonefrite crônica, DM, pielonefrite severa, doenças vasculares, hipertensão arterial crônica, anemia, doença renal policística, doenças autoimunes, uropatia, doenças do tecido conjuntivo, cálculo renal, entre outras (ROSTOKER et al., 2014).

2.5 DOENÇA RENAL E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

O mecanismo de destruição renal progressiva e irreversível inclui a adaptação e hipertrofia dos néfrons funcionais, que passam a realizar a hiperfiltração glomerular, que nada mais é do que o aumento de carga de trabalho dos néfrons remanescentes, os quais eventualmente morrem, limitando, assim, a capacidade de filtração dos rins, o que causa um estado de intoxicação generalizado, conhecido como uremia (MOTA, 2000). Esta toxicidade induz à formação elevada de EROs na patogênese da DRC (ROEHRS et al., 2009).

Procedimentos de terapia renal substitutiva, como a HD, também induzem o estresse oxidativo (MEKKI et al., 2010). Alterações relacionadas ao estresse oxidativo têm sido observadas na doença renal (JOHNSON et al., 2014), e o estudo de biomarcadores associados a este processo pode apresentar potencialidade para o monitoramento e diminuição das complicações provocadas pela doença. Dentre esses marcadores, a albumina modificada pela isquemia (IMA), o estado oxidante total (TOS), a capacidade antioxidante total (TAC) e os

responsáveis pelo metabolismo do ferro como a transferrina e ferritina podem constituir importante ferramenta para a investigação da doença renal.

Quando existe um desequilíbrio entre as espécies reativas produzidas e a capacidade antioxidante, cria-se uma situação que se denomina estresse oxidativo, a qual tem efeito nocivo para o metabolismo celular (JACOB et al., 2013). Os radicais livres gerados pelos tecidos dos organismos vivos têm sido associados a danos no DNA, proteínas e lipídeos (CAI e HARRISON, 2000). As principais EROs distribuem-se em dois grupos: as radicalares, como hidroxila (OH^{\bullet}), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}); e as não radicalares, como oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2) e peroxinitrito (OONO^{\bullet}) (ROBERTS e SINDHU, 2009). Os radicais livres também podem ser provenientes de outras fontes, principalmente dos múltiplos sistemas enzimáticos, incluindo ciclo-oxigenase, lipoxigenase, xantina oxidase, mieloperoxidase (MPO), óxido nítrico sintase (NOS) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (GEISZT e LETO, 2004).

O metabolismo celular humano está constantemente gerando processos fisiológicos como a produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), as quais podem produzir efeitos benéficos ou nocivos (BARREIROS et al., 2006). Estas espécies podem estar envolvidas em efeitos benéficos, como a detoxificação celular, atuação no sistema de defesa antioxidante, podendo atuar antes que ocorra a lesão causada pela ação dos radicais livres, ou espécies não radicalares, por meio da ação da glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e vitamina E, ou, então, para reparar a lesão ocorrida, por meio da ação do ácido ascórbico, glutathiona redutase (GSH-Rd), GSH-Px, entre outros (SHARMA et al., 2000; TOVBIN et al., 2002). Assim, o organismo está normalmente em equilíbrio entre a produção e degradação de radicais livres (PANDEY e RIZVI, 2010).

A albumina é a mais abundante proteína do sangue (entre 3,5g/dl e 5,0g/dl) sintetizada pelo fígado (BHAGAVAN et al., 2003). Essa proteína de 585 aminoácidos (66,5 kDa) possui, na região N-terminal, a sequência de N-Asp-Ala-His-Lis, que tem demonstrado ser um sítio de fortes ligações aos metais de transição, como o cobalto, cobre e níquel, e caracteriza-se, também, por ser a região mais sensível à degradação, se comparada com outras regiões da albumina (BAR-OR et al., 2000; CHO et al., 2007; MOTHEs e FALLER, 2007). A região N-terminal da molécula, especificamente o sítio de ligação aos metais de transição, passa por uma diminuição na sua capacidade de ligação na presença de processo isquêmico (BAR-OR et al., 2000; MORROW et al., 2003; GIDENNE et al., 2004; APPLE et al., 2005).

Modificações estruturais capazes de desencadear tais alterações podem potencialmente ocorrer como resultado de acidose, hipóxia, redução da tensão de oxigênio, disfunção da bomba de íons e geração de radicais livres (CHRISTENSON et al., 2001; BHAGAVAN et al., 2003; WORSTER et al., 2005; CHO et al., 2007).

A geração de EROs pode transitoriamente modificar o N-terminal da albumina e produzir um aumento da IMA, considerado um marcador de isquemia (BAR-OR et al., 2000). A IMA tem demonstrado ser um biomarcador precoce e sensível, especialmente para o diagnóstico de isquemia do miocárdio (BHAGAVAN et al., 2003). Estudo recente sugere que altos níveis de IMA podem ser usados em conjunto com parâmetros bioquímicos como a troponina, creatina quinase (CK) e creatina quinase fração MB (CK-MB) para o diagnóstico do infarto agudo do miocárdio (IAM) (TOKER et al., 2013; HAZINI et al., 2015). Além disso, a IMA também tem sido considerada um biomarcador de estresse oxidativo associado a diferentes condições clínicas (VALENTINI et al., 2007), como em pacientes com DRC, em que sua concentração encontra-se elevada, contribuindo para o prognóstico desses pacientes (SHARMA et al., 2006). Estudos evidenciaram valores elevados de IMA após sessões de HD, podendo ser atribuído ao aumento do estresse oxidativo durante esse processo. Assim, mais estudos são sugeridos para investigar a aplicabilidade da IMA como marcador de oxidação das proteínas em pacientes hemodialisados (ALBARELLO et al., 2012; TURKMEN et al., 2012). Outro estudo demonstrou que em pacientes diabéticos os níveis plasmáticos de IMA apresentaram-se mais elevados em relação aos pacientes pertencentes ao grupo controle, pois a condição de hipóxia induzida pela hiperglicemia e estresse oxidativo podem ter sido a causa deste aumento (ZUWALA-JAGIELLO et al., 2012). Também foi observado um significativo aumento dos níveis séricos de IMA em pacientes com hiperplasia prostática benigna (HBP). A causa do aumento deste marcador pode ter relação com o processo inflamatório causado pela HBP, a qual libera EROs (STACHOWICZ-STENCEL et al., 2012).

As concentrações séricas de diferentes espécies oxidantes podem ser mensuradas separadamente, mas geralmente estas técnicas são demoradas, dispendiosas e com um alto custo (TARPEY et al., 2004; EREL, 2005). Como a mensuração de diferentes oxidantes separadamente não é considerado prático, e seus efeitos oxidantes são sinérgicos, a avaliação do TOS pode estar indicando os níveis de todos radicais oxidantes livres causados pelo estresse oxidativo (EREL, 2005; ASLAN et al., 2007). O ensaio TOS, desenvolvido por Erel (2005), baseia-se no princípio da oxidação do íon ferroso na presença de oxidantes da amostra analisada, formando um complexo colorido em que a intensidade da cor é proporcional à presença de oxidantes, sendo medida por absorvância. Já o ensaio TAC, também,

desenvolvido por Erel (2005), baseia-se no princípio da redução de cor da solução colorida azul-escuro-verde 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), na presença de antioxidantes da amostra analisada, sendo que a intensidade da cor é medida pela absorbância. O organismo humano contém diversas moléculas antioxidantes, sendo as proteínas os principais constituintes antioxidantes do soro. A albumina é a principal fonte de grupos tióis (-SH) no plasma e é quantitativamente o mais importante componente extracelular de defesa antioxidante (MIRCESCU et al., 2005). Como também a determinação de diferentes antioxidantes isoladamente não é prática, uma ferramenta útil é a mensuração da TAC (EREL, 2005; HERRERA et al., 2001). Recente estudo constatou em pacientes com DRC, submetidos a HD, valores sérios diminuídos de TOS e TAC após a sessão de HD em comparação com a pré-HD (YILDIZ et al., 2014). Outros estudos descreveram que o acúmulo de toxinas urêmicas (JOURDE-CHICHE et al., 2011), biocompatibilidade da membrana do dialisador (DAHE et al., 2011), depleção dos antioxidantes de baixo peso molecular e o uso repetido de ferro intravenoso podem causar desequilíbrio entre os níveis de TAC e TOS (VAZIRI, 2013). No entanto, estudo recente destaca que dados da literatura sobre níveis de oxidantes e antioxidantes são, por vezes, inconsistentes e até opostos, merecendo uma avaliação mais cuidadosa para obter uma visão mais completa sobre este desequilíbrio que ocorre em pacientes com DRC submetidos à HD (RUSKOVSKA et al., 2014).

2.6 DOENÇA RENAL E BIOMARCADORES DO METABOLISMO DO FERRO

A anemia ferropriva é uma condição frequentemente associada a pacientes com DRC submetidos a HD (DOGARU et al., 2015). Várias causas podem provocar esta condição, como a ingestão inadequada de ferro, absorção deficiente, sangramento gastrointestinal e perda de sangue na membrana do dialisador (LIBETTA et al., 2011).

A terapia com ferro intravenoso é considerada o método mais adequado de tratamento da anemia nestes pacientes (FISHBANE, 2007). Entretanto, alguns estudos demonstraram que o ferro pode exacerbar o estresse oxidativo (DURAK et al., 1994; KOVESDY, 2009), pois sua administração pode elevar os níveis de ferro livre no plasma, especialmente quando ocorre saturação de transferrina, resultando em aumento de EROs (FISHBANE et al., 2014). O ferro pode exercer função de proteção, por fazer parte da enzima catalase, que quebra o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (ROY et al., 2006). Em contrapartida, pode ser prejudicial, já que, por ser um metal de transição, pode doar ou aceitar elétrons livres durante reações intracelulares, catalisando a formação de radicais livres, gerando OH[•]. Este é

extremamente reativo, podendo reagir rapidamente com alvos celulares mais próximos, lesando DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (ZARITSKY et al., 2009).

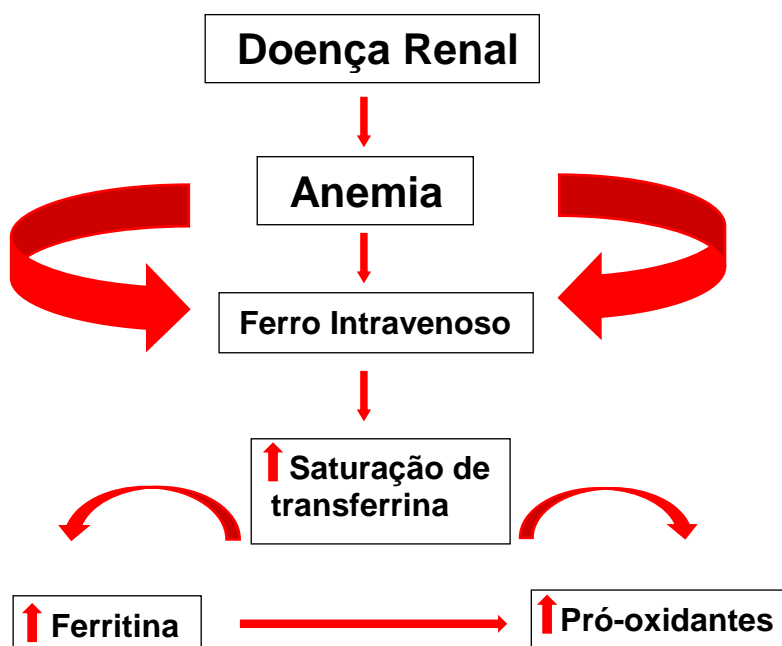
No organismo, a maior parte do ferro está na forma férrica (Fe^{3+}), pois este primeiramente precisa ser reduzido para a forma ferrosa (Fe^{2+}) para, então, participar da reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$). No estado metabólico normal, o ânion superóxido favorece a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Entretanto, se a concentração intracelular de ânion superóxido está elevada, a reação favorece a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} , perpetuando a reação de Fenton e formando mais OH^\bullet . Outra reação que pode gerar o OH^\bullet é a reação de Haber-Weiss, que é catalisada por metais de transição como ferro e cobre (AGUIAR et al., 2007).

O ferro, por ser um elemento tóxico para a célula, devido ao seu potencial oxidativo, não permanecendo livre no organismo, é encontrado sempre ligado a proteínas que são os receptores de transferrina e ferritina (NAITO et al., 2009; PRATS et al., 2014). Na fisiologia do ferro a transferrina tem papel fundamental na captação e transporte do mesmo, sendo ela uma beta-1-globulina de alto peso molecular (79.500 dáltons), constituída por uma única cadeia polipeptídica com dois sítios de ligação, quimicamente distintos para os íons férricos (LORENZI, 2006; ABENSUR, 2010). É sintetizada predominantemente no fígado (GUYTON e HALL, 2011). De acordo com a ocupação dos dois sítios de ligação de ferro da transferrina, esta pode ser: apotransferrina (sem ferro ligado), transferrina monoférrica (um átomo de ferro) e transferrina diférrica (dois átomos de ferro) (ZAGO et al., 2001; GROTTTO, 2008). A avidéz da ligação da apotransferrina aos enterócitos é muito maior que a transferrina saturada. Por outro lado, a transferrina diférrica tem muito mais afinidade que a monoférrica para os receptores celulares da transferrina, determinando que a liberação do ferro plasmático para os tecidos seja maior com o aumento da saturação da transferrina (ORINO et al., 2001; AN et al., 2012). O receptor da transferrina que é uma proteína transmembrânica, com peso molecular aproximado de 180.000 dáltons, composta por duas cadeias polipeptídicas idênticas, ligadas por uma ponte dissulfídica, liga-se a uma molécula de transferrina a cada uma das duas subunidades (WEISS, 2009). O complexo ferro-bicarbonato-transferrina, ligado ao receptor, entra na célula por endocitose (BETSY et al., 2006). A maior parte da captação do ferro da transferrina é feita pelas células precursoras eritrocitárias. Isso se deve ao fato dessas células apresentarem maior número de receptores da transferrina (GANZ, 2003).

A maior parte do ferro do organismo encontra-se incorporado à hemoglobina dos eritrócitos circulantes (60 a 70%). Aproximadamente 20-30% está na forma de ferritina e hemosiderina nos hepatócitos e nos macrófagos do sistema reticuloendotelial (WEISS, 2009).

A quantidade de ferro ligado à transferrina é de aproximadamente 3 mg, porém este compartimento é bastante dinâmico e altera até 10 vezes durante o dia (AN et al., 2012; SUSANTITAPHONG et al., 2014). O ferro é estocado nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea na forma de ferritina e hemosiderina. A apoferritina, a proteína livre de ferro, possui um núcleo em sua estrutura que pode abrigar até 4.500 átomos de ferro (LORENZI, 2006; ABENSUR, 2010). A apoferritina, contendo o núcleo férrico, constitui a ferritina (GROTTO, 2008). A maior parte da ferritina está localizada no interior das células, entretanto uma pequena quantidade entra na circulação. Estima-se que 1 µg/L de ferritina sérica corresponda a 8-10 mg de estoque tecidual de ferro. A concentração sérica de ferritina é utilizada como um indicador bastante útil dos estoques de ferro. Portanto, na DRC a utilização de ferro intravenoso para correção da anemia, resulta no aumento deste metal, contribuindo assim, para elevação dos efeitos pró-oxidantes (Figura 1) (GANZ, 2007; GROTTO, 2008; TANAKA, 2015).

Figura 1- Marcadores do metabolismo do ferro na DRC



Fonte: Adaptado de Ganz, 2007.

Em pacientes com DRC é amplamente reconhecido que a deficiência de ferro está associada aos níveis de ferro e ferritina (MAŁYSZKO et al., 2012). Entretanto, este diagnóstico se torna desafiador, pois nestes pacientes podem estar presentes processos

inflamatórios agudos e crônicos, os quais promovem alterações no metabolismo do ferro (RAMBOD et al., 2008). As alterações no sincronismo dos processos de absorção do ferro, reciclagem, mobilização, utilização e estoques podem causar importantes repercussões clínicas para esse paciente. O aumento do componente inflamatório no organismo deste, está associado a uma menor concentração de transferrina e capacidade ferropéxica e um aumento nos níveis de ferritina (THOMAS et al., 2006). Embora estas alterações causam preocupação para os pesquisadores, as concentrações de ferro e ferritina plasmática continuam sendo marcadores confiáveis para avaliar o metabolismo do ferro (GHOTI et al., 2012)

A deficiência funcional de ferro na DRC pode ser uma condição associada à inflamação, em que o paciente apresenta estoques adequados de ferro no organismo, representados por níveis elevados de ferritina sérica, porém não consegue mobilizar o ferro dos estoques, e a saturação de transferrina atinge níveis abaixo de 25% (ARMALY et al., 2015). Assim, o emprego do ferro intravenoso poderá contribuir para uma melhora no quadro, evitando o esgotamento do armazenamento do ferro, prevenindo a eritropoiese deficiente e mantendo níveis aceitáveis de hemoglobina (Hb) (ABENSUR, 2010). Entretanto, Liles (2012) avaliou a eficácia da administração de ferro oral e intravenoso em pacientes com DRC não dependentes de HD e concluiu que o ferro intravenoso aumentou significativamente os níveis séricos de ferritina, porém os níveis de Hb não obtiveram um aumento significativo.

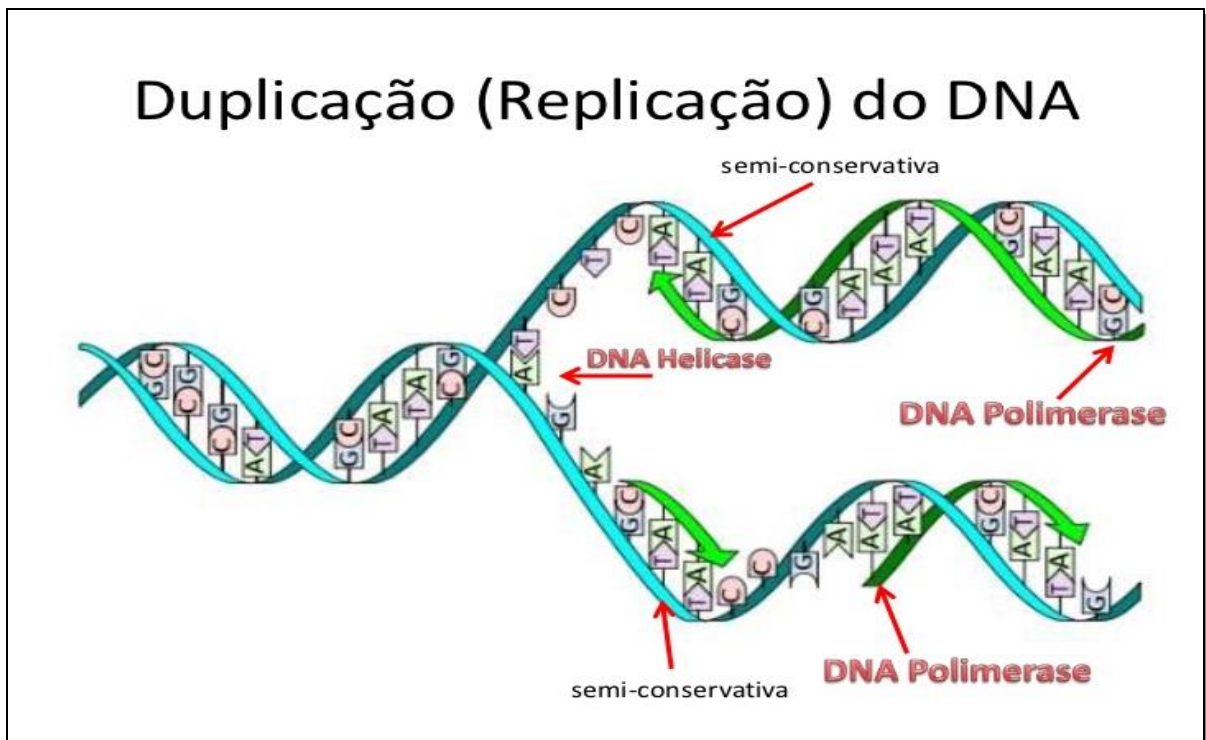
Alguns estudos demonstraram que a administração de ferro em pacientes com DRC submetidos a HD tem papel fundamental para manutenção das reservas, porém o seu uso excessivo pode promover o aumento do estresse oxidativo, o qual estimula a inflamação, disfunção imune, doença cardiovascular, progressão da doença renal e aumento do dano ao DNA (KUO et al., 2008; JAIRAM et al., 2010; BUREN et al., 2012). Estudos adicionais demonstraram que administração de ferro intravenoso em pacientes submetidos a HD aumenta os subprodutos oxidativos, bem como a redução de antioxidantes, tais como a SOD e GSH-Px (HERRERA et al., 2001; TOVBIN et al., 2002). Em pacientes com hepatite crônica, Kato et al. (2001) observaram uma relação direta entre a sobrecarga de ferro e os níveis de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). Estes resultados demonstram que a redução nos estoques de ferro devido a flebotomia e a dieta pobre em ferro resultou em uma maior reparação dos danos oxidativos ao DNA nestes pacientes. Outros estudos apontam para a existência de causas da deficiência de ferro na DRC que devem ser investigadas, tais como redução da ingestão de ferro devido a dietas de baixa proteína e anorexia, perda de sangue a nível gastrointestinal devido à uremia, causando disfunção plaquetária, bem como esofagite, gastrite, tumores, antiagregantes plaquetários e anticoagulantes (SILVERBERG et al., 2011).

2.7 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

A molécula do DNA tem uma estrutura tridimensional de dupla hélice constituída por duas cadeias (fitas) polinucleotídicas, dispostas em direções opostas, enroladas em torno de um eixo comum (BURTIS et al., 2008). A estrutura da cadeia é formada por grupos fosfato e pentoses, alternadamente ligados por pontes de fosfodiéster, as cadeias da dupla hélice são mantidas juntas por ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas purínicas, adenina (A) e guanina (G), e pirimidínicas, citosina (C) e timina (T). Essas bases, adenina-timina e guanina-citosina, por meio da sua sequência e emparelhamento, carregam toda a informação genética, enquanto o açúcar e o fosfato constituem apenas a espinha dorsal estrutural do DNA (WATSON et al., 2006). Embora as duas cadeias do DNA sejam complementares, elas não são idênticas e são antiparalelas. No entanto, as bases de purina e pirimidina estão no interior da hélice e os planos das bases são perpendiculares ao eixo da hélice (ZAHA et al., 2014).

Watson et al. (2006) propuseram o modelo da dupla hélice do DNA, respondendo que a duplicação ocorre pela formação de uma cadeia complementar a partir da separação das duas fitas, processo este chamado de duplicação semiconservativa, pois conserva 50% do DNA da célula-mãe, utilizando uma das fitas como molde para a duplicação. Para que essa duplicação ocorra, as pontes de hidrogênio se desfazem para as cadeias se separarem. Após esta separação, que ocorre com a ajuda de enzimas, uma nova cadeia começa a ser formada, chamada cadeia complementar, com a ajuda da enzima DNA-polimerase. A adenina sempre emparelha com a timina, e a guanina sempre emparelha com a citosina na fita de DNA; no RNA a adenina emparelha com a uracila. No final do processo temos duas fitas idênticas. Assim, as duas fitas de DNA que atendem a esses requerimentos são chamadas de complementares. Devido ao pareamento de bases e à conformação dupla-hélice, o DNA dupla-fita (dsDNA) é uma molécula excepcionalmente estável (BURTIS, 2008). Essas propriedades também garantem a propriedade de replicação de cadeias longas de DNA e a transmissão de informação genética às proteínas, via transcrição (Figura 2) (ZAHA et al., 2014).

Figura 2 - Estrutura do DNA dupla-hélice



Fonte: Da Silva et al., 2011

2.7.1 Dano ao DNA

As quebras de duplas fitas no DNA são caracterizadas pela ruptura concomitante das ligações fosfodiésteres na mesma região, ou em regiões próximas de ambas as fitas de DNA. Sendo assim, essa dupla ruptura tem como consequência o desligamento físico da integridade sequencial da informação genética, além da perda do referencial correto que é utilizado em muitas vias no qual apenas uma das fitas foi comprometida (PAIDIPALLI et al., 2013). Dessa forma, quando comparamos esse tipo de lesão com as demais, logo seu nível de complexidade e possível efeito deletério se tornam evidentes. No entanto, sejam eventos complexos, as quebras de duplas fitas no DNA são relativamente frequentes no genoma e estimadas ocorrerem no interior de nossas células cerca de dez vezes no intervalo de vinte e quatro horas (LEHMANN e FUCHS, 2006).

A indução de danos oxidativos nas bases do DNA ocorre a partir da sua reação com EROs. Essas lesões podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucleicos ou, muitas vezes, podem levar à formação de quebras em uma das cadeias do DNA (quebras simples - SSB “*single strand break*”) ou quebras simples em posições aproximadamente simétricas nas

duas cadeias do DNA (quebras duplas - DSB “*double strand break*”) (KOZAK et al., 2009). Além disso, quebras simples podem gerar quebras duplas durante a replicação celular (CALDECOTT, 2008). Tais danos induzem diversas respostas celulares, que objetivam a correção do erro, ou mesmo ativação do mecanismo de morte celular programada para eliminação de células com mutações potencialmente prejudiciais ((DELANEY et al., 2012).

De maneira geral, os danos podem ser divididos em SSBs e DSBs. Os SSBs são os tipos mais comuns de danos, surgindo com uma frequência de dezenas de milhares por célula ao dia (CALDECOTT, 2008). Os DSBs, por sua vez, são os tipos de danos mais citotóxicos (KOZAK et al., 2009), possuindo um grande potencial em comprometer a estabilidade genômica. DBSs e SSBs podem ser formados em resposta à ação de agentes endógenos e exógenos, tais como radiação ionizante, a qual pode induzir diretamente o dano, ou indiretamente, pela formação de EROs (O’DRISCOLL e JEGGO, 2006). Sabe-se que o reparo do DNA está intimamente interligado com a regulação do ciclo celular, transcrição e replicação (CALONGE e O’CONNELL, 2008). Quando o tipo e a quantidade de danos superam a capacidade de reparo das células, esses mecanismos celulares essenciais podem ser seriamente afetados. Sendo assim, caso essas lesões não sejam removidas, podem levar as células à morte, ou resultarem na incorporação de mutações no genoma, sendo transmitidas para as gerações futuras (DELANEY et al., 2012). Mais ainda, essas mutações podem provocar efeitos genotóxicos severos e, conseqüentemente, gerar instabilidade genômica e até aparecimento de câncer (McGREGOR, 2007).

2.8 AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA

2.8.1 Ensaio de fragmentação de DNA por fluorimetria com corante Picogreen®

O uso das técnicas de ensaio cometa alcalino, análise de micronúcleos e eletroforese em gel de agarose para avaliar dano de DNA é amplamente adotado (RANGEL-LÓPEZ et al., 2013). Entretanto, a principal limitação desses testes é a sua interpretação subjetiva, pois os resultados gerados são qualitativos ou semiquantitativos. Por este motivo, novos ensaios têm sido propostos para analisar dano de DNA via técnicas quantitativas (KRUSZEWSKI et al., 2012). É importante comentar que danos no DNA podem ser reparáveis (como a fragmentação) e não reparáveis (se ocorrer incisões e modificações nas moléculas de açúcar e das bases nitrogenadas). Ambas as condições podem ser causadas por fatores ambientais em que o ataque oxidativo é uma das principais causas de genotoxicidade (GEORGIU et al., 2009).

A fragmentação de DNA livre na circulação sanguínea pode estar aumentada em pacientes com várias lesões, tanto benignas como malignas (FLEISCHHACKER e SCHMIDT, 2007). O mecanismo da presença de DNA livre na circulação ocorre quando existe dano celular, presença de células apoptóticas e necróticas em que o DNA fragmentado pode entrar na circulação e espaço intracelular, sendo medido pelo ensaio Picogreen®. Esse DNA livre é o excesso de DNA extracelular circulante (STROUN et al., 2001).

Nos últimos anos, a análise quantitativa de DNA utilizando corantes fluorescentes começou a ser realizada. Georgiou et al. (2009) desenvolveram um protocolo em que a análise da quantidade de DNA é medida por fluorimetria. Nesta técnica, corantes ultrasensíveis como o Picogreen® ligam-se apenas ao DNA que está em dupla-fita (*doublestrand* ou dsDNA). Portanto, se o DNA apresentar algum tipo de fragmentação provocada por fatores endógenos ou exógenos, a fluorescência emitida vai diminuir, proporcionando uma avaliação do efeito genotóxico (ERSSON et al., 2013). Assim, foi sugerido que o uso de ensaio de quantificação do DNA medido por fluorimetria utilizando o DNA Picogreen® pode ser considerado um teste quantitativo. Este método apresenta como vantagem a sensibilidade, pois detecta dsDNA em uma quantidade mínima de 25 pg/mL, com um fluorímetro padrão que não se liga a outras moléculas de ácidos nucleicos com DNA fita-simples ou RNAs. Assim, a fluorescência emitida será relacionada apenas à presença de dsDNA.

Estudos realizados em pacientes do sexo masculino, com níveis séricos do antígeno prostático específico (PSA) acima dos valores de referência (entre 4 a 10 ng/mL), demonstraram a presença de níveis de DNA livre circulante, utilizando as técnicas do Picogreen® e reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados demonstraram correlação entre as técnicas, sendo que mostraram a importância da quantificação dos níveis de DNA circulante nesses pacientes, uma vez que 65 a 75% destes necessitariam fazer biópsia. Assim, os resultados apresentados neste trabalho pelas técnicas mencionadas obtiveram valores dos níveis de DNA livre circulante que permitiram definir o valor preditivo negativo (VPN) para câncer de próstata de 86,8%, proporcionando uma diminuição de 36% das biópsias sugeridas para estes pacientes em estudo (RAMACHANDRAN et al., 2013).

Outro estudo avaliando pacientes com câncer de pulmão demonstrou que os valores dos níveis de DNA livre circulante no plasma utilizando o ensaio Picogreen® foram dez vezes mais elevados do que os níveis avaliados pela técnica do PCR (SZPEHCINSKI et al., 2008). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que o primeiro ensaio pode detectar quase todos os fragmentos de DNA livre circulante (AHN et al., 1996), enquanto o segundo método

detecta somente os fragmentos amplificáveis de DNA livre circulante (HERRERA et al., 2005).

Esta técnica de análise de fragmentação do DNA pelo Picogreen[®] está começando a ser utilizada em diversas situações, incluindo análise no plasma para identificar morte celular extensa de leucócitos, principalmente em estados de doenças infecciosas como a dengue, na qual foram encontrados valores elevados dos níveis de DNA livre circulante, os quais obtiveram correlação positiva com a gravidade desta doença e que provavelmente foram lançados na circulação a partir de células apoptóticas (HA et al., 2011). Outra situação em que vem sendo utilizado o ensaio Picogreen[®] é a análise da ação genotóxica de pesticidas em ensaios *in vitro* com culturas celulares (PARRA et al., 2012), e para a quantificação de DNA em culturas de células bi e tridimensionais (CHEN et al., 2012).

2.8.2 Outros ensaios

Novas metodologias para avaliação de danos no DNA têm sido desenvolvidas. Uma das técnicas utilizadas para detecção de genotoxicidade tem sido o ensaio cometa, devido a sua capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001). O ensaio cometa (teste de células individualizadas em gel de agarose) é uma técnica útil para o estudo de danos e reparos no DNA. As células com dano aumentado no DNA mostram um aumento na migração de DNA cromossomal do núcleo em direção ao ânodo, que se assemelha à forma de um cometa (SPEIT e HARTMANN, 1999).

A técnica consiste em colocar as células em gel sobre uma lâmina de microscopia, faz-se passar uma corrente elétrica e, como o DNA tem carga negativa, se estiver rompido (clastogênese), migra para fora do núcleo, ficando com a aparência de um cometa ou cauda (PAN et al., 2007; BAGATINI et al., 2008). O DNA que não estiver rompido ou quebrado fica armazenado no núcleo, sendo muito grande para migrar (SILVA et al., 2000). Esta técnica analisa lesões, monitora o dano e detecta efeitos de reparo no DNA em células individuais expostas a agentes genotóxicos. Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos álcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão (SILVA et al., 2000; PAVÃO et al., 2007). Apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, uma vez que pode ser utilizado para qualquer tipo de célula (qualquer tecido que seja possível extrair células nucleadas), sendo necessário apenas um pequeno número delas e por não necessitar de células em divisão (SPEIT e HARTMANN, 1999).

O DNA pode sofrer ataque e mutações de diferentes moléculas e substâncias químicas, como as EROs. Como resultado da oxidação do DNA por essas moléculas, principalmente pelo OH^{*}, pode ser gerado uma mutação na base nitrogenada guanina do DNA (adição na posição 8), dando origem a modificação química permanente, a 8-OHdG, que pode ser removida por ação de enzimas de excisão, constituindo assim um marcador biológico da ação de agentes genotóxicos sobre o DNA (FISCHER et al., 2013). Essa molécula mutante pode ser detectada por CLAE ou por ensaio imunoenzimático (ELISA), em 14 amostras biológicas, como urina, soro, cultura de células e tecidos humanos e animais, entre outras (DEL et al., 2005). Essa técnica é amplamente utilizada para a detecção de mutagênicos, com implicações em estudos clínicos, associados à idade e ao câncer, por ser altamente sensível e específica. Porém, é um ensaio de alto custo e laborioso.

Outro método bastante utilizado *in vivo* para a detecção de genotoxicidade é o teste de micronúcleos. Essa técnica é utilizada desde 1970, principalmente em linfócitos do sangue periférico e em células epiteliais esfoliativas, com o objetivo de detectar agentes clastogênicos (que causam quebras cromossômicas) e de agentes que induzem aneuploidia (perda de cromossomos inteiros) (SANDOVAL et al., 2010). Tanto as alterações numéricas quanto as estruturais estão associadas com o surgimento e progressão de tumores, e com efeitos reprodutivos adversos (RAMIREZ et al., 2001). Os micronúcleos são núcleos pequenos que se originam de fragmentos cromossômicos, como resultado de quebras cromossômicas ou de um cromossomo inteiro que se desprende do fuso. Assim, por meio desse método, pode ser identificada a presença de danos em cromossomos induzidos por agentes genotóxicos, os quais atuam interferindo na formação do fuso mitótico, o que pode afetar a distribuição equitativa dos cromossomos na divisão celular (RAMIREZ et al., 2001). Essa técnica é indicada para avaliar o efeito genotóxico em diferentes situações, como más condições de cultura celular, senescência e variabilidade na resposta das células a um agente estressor (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). As lesões no DNA são avaliadas através do microscópio óptico e classificadas da seguinte maneira: Micronúcleos (MNs), Pontes Nucleares (PNs), Buds nucleares (BUD) ou “*Broken eggs*”.

Entre outras metodologias referenciadas na literatura que mensuram o dano ao DNA estão a reação em cadeia da polimerase, ensaio de apoptose por método fluorimétrico *Terminal deoxyribonucleotidyl transferase Mediated Deoxyuridine Triphosphate Nick end Labeling assay* (TUNEL), ensaios fluorescentes, entre outros (KUMARI et al., 2008). Além disso, tem se destacado a aplicação de métodos de proteômica para o estudo de dano ao DNA (DU PUCH et al., 2013). Um dos testes utilizados para a avaliação de danos na cromatina é o

TUNEL. Este ensaio se baseia na incorporação de nucleotídeos marcados com isotiocianato de fluoresceína nas regiões 3'OH livres da quebra de fita simples ou dupla de DNA. Essa reação é catalisada pela enzima nucleotidil transferase, que polimeriza os nucleotídeos modificados nas regiões de quebra do DNA. A incorporação dos nucleotídeos marcados amplificados pode ser detectada por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo (PULKKANEN et al., 2000; KUMARI et al., 2008). Este ensaio também é utilizado para a verificação de apoptose (BRUGGEMAN et al., 1997). Apresenta limitações quanto à sensibilidade e especificidade. Na célula apoptótica, a condensação de DNA e o ambiente proteico de DNA podem interferir na progressão deste ensaio (GOLD et al., 1994).

2.9 DANO AO DNA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

Pacientes com DRC submetidos à HD tem elevado dano genômico, possivelmente devido à exposição de processos maléficos como o estresse oxidativo (SCHUPP et al., 2010; HACIŞEVKI et al., 2013). A presença deste processo promove reações com substratos biológicos, podendo ocasionar danos a proteínas, lipídeos e DNA. Os danos considerados de maior relevância são aqueles causados na estrutura do DNA, como quebras de fita simples e dupla, as quais são detectáveis nos testes de genotoxicidade como o ensaio Picogreen[®], ensaio cometa, níveis de 8-OHdG, entre outros (STOYANOVA et al., 2014). Estes tipos de danos ao DNA são, teoricamente, reparáveis. Entretanto, a capacidade de reparo do DNA é reduzida pelo processo de HD prolongada (VAMVAKAS et al., 1996). Estes danos, quando reparados indevidamente, podem trazer consequências importantes, como aterosclerose e pré-disposição ao câncer (MERCER et al., 2007).

A terapia de HD ameniza parte dos problemas apresentados na DRC e permite uma maior sobrevida ao paciente. Contudo, ela é incapaz de corrigir os profundos distúrbios metabólicos aos quais os pacientes urêmicos estão sujeitos (MIRCESCU et al., 2005). Durante a HD existe uma grande produção de EROs, provocando aumento do estresse oxidativo e subsequente dano ao DNA (NGUYEN-KHOA et al., 2001), sendo que vários fatores estão envolvidos. Dentre eles, destacamos o procedimento dialítico, incluindo a bioincompatibilidade da membrana e a perda de antioxidantes durante o procedimento, a possível contaminação do dialisado por endotoxinas e o próprio estado urêmico em si, devido ao acúmulo de vários solutos no organismo do paciente (HIMMELFARB et al., 1991).

A HD e a uremia presentes na DRC representam a amplificação das respostas inflamatórias, resultando em um aumento da geração de EROs (ANDRIKOS et al., 2005). Além disso, a falta de defesas antioxidantes diminui essa resposta inflamatória amplificada, podendo levar a um crônico ciclo vicioso de radicais livres, causando produção de mediadores inflamatórios que voltam a estimular a produção desses radicais livres (BAYES et al., 2006). Essa produção crônica pode lesar proteínas, lipídios e principalmente o DNA, mantendo altos os índices de estresse oxidativo nesses pacientes. Além disso, Kuo et al. (2008) demonstraram que os níveis elevados de 8-OHdG em linfócitos é confiável para avaliação do dano ao DNA em pacientes submetidos a um tratamento prolongado de HD. Entretanto, o tempo de tratamento de HD é muito controverso, pois alguns estudos encontraram aumento nos níveis de dano ao DNA (STOPPER et al., 1999; KUO et al., 2008), enquanto que outros não conseguiram encontrar esta associação (STOPPER et al., 2001; KAN et al., 2002).

A alta incidência de danos ao DNA e instabilidade genômica é atribuída ao processo de HD (KRUSZEWSKI et al., 2012). Para reduzir estes danos, diferentes procedimentos alternativos de HD têm sido propostos, tais como o uso da técnica de hemodiafiltração (HDF), a qual é baseada na solução estéril não pirogênica obtida do dialisato recém-produzido pela máquina de HDF por ultrafiltração dupla e infundida diretamente no sangue do paciente (MOURA et al., 2014). Estudo recente realizou, em trinta e três pacientes submetidos a HDF, avaliação de danos ao DNA pré-HDF e pós-HDF, através do ensaio de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico desses pacientes. Os resultados indicaram uma significativa redução dos níveis basais de dano genético, confirmando a técnica HDF como uma alternativa para redução de dano ao DNA em pacientes submetidos a HD (RODRÍGUEZ-RIBERA et al., 2016).

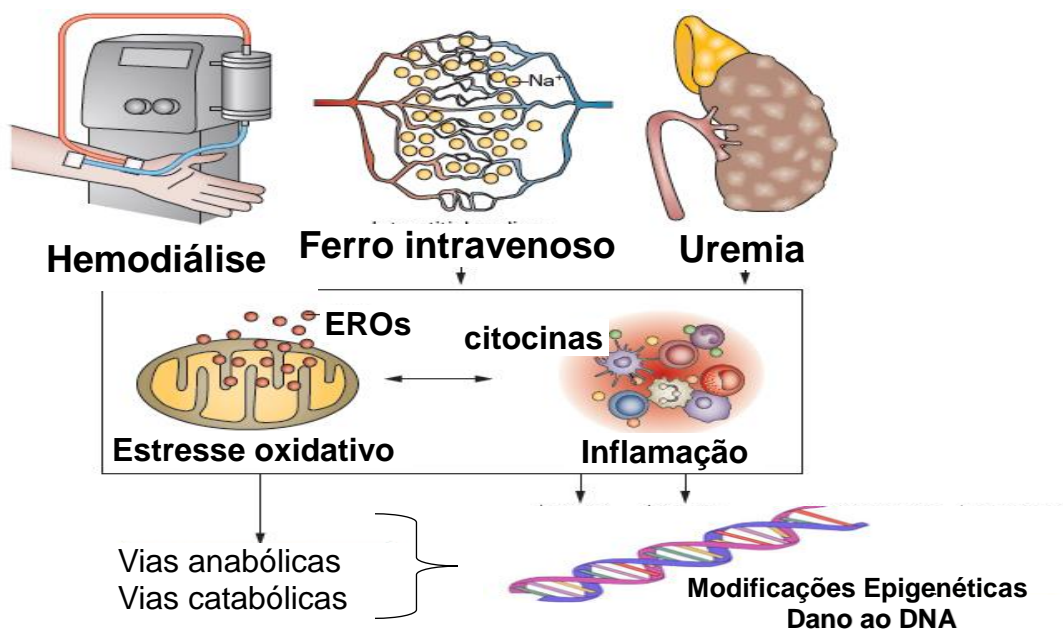
Recentemente, outro estudo envolvendo um total de 602 pacientes adultos, incluindo 415 que sofriam de patologias renais (209 realizavam sessões de HD) e 187 pacientes do grupo controle, demonstrou níveis elevados de danos genômicos, avaliados através do ensaio cometa, nos pacientes com DRC em relação aos pacientes pertencentes ao grupo controle. Entretanto, os níveis de dano ao DNA entre os pacientes com DRC que não eram submetidos a terapia de HD e os que faziam uso desta, não apresentaram diferença significativa. Os autores concluíram que o dano ao DNA pode ser uma característica de todos os pacientes com DRC, independente do uso da terapia de HD (CORREDOR et al., 2015).

A DRD é a principal doença renal crônica em pacientes diabéticos, que acomete cerca de 20-40% desses pacientes (ADA, 2016). Estudo de Nishikawa et al (2003) avaliou a relação entre a gravidade da DRD e os níveis urinários de 8-OHdG e observou que os níveis

urinários deste biomarcador de dano ao DNA foi 1,9 vezes maior nos pacientes com albuminúria do que naqueles sem DRD. Outro estudo demonstrou que em vinte e cinco pacientes diabéticos tipo 2 submetidos a HD ocorreu aumento nos níveis de dano ao DNA logo após a sessão de HD, porém 48 horas após foi observada uma significativa diminuição neste dano (BAGATINI et al., 2008).

A suplementação de ferro é uma recomendação comum para pacientes com doença renal. No entanto, o excesso de ferro pode agir como fator pró-oxidante via reação de Fenton, contribuindo, assim, para o dano ao DNA (MIMIC-OKA et al., 2005; CĂPUȘĂ e MIRCESCU, 2010). Estudos adicionais demonstraram que a administração de ferro endovenoso em pacientes submetidos a HD aumenta os subprodutos oxidativos, bem como a redução de antioxidantes, tais como SOD e GSH-Px (HERRERA et al., 2001; TOVBIN et al., 2002). Diante disso, estudos que abordam mecanismos patológicos presentes na DRC como o estado urêmico que induz um aumento na inflamação, aumento da EROs e a possível ligação entre o estresse oxidativo e o dano ao DNA, bem como a associação deste dano com estoques de ferro em pacientes em HD são importantes, visto que níveis elevados de ferro podem agravar o dano ao DNA já presente nesses pacientes (Figura 3) (KALANTAR-ZADEH et al., 2009).

Figura 3 – Mecanismos patológicos presentes no dano a estrutura do DNA



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o dano ao DNA em pacientes com doença renal crônica submetidos à hemodiálise e sua associação com biomarcadores do metabolismo do ferro e estresse oxidativo.

3.2 Objetivos específicos

- Mensurar os níveis plasmáticos de DNA livre, através do ensaio Picogreen[®], nos pacientes do estudo;
- Verificar a associação do dano ao DNA com marcadores do metabolismo do ferro e de função renal nos pacientes com doença renal submetidos à hemodiálise;
- Verificar o efeito do tratamento com ferro intravenoso sobre os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes submetidos à hemodiálise;
- Avaliar parâmetros bioquímicos associados ao metabolismo glicêmico e lipídico, bem como marcadores de função renal e hepática nos pacientes do estudo;
- Investigar se uma única sessão de hemodiálise é capaz de promover o aumento do DNA livre nos pacientes com doença renal submetidos à hemodiálise;
- Determinar o efeito do tratamento com ferro intravenoso sobre os níveis plasmáticos de DNA livre nos pacientes com doença renal submetidos à hemodiálise.

4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

4.1 ARTIGO CIENTÍFICO I

Circulating Double-Stranded DNA in Plasma of Hemodialysis Patients and its Association with Iron Stores

Luiz Carlos Cichota, Guilherme Vargas Bochi, Etiane Tatsch, Vanessa Dorneles Torbitz, Paulo Roberto Dall Agnol, Jean Carlos Zanardo, Fernanda Barbisan, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Rodrigo de Almeida Vaucher, Rafael Noal Moresco

Artigo publicado no periódico *Clinical Laboratory*

Clin. Lab. 2015;61:985-990. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2015.141239

ORIGINAL ARTICLE**Circulating double-stranded DNA in plasma of hemodialysis patients and its association with iron stores**

Luiz Carlos Cichota^{1,2}, Guilherme Vargas Bochi¹, Etiane Tatsch¹, Vanessa Dorneles Torbitz¹, Paulo Roberto Dall Agnol³, Jean Carlos Zanardo³, Fernanda Barbisan⁴, Ivana Beatrice Manica da Cruz⁴, Rodrigo de Almeida Vaucher⁵, Rafael Noal Moresco^{1,*}

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Santa Maria, Brazil

²School of Pharmacy, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, Brazil

³Hemodialysis Unit, Santa Teresinha Hospital, Erechim, RS, Brazil

⁴Laboratory of Biogenomics, Department of Morphology, Center of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁵Laboratory of Microbiology, Center of Health Sciences, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding Author: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

Email: rnmoresco@ufsm.br

Declaration of Interest: There are no conflicts of interest to declare.

Running title: Circulating double-stranded DNA in plasma of HD patients

SUMMARY

Background: Chronic kidney disease (CKD) is characterized by oxidative stress, and most of the adverse effects of CKD are mediated by iron-catalyzed ROS generation. The DNA, in particular, is more susceptible to attack by ROS than other proteins and membrane lipids. Considering the evidence on the relationship between CKD, iron metabolism, and DNA damage, the purpose of this study was to evaluate cell-free DNA in the plasma of HD patients and its association with iron status biomarkers and kidney function.

Methods: Measurements of the circulating cell-free DNA in plasma, iron, ferritin, transferrin and other biochemical parameters were performed in 40 chronic hemodialysis (HD) patients and 40 healthy controls. It was also collected blood samples 1 hour before and 1 hour after the HD session to check whether a single HD session would be able to promote an increase in cell-free DNA in the plasma.

Results: Cell-free DNA in plasma was significantly increased in HD patients in comparison with healthy controls ($P = 0.0017$), and significant correlations were observed between cell-free DNA and GFR and ferritin. Our findings showed that a single HD session was not able to promote an increase in cell-free DNA. It was reported that increased ferritin levels and reduced GFR were associated with higher circulating cell-free DNA.

Conclusions: The HD patients present increase of cell-free DNA. In addition, the increase of ferritin levels and the decrease of GFR were associated with DNA damage. We also observed that a single HD session was not able to promote an increase in cell-free DNA.

Keywords: Chronic kidney disease, DNA damage, hemodialysis, iron.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is highly prevalent, with increasing numbers of patients that are affected worldwide. The progressive nature of chronic kidney failure and the ensuing end-stage renal disease (ESRD) is putting a substantial burden on global health-care resources [1]. Maintenance hemodialysis (HD) therapy is an inevitable treatment in ESRD patients [2] [3]. In the course of CKD and ESRD, a chronic inflammatory state develops, which is characterized by oxidative stress and sustained immune dysregulation [4]. In these patients on maintenance HD, the recurrent blood interaction with bioincompatible dialysis membranes triggers polymorphonuclear neutrophil and monocyte activation and the subsequent generation of highly reactive oxygen species (ROS) [5].

Iron is an elementary trace metal that is essential for nearly all organisms. However, the iron excess can promote oxidative stress through the production of hydroxyl radicals via Fenton/Haber–Weiss catalytic reactions [6], which in turn cause tissue damage. Free radicals may bring about oxidative damage of DNA that manifests by the development of various complications in patients with CKD. Most of the adverse effects of CKD are mediated by iron-catalyzed ROS generation, which results in cell injury and dysfunction. The DNA, in particular, is more susceptible to attack by ROS than other proteins and membrane lipids [7]. Maruyama et al. [8] showed that repeated intravenous iron administration in HD patients was associated with signs of increased oxidative DNA injury, as reflected by increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), and these changes were accompanied by increased serum ferritin levels.

Considering the evidence on the relationship between CKD, iron metabolism, and DNA damage, the purpose of this study was to evaluate cell-free DNA in the plasma of HD patients by use of PicoGreen, an ultra-sensitive assay for quantitating double-stranded DNA (dsDNA), and its association with iron status biomarkers and kidney function. We also investigated whether a single HD session could promote an increase in cell-free DNA.

MATERIALS AND METHODS

Study population

A total of 40 chronic HD patients and 40 healthy controls were included in this study. HD patients were recruited from Santa Teresinha Hospital, located in Erechim city, Rio Grande do Sul, Brazil. All of the HD patients underwent a HD session of 4 hours in duration using a high-flux polyethersulfone membrane (Diapes[®], Surelyzer PES 210DL, Nipro Corporation, Japan) with systemic anticoagulation with heparin, and a dialysis machine maintained at a blood flow rate adequate for optimal dialysis (≥ 300 mL/min). These patients underwent 12.1 ± 2.4 HD sessions per month for a period ranging from 0.7 to 9.2 years. Among HD patients, 22 (55%) were submitted to iron therapy (100 mg intravenous iron sucrose once monthly). Exclusion criteria for the study included malignant disease, infectious disease, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), alcohol abuse, liver disease, thalassemia, and sickle-cell diseases. All eligible subjects provided informed written consent, and the study was in adherence with the Declaration of Helsinki. This study was approved by the local Ethics Committee (number 16510213.1.0000.5346).

Laboratory assays

Blood samples were collected from HD patients 60 minutes before HD (pre-HD), and 60 minutes after the end of the HD (post-HD) session. In addition, blood samples were also collected from healthy subjects after an overnight fast. All blood samples were collected by a venous puncture technique into Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with EDTA, sodium fluoride plus EDTA, or with no anticoagulants. Specimens were centrifuged at $2500 \times g$ for 15 minutes. Plasma was used to measure the levels of fasting glucose and cell-free DNA in plasma. Serum was used to assess the levels of total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, creatinine, albumin, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), iron, ferritin, and transferrin.

Measurements of the glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, creatinine, albumin, ALT, AST, iron, ferritin, and transferrin were performed using standard methods on a Cobas MIRA[®] (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated analyzer. LDL cholesterol was calculated using the Friedewald equation [9]. Glomerular filtration rate (GFR) was estimated by the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation [10]. Circulating cell-free DNA in plasma was measured by PicoGreen assay (Quant-iT PicoGreen[®], Invitrogen, Oregon, USA) by use of a microplate reader (SpectraMax

M2e, Molecular Devices, Austria). The fluorescence was measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm.

Statistical analysis

Data are presented as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile ranges. Categorical data were summarized as percentages, and comparisons between groups were performed with the Chi-square test. Distribution of variables was tested by use of the Kolmogorov–Smirnov test. Statistical differences between groups were evaluated by Student’s *t* or Mann–Whitney tests. Wilcoxon signed rank test was used for comparing cell-free DNA in plasma pre- and post-HD. Spearman’s rank correlation was assessed to evaluate the correlations between serum cell-free DNA, GFR, and ferritin levels. Multiple regression analysis was employed to investigate whether some variables interfere with cell-free DNA concentrations in plasma. Statistical significance was assumed at $P < 0.05$. The data were analyzed using Statistica 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTS

Baseline characteristics of study participants are described in Table 1. HD patients had significantly lower GFR, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, serum albumin and transferrin than control subjects. In contrast, serum levels of iron and ferritin, were significantly higher in HD patients. We found that cell-free DNA in plasma was significantly increased in HD patients in comparison with healthy controls [23.1 (16.2–28.0) vs. 16.8 (13.4–19.7) pg/mL], as shown in Figure 1. We also checked whether a single HD session would be able to promote an increase in cell-free DNA in the plasma. For this, we collected blood samples 1 hour before and 1 hour after the HD session. However, no significant differences were observed between pre-HD cell-free DNA in the plasma [23.1 (16.2–27.3) pg/mL] and post-HD cell-free DNA in the plasma [24.7 (18.4–27.5) pg/mL] ($P = 0.439$). In addition, significant correlations were observed between cell-free DNA and GFR ($r_s = -0.342$, $P = 0.002$) and ferritin ($r_s = 0.253$, $P = 0.024$). Multiple regression analyses showed that the association between cell-free DNA and HD was dependent on GFR and ferritin levels, and independent of gender, diabetes, hypertension, total cholesterol, and triglycerides (Table 2).

Please add the Table 1 here

Please add the Figure 1 here

Please add the Table 2 here

DISCUSSION

The results of the present study indicate that DNA damage measured by PicoGreen, an ultra-sensitive assay for quantitating dsDNA, is increased in HD patients, and cell-free DNA is associated with iron stores and GFR. The simple DNA quantification using fluorescent dyes may prove advantages in the context of cost, time effectiveness, and procedure simplicity [11]. In addition, we showed that a single HD session was not able to promote a significant increase in cell-free DNA. In the present study, we also demonstrated that cell-free DNA levels in plasma were dependent on ferritin levels and GFR.

CKD is associated with many complications that result from excess amounts of ROS and/or decreased antioxidant activity. HD patients are exposed to oxidative stress and inflammation, and both processes are closely related to cellular injury [12]. In addition, there is an impairment of DNA damage repair and an increase in chromosome damage in HD patients, and these adverse events may be caused by the uremic state, as well as by chronic inflammation linked to increased formation of ROS [13]. In particular, DNA is an important molecule that is susceptible to attack by ROS [7]. In this context, Kohlova et al. [14] verified that HD patients presented high circulating cell-free DNA levels, when compared with the control group, and the cell-free DNA increased was correlated with the inflammatory grade. It was demonstrated that inflammation can play an important role on the DNA damage, and it has been suggested that pro-inflammatory cytokines, including IL-6, IL-13 and IL-15 are enrolled with immunomodulatory role of dsDNA [14] [15]. In addition, patients with CKD have increased DNA damage using the micronucleus assay [16]. Corroborating with these studies, we also showed that HD patients presented an increase in dsDNA in plasma, as measured by use of the PicoGreen assay. Indeed, the oxidative stress-mediated genomic damage is an important process in CKD [14] [15] and the iron metabolism may be involved with these DNA alterations. Interestingly, several adverse effects of CKD are mediated by iron-catalyzed ROS generation [17]. In combination with iron impact on DNA damage, other mechanisms may be associated. It is important to note that the hemodialysis process is another contributor of oxidative stress, and it has been associated with DNA damage [18] [19]. For this reason, in the present study we also evaluated whether a single HD session could promote an increase in cell-free DNA in plasma, but no significant differences were observed between pre- and post-HD cell-free DNA in the plasma.

Iron is a transitional metal that can catalyze the conversion of poorly reactive free radicals into highly active free radicals. It has been suggested that formation of hydroxyl

radicals catalyzed by iron may play a role in the development of CKD because the highly active radicals can attack cell membrane lipids, proteins, and DNA and cause tissue damage [20] [21] [22]. It's important to note that we observed an increase of iron levels and a decrease of transferrin levels in HD patients. These alterations in iron metabolism markers indicate that these patients may present an excess in free-iron levels in the circulation which could be extremely toxic to cells [23], and contribute directly to DNA damage.

Serum ferritin concentration is by far the most commonly used indicator of body iron stores. Several studies suggest a possible link between elevated levels of circulating ferritin and oxidative process verified in HD patients [20] [24]. Interestingly, we showed that HD patients present a significantly increase of levels of ferritin, and the DNA damage was correlated with the levels of this marker. Because the DNA damage was accompanied by increased serum ferritin levels, we suggest that the excess body iron stores could play an important role in the promotion of oxidative stress and inflammation process in the HD patients. Moreover, the GFR was another factor that may contribute directly to DNA damage [16]. In this context, we demonstrated a decrease of GFR in HD patients, and GFR was correlated with DNA damage. In agreement with our results, Sandoval et al. [16] showed that genetic damage, as measured by the frequency of micronuclei, increases when renal function decreases. Indeed, this progressive loss of kidney function in HD patients can cause genotoxic effects, not only through renal structural changes and tubulointerstitial injury, but also by oxidative stress.

In summary, we showed an increase in cell-free DNA, as measured by the PicoGreen assay, in HD patients. However, a single HD session was not able to promote an increase in cell-free DNA. We also reported that increased ferritin levels and reduced GFR were associated with higher circulating cell-free DNA. It is possible to speculate that the increase of iron stores, combined with declining kidney function may promote changes in the inflammatory process and oxidative stress, contributing to the appearance of circulating double-stranded DNA in plasma.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Rafael Ayub from Santa Teresinha Hospital for his important cooperation. This study was supported by scholarships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes, Brazil).

REFERENCES

1. Nahas MA, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 2005;365:331–40.
2. Canaud B, Cristol JP, Morena M, et al. Imbalance of oxidants and antioxidants in hemodialysis patients. *Blood Purif* 1999;17: 99–106.
3. Ward R, McLeish KR. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:1697–1702.
4. Descamps-Latscha B, Drueke T, Witko-Sarsat V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial* 2001;14:193–9.
5. Witko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, et al. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int* 2003;64:82–91.
6. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res* 2003;53:81–92.
7. Lin YS, Hung SC, Wei YH, Tarng D. GST M1 polymorphism associates with DNA oxidative damage and mortality among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:405–15.
8. Maruyama Y, Nakayama M, Yoshimura K, et al. Effect of repeated intravenous iron administration in haemodialysis patients on serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1407–12.
9. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
10. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604–12.
11. Szpechcinski A, Struniawska R, Zaleska J, et al. Evaluation of fluorescence-based methods for total vs. amplifiable DNA quantification in plasma of lung cancer patients. *J Physiol Pharmacol* 2008;59:675–81.
12. Garneata L. Intravenous iron, inflammation and oxidative stress: is iron a friend or an enemy of uremic patients? *J Ren Nutr* 2008;18:40–5.
13. Rangel-López A, Paniagua-Medina ME, Urbán-Reyes M, et al. Genetic damage in patients with chronic kidney disease, peritoneal dialysis and haemodialysis: a comparative study. *Mutagenesis* 2013;28:219–25.

14. Kohlova M, Ribeiro S, Sameiro-Faria M, et al. Circulating cell-free DNA levels in hemodialysis patients and its association with inflammation, iron metabolism, and rhEPO doses. *Hemodial Int* 2013;17:664–70.
15. Korabecna M, Pazourkova E, Horinek A, et al. Methylation status of immune response genes promoters in cell-free DNA differs in hemodialyzed patients with diabetic nephropathy according to the intensity of anemia therapy. *Blood Purif* 2013; 36:280–86.
16. Sandoval SB, Stoyanova E, Coll E, et al. Genetic damage in chronic renal failure patients is associated with the glomerular filtration rate index. *Mutagenesis* 2010;25:603-8.
17. Chih-Chien S, Yu-Chuan H, Chun-Chi C, et al. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:301892.
18. Korabecna M, Opatrna S, Wirth J, et al. Cell-free plasma DNA during peritoneal dialysis and hemodialysis and in patients with chronic kidney disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:296–301.
19. Opatrna S, Wirth J, Korabecna M, et al. Cell-free plasma DNA during Hemodialysis. *Ren Fail* 2009;31:475–80.
20. Vaziri ND. Understanding iron: promoting its safe use in patients with chronic kidney failure treated by hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2013;61:992–1000.
21. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999;341:1986-95.
22. Beard JL. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr* 2001;131:568–80.
23. Baker HM, Anderson BF, Baker EN. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:3579–83.
24. Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 1998;35:35–54.

Table 1. Baseline characteristics and biochemical parameters of the study population.

	Control	HD patients	<i>P</i>-value
Age (years)	58.1 ± 14.0	56.7 ± 12.7	0.707
BMI (kg/m ²)	25.2 ± 2.1	24.7 ± 4.0	0.541
Male (%)	65.0	37.5	0.014
Diabetes (%)	2.5	37.5	<0.001
Hypertension (%)	20.0	80.0	<0.001
Smokers (%)	15.0	10.0	0.499
GFR (mL/min/1.73m ²)	83.8 ± 17.4	6.7 ± 3.2	<0.001
Glucose (mg/dL)	91.2 ± 9.5	106.2 ± 62.0	0.144
Total cholesterol (mg/dL)	193.6 ± 43.4	153.8 ± 37.9	<0.001
LDL cholesterol (mg/dL)	118.3 ± 37.6	80.3 ± 32.7	<0.001
HDL cholesterol (mg/dL)	49.2 ± 10.2	43.2 ± 12.2	0.019
Triglycerides (mg/dL)	134.6 ± 54.6	151.4 ± 68.4	0.229
ALT (U/L)	21.2 ± 7.7	19.0 ± 12.2	0.331
AST (U/L)	19.6 ± 5.0	17.2 ± 10.4	0.197
Albumin (g/dL)	4.25 ± 0.47	4.05 ± 0.39	0.043
Iron (µg/dL)	76.2 ± 37.6	97.1 ± 52.7	0.045
Ferritin (ng/mL)	205 (139–352)	1248 (892–1598)	<0.001
Transferrin (mg/dL)	237.3 ± 51.4	170.3 ± 40.5	<0.001

Data are expressed as percentages, mean and SD or median and interquartile ranges.

Table 2. Multiple regression analysis of cell-free DNA in plasma as a dependent variable adjusting for GFR, gender, diabetes, hypertension, total cholesterol, triglycerides, and ferritin.

	<i>b</i>	<i>SE_b</i>	<i>t</i>	<i>P</i> -value
Kidney function				
GFR (mL/min/1,73m ²)	-0.135	0.049	-2.767	0.007
Characteristics of the patients				
Male (%)	7.290	4.144	1.759	0.082
Diabetes (%)	-2.642	5.757	0.459	0.647
Hypertension (%)	6.430	4.536	1.418	0.160
Lipids				
Total cholesterol (mg/dL)	-0.008	0.044	-0.185	0.853
Triglycerides (mg/dL)	0.058	0.034	1.699	0.093
Iron status				
Ferritin (ng/mL)	0.006	0.003	2.215	0.029

Regression coefficients (*b*), standard error of *b* (*SE_b*), and *t* statistic with corresponding *P*-value.

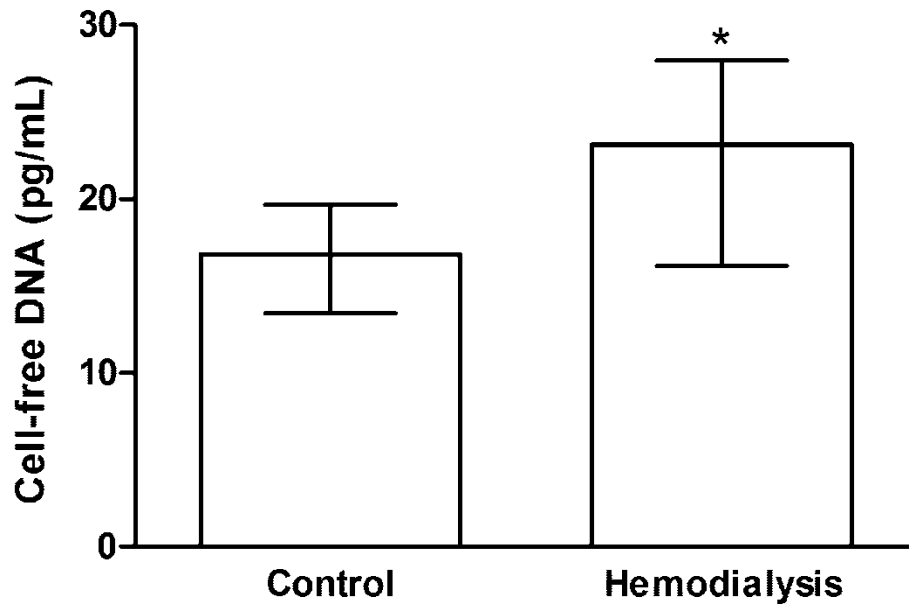


Figure 1. Circulating cell-free DNA in plasma of HD patients and health controls. Data are presented as median and interquartile range. *P = 0.0017.

4.2 MANUSCRITO I

Impact of intravenous iron administration on DNA damage and oxidative stress status in chronic kidney disease patients undergoing hemodialysis

Luiz Carlos Cichota, Guilherme Vargas Bochi, Etiane Tatsch, Vanessa Dorneles Torbitz, Paulo Roberto Dall Agnol, Jean Carlos Zanardo, Fernanda Barbisan, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Rodrigo de Almeida Vaucher, Rafael Noal Moresco

A ser submetido para publicação.

Impact of intravenous iron administration on DNA damage and oxidative stress status in chronic kidney disease patients undergoing hemodialysis

Luiz Carlos Cichota^{1,2}, Guilherme Vargas Bochi¹, Etiane Tatsch¹, Vanessa Dorneles Torbitz¹, Paulo Roberto Dall Agnol³, Jean Carlos Zanardo³, Fernanda Barbisan⁴, Ivana Beatrice Manica da Cruz⁴, Rodrigo de Almeida Vaucher⁵, Rafael Noal Moresco^{1,*}

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

²School of Pharmacy, Integrated Regional University of the Alto Uruguai and Missoes, Erechim, Brazil

³Hemodialysis Unit, Santa Teresinha Hospital, Erechim, Brazil

⁴Biogenomic Laboratory, Department of Morphology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

⁵Research Laboratory of Clinical Microbiology, Franciscan University Center, Santa Maria, Brazil

*Corresponding Author: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

Email: rnmoresco@ufsm.br

Declaration of Interest: There are no conflicts of interest to declare.

Running title: Impact of iron administration on DNA damage in CKD

SUMMARY

Background: Intravenous iron (IVIR) is widely used as a component of anemia management in chronic kidney disease (CKD) patients undergoing hemodialysis (HD). However, iron is toxic since it contributes to the generation of free radicals and oxidative processes. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of IVIR on oxidative stress and DNA damage through the quantifications of cell-free DNA using PicoGreen® assay.

Methods: Measurements of the circulating cell-free DNA in plasma, as well as serum total antioxidant capacity (TAC), total oxidant status (TOS), ischemia-modified albumin (IMA), iron, ferritin, transferrin and other additional biochemical parameters were performed in chronic HD patients submitted to IVIR therapy or not treated with IVIR.

Results: The levels of cell-free circulating DNA in the plasma of HD patients submitted to IVIR therapy were significantly higher compared to HD patients not treated with IVIR (35.5 ± 29.7 pg/mL vs. 19.9 ± 7.8 pg/mL). Serum IMA levels were higher in HD patients submitted to IVIR therapy than patients not treated with IVIR [0.55 (0.47-0.62) ABSU vs. 0.46 (0.39-0.52) ABSU]. Additionally, patients submitted to IVIR therapy had lower TAC levels compared to patients not treated with IVIR (1.15 ± 0.52 mmol Trolox Equiv/L vs. 1.55 ± 0.35 mmol Trolox Equiv/L).

Conclusions: IVIR treatment in CKD patients undergoing HD promotes an increase in cell-free DNA in plasma, as well as an oxidative imbalance.

Keywords: Chronic kidney disease, DNA damage, hemodialysis, intravenous iron.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is a highly prevalent disease, with increasing numbers of patients affected worldwide [1] and maintenance hemodialysis (HD) therapy is inevitable in these patients [2]. The anemia is another common condition in advanced renal disease which contributes to a higher morbimortality in HD patients [3]. Therefore, intravenous iron (IVIR) is widely used as an integral component of anemia management in HD patients [4-7]. However, iron is an element with paradoxical effects. It is required for catalytic enzymes, proteins involved in DNA synthesis and for the transport of oxygen in hemoglobin and myoglobin [8]. On the other hand, iron is toxic since it contributes to the generation of free radicals and oxidative processes [9], as well as DNA damage [10].

Although there are studies that show increased oxidative stress and DNA damage in HD patients receiving IVIR, the results are occasionally contradictories and are usually seen in an isolated manner [11]. Additionally, the detection of DNA damage requires the use of sensitive techniques. Thus, the quantification of DNA by use of fluorescent dyes that selectively binds cell-free DNA, as PicoGreen[®] assay, may prove an advantageous alternative in the context of cost and time effectiveness and procedure simplicity [12]. This technique is used for the quantification of DNA released into the middle due to cell apoptosis and to genotoxicity [13]. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of IVIR on oxidative stress biomarkers, as well as investigate the DNA damage induced by IVIR through the quantifications of cell-free DNA using PicoGreen[®] assay.

MATERIAL AND METHODS

Study population

A total of 40 chronic HD patients recruited from Santa Teresinha Hospital (Erechim, Rio Grande do Sul, Brazil) was included in this study. These patients underwent approximately 12 HD sessions per month for a period ranging from 0.7 to 9.2 years. Patients were stratified into two groups: patients not treated with IVIR (n=18) and patients submitted to IVIR therapy (100 mg IVIR sucrose once monthly, n=22). Exclusion criteria for this study included malignant disease, infectious disease, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), alcohol abuse, liver disease, thalassemia, and sickle cell disease. All eligible subjects provided informed written consent, and the study was carried out in adherence to the Declaration of Helsinki. This study was approved by the local Ethics Committee (number 16510213.1.0000.5346).

Biochemical assays

Blood samples were collected from HD patients 60 minutes before the HD session. All blood samples were collected by a venous puncture technique into Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with EDTA, sodium fluoride plus EDTA, or with no anticoagulants. Specimens were centrifuged at 2500 x g for 15 minutes. Blood samples collected with sodium fluoride plus EDTA were used for measurement of fasting glucose. Plasma EDTA was used to assess hemoglobin levels. Plasma EDTA was also used for quantification of cell-free DNA. Serum was used to evaluate the levels of total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, creatinine, albumin, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), iron, ferritin, and transferrin. The levels hemoglobin was performed by a standard method in automated micro ABX 60[®] (Horiba Diagnostics, California, USA). Measurements of the glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, creatinine, albumin, ALT, AST, iron, ferritin, and transferrin were performed using standard methods on Cobas MIRA[®] (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated analyzer. The LDL cholesterol was calculated using the Friedewald equation [14]. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated by the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation [15].

DNA damage assay

The PicoGreen[®] test measured the DNA damage. The Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA reagent (Invitrogen[®]) is a fluorescent reagent ultra-sensitive for quantitating double-stranded DNA in solution. This measurement was performed by use of the SpectraMax[®] M2e microplate reader (Molecular Devices, Austria) and the fluorescence was measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm [16].

Oxidative stress biomarkers

Serum IMA was measured by use of a method based on the capacity of albumin binds cobalt as previously described [17]. IMA results were expressed in absorbance units (ABSU). The total antioxidant capacity (TAC) [18] was assessed by an automated method using the colored 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation (ABTS(*+)) [18]. The assay was calibrated with Trolox, and the results were expressed in pmol/L (mmol Trolox Equiv/L). The total oxidant status (TOS) was measured by an assay based on the oxidation of ferrous ion to ferric ion in the presence of various oxidant species [19]. The test was calibrated with hydrogen peroxide, and the results were expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L.

Serum levels of IMA, TAC and TOS were measured on Cobas MIRA[®] (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated analyzer.

Statistical analysis

Distribution of variables was assessed by use of Kolmogorov-Smirnov test. Categorical variables were summarized as percentages, and comparisons between groups were performed with Chi-square test. Statistical differences between groups were evaluated by Student's t-test or Mann-Whitney test. Data were expressed as percentages, mean and standard deviations (SD) or median and interquartile ranges (IQR). Statistical significance was assumed at $P < 0.05$. Data were analyzed using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Demographic and clinical characteristics of the study population are presented in Table 1. There were no significant differences for eGFR, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, serum albumin, transferrin, glucose, triglycerides, ALT, AST, hemoglobin, transferrin, iron, and ferritin among HD patients that receive IVIR and those who do not receive IVIR.

The levels of cell-free circulating DNA in the plasma of HD patients submitted to IVIR therapy were significantly higher compared to HD patients not treated with IVIR (35.5 ± 29.7 pg/mL vs. 19.9 ± 7.8 pg/mL, respectively), as shown in Figure 1A. Serum IMA levels were higher in HD patients submitted to IVIR therapy than patients not treated with IVIR [0.55 (0.47-0.62) ABSU vs. 0.46 (0.39-0.52) ABSU, respectively) (Figure 1B). Additionally, patients submitted to IVIR therapy had lower TAC levels compared to patients not treated with IVIR (1.15 ± 0.52 mmol Trolox Equiv/L vs. 1.55 ± 0.35 mmol Trolox Equiv/L, respectively), as shown in Figure 1C. There was no statistical difference for serum TOS between the groups (Figure 1D).

Please add Table 1 here.

Please add Figure 1 here.

DISCUSSION

This study indicated that DNA damage was increased in HD patients on IVIR therapy, and the PicoGreen[®] ultra-sensitive assay was able to quantify cell-free DNA in plasma from HD patients. Additionally, it was observed a decrease of antioxidant capacity and an increase of oxidative markers as IMA in patients on IVIR therapy. The DNA damage and the oxidative stress have been associated with CKD and IVIR treatment [20]. The administration of IVIR to supplement erythropoiesis-stimulating agents has become a frequent practice in the controlling of anemia in patients with ESRD [20]. However, there is no consensus about the maximum safe dosage for intravenous iron therapy [11] since the excess of iron may contribute to the oxidants production [21].

The biological importance of iron is attributed to its chemical properties as the transition metal in oxidation-reduction reactions between the ferrous (Fe^{2+}) and ferric (Fe^{3+}) states [22]. Although this property facilitates many biochemical and biological functions, the catalytically active free iron can cause oxidative stress, tissue injury and cell dysfunction [23]. Additionally, iron participates in the Fenton's reaction and leads to the formation of hydroxyl radicals and other organic radicals that may cause DNA damage [24,25].

Recently, our team has shown an increase of cell-free DNA in HD patients, as well as associations between DNA damage, ferritin levels, and eGFR [12]. Here, we demonstrated that cell-free DNA measured by PicoGreen[®] was increased in HD patients on IVIR therapy. Therefore, IVIR treatment may play a deleterious role in the cell, which was associated with the rise of cell-free DNA in plasma of HD patients. Maruyama et al. [11] reported that repeated IVIR administration in HD patients was related to increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), an indicator of oxidative DNA injury.

The decrease in TAC levels associated with increased IMA and TOS observed in HD patients submitted to IVIR therapy indicate that IVIR may contribute to the oxidative imbalance and the generation of cell-free DNA in HD patients. Iron therapy triggers the acceleration of ROS production and leads to increased serum biomarkers of oxidative stress [26]. The intravenous administration of high iron dosages may result in the generation of bioactive iron (non-transferrin binding iron) and consequently increase oxidative stress process [25]. Finally, the modification in the redox state of HD patients receiving IVIR may be a fact of clinical interest since the oxidative burst could play an essential role in the increase of mortality and morbidity [11].

In summary, we showed an increase in cell-free DNA, as well as an oxidative imbalance, in HD patients on IVIR treatment. It is plausible to speculate that IVIR may lead to an excess

of free iron, which contributes to the oxidative imbalance and the appearance of cell-free DNA in plasma of HD patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Rafael Ayub from Santa Teresinha Hospital for his valuable cooperation, and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil) for providing scholarships.

REFERENCES

- [1] Coresh J, Turin TC, Matsushita K, et al. Decline in estimated glomerular filtration rate and subsequent risk of end-stage renal disease and mortality. *JAMA* 2014;311:2518-31.
- [2] Nordio M, Limido A, Maggiore U, et al. Survival in patients treated by long-term dialysis compared with the general population. *Am J Kidney Dis* 2012;59:819-28.
- [3] Eckardt KU. Anaemia in end-stage renal disease: pathophysiological considerations. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:2-8.
- [4] Almeida SG, Veiga JPR, Arruda SF, et al. The association of markers of oxidative-inflammatory status with malnutrition in hemodialysis patients with serum ferritin lower than 500 ng/mL. *J Bras Nefrol* 2013;35:6-12.
- [5] Vaziri ND. Understanding iron: promoting its safe use in patients with chronic kidney failure treated by hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2013;61:992-1000.
- [6] Deger SM, Erten Y, Pasaoglu OT, et al. The effects of iron on FGF23-mediated Ca-P metabolism in CKD patients. *Clin Exp Nephrol* 2013;17:416-23.
- [7] Macdougall IC, Strauss WE, McLaughlin J, et al. A randomized comparison of ferumoxytol and iron sucrose for treating iron deficiency anemia in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:705-12.
- [8] Atamaniuk J, Kopecky C, Skoupy S, et al. Apoptotic cell-free DNA promotes inflammation in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:902-5.
- [9] Kovesdy CP. Iron and clinical outcomes in dialysis and non-dialysis-dependent chronic kidney disease patients. *Adv Chronic Kidney Dis* 2009;16:109-16.
- [10] Malyszko J, Zorawska EK, Levin-Iaina N, et al. New parameters in iron metabolism and functional iron deficiency in patients on maintenance hemodialysis. *Pol Arch Med Wewn* 2012;122:537-42.

- [11] Maruyama Y, Nakayama M, Yoshimura K, et al. Effect of repeated intravenous iron administration in haemodialysis patients on serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1407-12.
- [12] Cichota LC, Bochi GV, Tatsch E, et al. Circulating double-stranded DNA in plasma of hemodialysis patients and its association with iron stores. *Clin Lab* 2015;61:985-90.
- [13] Szpechcinski A, Struniawska R, Zaleska J, et al. Evaluation of fluorescence-based methods for total vs. amplifiable DNA quantification in plasma of lung cancer patients. *J Physiol Pharmacol* 2008;59:675-81.
- [14] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
- [15] Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
- [16] Ha TT, Huy NT, Murao LA, et al. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. *PLoS One* 2011;6:e25969.
- [17] Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JA, et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2010;43:450-54.
- [18] Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37:277-85.
- [19] Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103-11.
- [20] Buren PV, Velz RL, Vaziri ND, et al. Iron overdose: a contributor to adverse outcomes in randomized trials of anemia correction in CKD. *Int Urol Nephrol* 2012;44: 499-507.
- [21] Armaly Z, Qader AE, Jabbour A, et al. Effects of carnitine on oxidative stress response to intravenous iron administration to patients with CKD: impact of haptoglobin phenotype. *BMC Nephrol* 2015;16:135.
- [22] Ganz T. Molecular control of iron transport. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:394-400.
- [23] Hukic F, Nuhbegovic S, Brkic S, et al. Biochemical markers of iron status in hemodialysis patients. *Med Arh* 2010;64:219-22.
- [24] Godstein S, Meyerstein D, Czapski G. The Fenton reagentes. *Free Radic Biol Med* 1993;15:443-5.

[25] Kuo K, Hung S, Wei Y, et al. Intravenous iron exacerbates oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1817-26.

[26] Swarnalatha G, Ram R, Neela P, et al. Oxidative stress in hemodialysis patients receiving intravenous iron therapy and the role of N-acetylcysteine in preventing oxidative stress. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2010;21:852-8.

Table 1. Baseline characteristics and biochemical parameters of the study population.

	Without IVIR	With IVIR	P-value
Age (years)	52 ± 12	61 ± 12	0.032
BMI (kg/m ²)	24.3 ± 4.2	25.1 ± 3.9	0.526
Gender male (%)	61.1	68.1	0.640
Diabetes (%)	33.3	40.9	0.622
Hypertension (%)	77.7	81.8	0.750
Smokers (%)	5.5	13.6	0.396
eGFR (mL/min/1.73m ²)	5.5 (4.0-6.5)	6.0 (5.0-8.2)	0.253
Glucose (mg/dL)	85 (76-91)	92 (76-131)	0.348
Total cholesterol (mg/dL)	154 ± 33	154 ± 42	0.976
LDL cholesterol (mg/dL)	81 ± 25	80 ± 38	0.723
HDL cholesterol (mg/dL)	43 ± 11	43 ± 14	0.964
Triglycerides (mg/dL)	149 ± 70	153 ± 69	0.827
ALT (U/L)	15 (11-24)	17 (12-28)	0.447
AST (U/L)	13 (11-21)	13 (11-23)	0.989
Albumin (g/dL)	4.1 ± 0.4	4.0 ± 0.4	0.467
Hemoglobin (g/dL)	12.1 ± 1.4	11.5 ± 1.2	0.138
Iron (µg/dL)	115 ± 61	82 ± 41	0.051
Ferritin (ng/mL)	1487 ± 748	1125 ± 674	0.115
Transferrin (mg/dL)	167 ± 42	173 ± 41	0.609

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; IVIR, intravenous iron. Data are expressed as percentages, mean and SD or median and interquartile ranges.

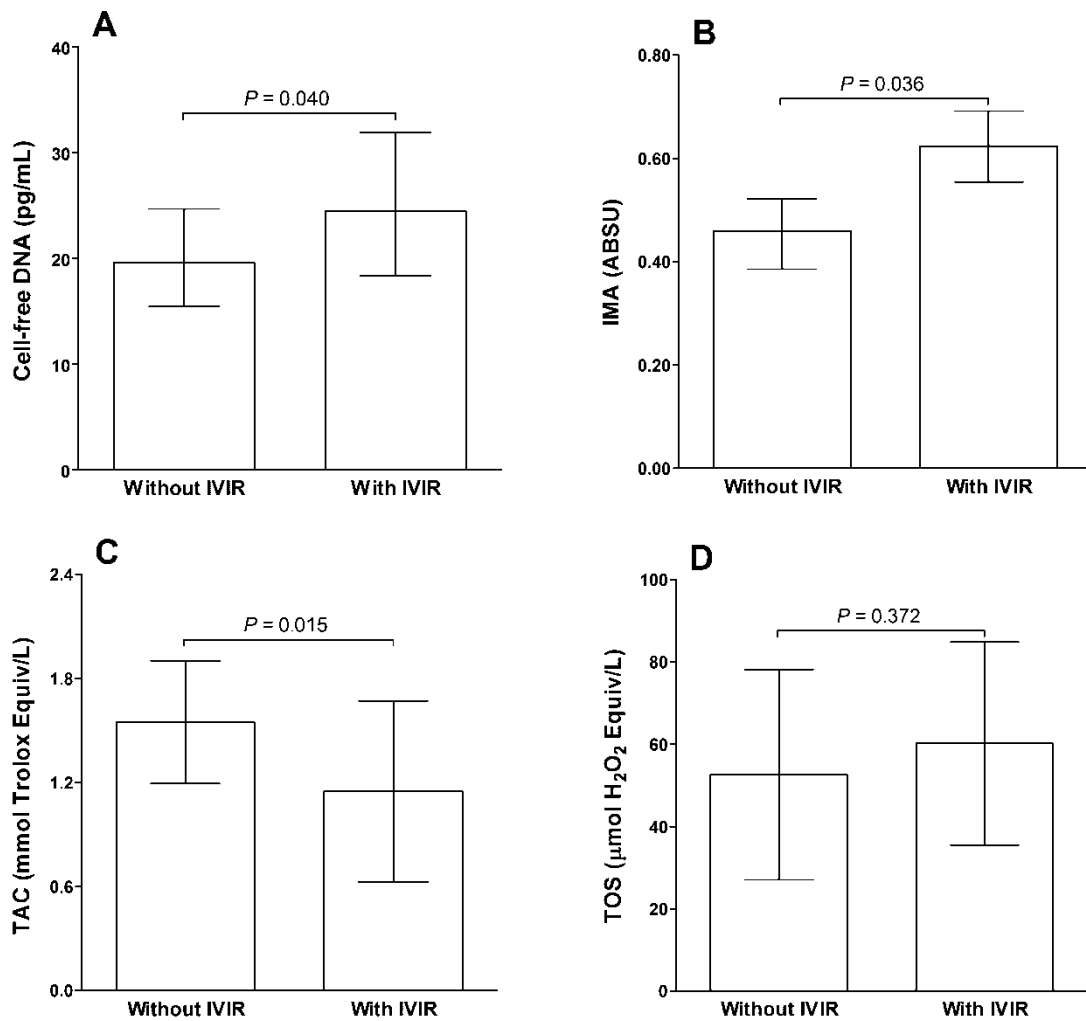


Figure 1. (A) Circulating cell-free DNA in plasma, (B) serum ischemia-modified albumin (IMA), (C) serum total antioxidant capacity (TAC) and (D) serum total oxidant status (TOS) of hemodialysis patients not treated with IVIR or submitted to IVIR therapy. Data are expressed as mean and standard deviation or median and interquartile ranges.

5 DISCUSSÃO

Pacientes com DRC apresentam perda progressiva e irreversível das funções renais tubulares, glomerulares e endócrinas, resultando na incapacidade renal em remover os produtos de degradação metabólica do organismo ou de realizar as funções reguladoras (ATAMANIUK et al., 2012). Diversos mecanismos fisiopatológicos estão envolvidos nesta perda da função renal, como o estresse oxidativo e o desequilíbrio na homeostase do ferro (TANAKA, 2015). Além disso, pacientes com DRC são frequentemente submetidos a sessões de HD e terapia com ferro intravenoso, e ambos os tratamentos podem aumentar ainda mais a geração de espécies reativas, potencializando o processo oxidativo (ALBARELLO et al., 2012). Uma importante consequência deste aumento é que podem atingir regiões celulares menos expostas, culminando com o dano ao DNA. Entretanto, em seu mecanismo complexo o DNA pode compensar alguns danos e retornar ao seu estado normal. Porém quando o estímulo nocivo deste processo oxidativo ultrapassa o limiar de lesão irreversível, ocorre então a morte celular que, por sua vez, pode acontecer por necrose ou apoptose (ROBBINS e COTRAN, 2005). Durante o processo de morte celular, há a liberação de DNA. Este DNA livre pode ser observado no plasma de pacientes com DRC submetidos a HD. O nível elevado de DNA livre na circulação pode estar associado à gravidade da DRC e, por esse motivo, a mensuração de DNA livre tem sido estudada como um possível biomarcador de dano irreversível no DNA capaz de auxiliar na previsão de prognóstico em diversas doenças (HA et al., 2011).

Assim, torna-se relevante a mensuração do dano ao DNA por meio de métodos sensíveis, como o Picogreen[®] (GEORGIU et al., 2009). Esta técnica de análise de fragmentação do DNA começou a ser utilizada em diversas situações clínicas, pois apresenta uma elevada sensibilidade, podendo detectar quantidades de até 25 pg/mL de DNA livre no plasma (SZPEHCINSKI et al., 2008), sendo que a sua utilização pode ser uma alternativa vantajosa no contexto de custo, eficácia e tempo do processo (KRUSZEWSKI et al., 2012). Por isso, o Artigo 1 se propôs a investigar o impacto da sessão de HD sobre o dano ao DNA, por meio da mensuração dos níveis de DNA livre no plasma, e relacionar esse dano com marcadores do metabolismo do ferro e função renal. Para o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que avaliou os níveis de DNA livre no plasma por meio do ensaio Picogreen[®] em pacientes com DRC.

Neste estudo foi demonstrado que pacientes com DRC submetidos à HD apresentaram maior dano ao DNA comparados aos indivíduos saudáveis. De fato, muitas complicações

destes pacientes com DRC resultam da quantidade excessiva da geração de EROs, o que pode estar intimamente relacionado com a lesão no material genético (GARNEATA, 2008; KOHLOVA et al., 2013). Uma possível hipótese para este aumento do dano ao DNA em pacientes com DRC seria um desequilíbrio na homeostase do ferro, que, através da reação de Fenton, pode expor o organismo aos efeitos deletérios pró-oxidativos (GODSTEIN et al., 1993; KUO et al., 2008).

A anemia é uma importante complicação comumente observada em pacientes com patologias renais (DRAIBE e CENDEROGLO, 2004; BUREN et al., 2012) e, por este motivo, a administração de ferro intravenoso é recomendada pelo *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI, 2006). No presente estudo foi demonstrado um aumento dos níveis de ferro circulante e ferritina e uma diminuição nos níveis de transferrina em pacientes com DRC submetidos à HD. Além disso, foi demonstrada uma associação positiva entre o dano ao DNA e os níveis séricos de ferritina nesses pacientes. Sendo assim, essas alterações e o desequilíbrio nos marcadores do metabolismo do ferro podem ser extremamente tóxicos, contribuindo diretamente para o dano ao DNA (BAKER et al., 2003).

O principal marcador fisiológico da DRC é a TFG, a qual estima a perda da função renal, associada à perda das funções regulatórias, excretórias e endócrinas dos rins (BELLO et al., 2005). Foi observado no presente trabalho a associação positiva entre o dano no DNA e o decréscimo da TFG nos pacientes submetidos à HD. Neste contexto, essa perda progressiva da função renal em pacientes submetidos a HD pode causar efeitos genotóxicos, não somente através de modificações estruturais renais, mas também pelo estresse oxidativo (SCHENA, 2000). Outros fatores contribuem para o dano ao DNA na DRC, como o estado inflamatório crônico, no qual ocorre um aumento das citocinas pró-inflamatórias, acidose, infecções recorrentes, entre outros. O processo inflamatório correlaciona-se diretamente com a TFG, sendo que fatores como impurezas no líquido de diálise, qualidade microbiológica do dialisado e fatores biocompatíveis no circuito da diálise desempenham um papel adicional neste decréscimo da TFG (PERES et al., 2010).

A HD é a terapia alternativa mais utilizada para pacientes com DRC, podendo proporcionar um aumento na sobrevivência dos mesmos (ALBARELLO et al., 2012). Entretanto, essa terapia é responsável pela formação de grande quantidade de EROs, bem como a perda de antioxidantes hidrossolúveis e anormalidades no metabolismo dos lipídios. Estes processos contribuem diretamente para o aumento do estresse oxidativo nestes pacientes, somados a outros fatores, como o estado urêmico que resulta no acúmulo de toxinas, a interação do sangue com membranas bioincompatíveis que podem desencadear a ativação de neutrófilos

polimorfonucleares e, assim, a consequente geração de espécies reativas (OPATRINA et al., 2009; VARAN et al., 2010; RUSKOVSKA et al., 2014). Entretanto, nossos resultados demonstraram que uma única sessão de HD não foi capaz de promover o aumento do DNA livre no plasma. Aliado a isso, recente estudo demonstrou que os níveis de dano ao DNA são diretamente associados à capacidade de reparação de cada paciente e não do tempo de HD (STOYANOVA et al., 2014). Já Bagatini et al. (2008) demonstraram que pacientes diabéticos tipo 2 submetidos à HD obtiveram aumento nos níveis de dano ao DNA logo após a sessão de HD, porém, 48 horas após foi observada uma significativa diminuição neste dano. Além disso, outro trabalho demonstrou que pacientes com DRC, que realizavam diálises diárias, apresentaram um grau significativamente menor de dano ao DNA, sugerindo que a remoção diária de toxinas poderia ocasionar uma melhora do estado urêmico, resultando na diminuição do dano nesta macromolécula (SCHUPP et al., 2006).

Estudos controversos apresentados na literatura, possivelmente, devem-se a utilização de ensaios qualitativos ou semiquantitativos como o ensaio cometa, 8-OHdG, entre outros, que medem danos reversíveis e irreversíveis no DNA (SANDOVAL et al.; 2010). Já o ensaio Picogreen[®] pode ser considerado um método quantitativo, mensurando somente danos irreversíveis no DNA (GEORGIOU et al., 2009). Portanto, de acordo com os resultados obtidos no Artigo 1, foi possível verificar, por meio da mensuração dos níveis de DNA livre no plasma, que os pacientes com DRC submetidos a HD apresentaram aumento do dano ao DNA. Esse dano no material genético foi associado a um aumento das reservas de ferro e a uma diminuição da taxa de filtração glomerular.

No Manuscrito I foi investigada a hipótese de que a terapia com ferro intravenoso pode ser um outro fator importante envolvido no dano do DNA em pacientes com DRC. Neste estudo, avaliamos o dano ao DNA em pacientes com DRC que fazem uso da terapia com o ferro intravenoso e pacientes com DRC que não foram submetidos a essa terapia. Foi demonstrado que os pacientes submetidos à terapia com ferro intravenoso apresentaram um aumento dos níveis de DNA livre no plasma. A importância biológica do ferro é atribuída às suas propriedades químicas como metal de transição em reações de oxirredução (BAKER et al., 2003; GANZ, 2007; ALMEIDA et al., 2013). Embora esta propriedade facilite muitas funções bioquímicas, o ferro livre pode causar estresse oxidativo, lesão tecidual e disfunção das células (HUKIC et al., 2010). Neste contexto, foi descrito que repetidas administrações de ferro intravenoso em pacientes submetidos a HD aumentaram o dano oxidativo ao DNA (MARUYAMA et al., 2007).

Também observamos neste estudo uma diminuição dos níveis séricos de TAC e um aumento dos níveis séricos de IMA e TOS nos pacientes com DRC submetidos à HD que utilizavam a terapia com ferro intravenoso, quando comparados com os pacientes submetidos à HD que não faziam uso da referida terapia. Estes achados sugerem que o desequilíbrio oxidativo pode contribuir para a geração de DNA livre no plasma. Além disso, a terapia com ferro provoca a aceleração da produção de EROs, que leva a um aumento do estresse oxidativo (SWARNALATHA et al., 2010). Assim, a administração de doses elevadas de ferro pode resultar na geração de ferro bioativo (ferro livre) (HUKIC et al., 2010) e, conseqüentemente, aumento na formação de radicais livres, gerando radical OH^{\bullet} (ZARITSKY et al., 2009; VARAN et al., 2010). Esse radical é extremamente reativo, podendo reagir rapidamente com alvos celulares mais próximos, lesando o DNA, proteínas e lipídeos (KUO et al., 2008; ZARITSKY et al., 2009; ARMALY et al., 2015). Dessa forma, os resultados obtidos no Manuscrito I demonstraram que a terapia de ferro intravenoso expõe os pacientes com DRC a um desequilíbrio oxidativo, induzindo um aumento do dano ao DNA.

6 CONCLUSÕES

- Os pacientes com doença renal crônica submetidos à hemodiálise apresentaram maiores níveis de DNA livre plasmático, indicando um maior dano ao DNA;
- Foi verificado que uma única sessão de hemodiálise não foi capaz de promover dano significativo ao DNA nos pacientes com doença renal crônica;
- Foi demonstrada uma associação entre os níveis plasmáticos de DNA livre com o marcador de estoque de ferro ferritina;
- Foi verificada uma associação entre os níveis plasmáticos de DNA livre com a taxa de filtração glomerular;
- Os pacientes com doença renal crônica submetidos à hemodiálise que faziam uso da terapia com ferro intravenoso apresentaram maior dano de DNA;
- Os pacientes com doença renal crônica submetidos à hemodiálise que faziam uso da terapia com ferro intravenoso apresentaram um desequilíbrio oxidativo, demonstrado pelo aumento dos níveis séricos de oxidantes como a IMA, e diminuição dos níveis séricos de antioxidantes como o TAC;
- Em suma, os pacientes com doença renal crônica submetidos à hemodiálise e que fazem uso da terapia com ferro intravenoso apresentaram um maior dano ao DNA, associado com alterações relacionadas ao metabolismo do ferro, função renal e estresse oxidativo. Desta maneira, este estudo coopera para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que estão envolvidos na doença renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABENSUR, H. Deficiência de ferro na doença renal crônica. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, p. 84-88, 2010.
- ADA, American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2016. **Diabetes Care**, v. 39, p. S11-S112, 2016.
- AGUIAR, A. et al. Mecanismos e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Quim Nova**, v. 30, p. 623-628, 2007.
- AHN, S.J.; COSTA, J.; EMANUEL, J.R. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 24, p. 2623-2625, 1996.
- AKCHURIN, O.M.; KASKEL, F. Update on inflammation in chronic kidney disease. **Blood Purif**, v. 39, p. 84-92, 2015.
- ALBARELLO, K. et al. Ischemia modified albumin and carbonyl protein as potential biomarkers of protein oxidation in hemodialysis. **Clin Biochem**, v. 45, p. 450-454, 2012.
- ALLEN, B.W.; DEMCHENKO, I.T.; PIANTADOSI, C.A. Two faces of nitric oxide: implications for cellular mechanisms of oxygen toxicity. **J Appl Physiol**, v. 106, p. 662-667, 2009.
- ALMEIDA, S.G. et al. The association of markers of oxidative-inflammatory status with malnutrition in hemodialysis patients with serum ferritin lower than 500 ng/mL. **J Bras Nefrol**, v. 35, p. 6-12, 2013.
- AN, S.H.; LEE, M.S.; KANG, J.H. Oxidative modification of ferritin induced by methylglyoxal. **BMB Rep**, v. 45, p. 147-152, 2012.
- ANDRIKOS, E. et al. Effect of daily hemodialysis on monocytes apoptosis. **Blood Purif**, v. 23, p. 79-82, 2005.
- APPLE, F.S. et al. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. **Clin Chem**, v. 51, p. 810-824, 2005.
- ARMALY, Z. et al. Effects of carnitine on oxidative stress response to intravenous iron administration to patients with CKD: impact of haptoglobin phenotype. **BMC Nephrol**, v. 13, p. 135, 2015.
- ASLAN, M. et al. Relationship between total oxidant status and severity of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 17, p. 734-740, 2007.
- ATAMANIUK, J. et al. Apoptotic cell-free DNA promotes inflammation in haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, p. 902-905, 2012.

BAGATINI, P.B. et al. Induction and removal of DNA damage in blood leukocytes of patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. **Mutat Res**, v. 657, p. 111-115, 2008.

BAKER, H.M.; ANDERSON, B.F.; BAKER, E.N. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, p. 3579-3583, 2003.

BAR-OR, D.; LAU, E.; WINKLER, J.V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. **J Emerg Med**, v. 19, p. 311-315, 2000.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-126, 2006.

BAYES, B. et al. Oxidative stress, inflammation and cardiovascular mortality in haemodialysis-role of seniority and intravenous ferrotherapy: Analysis at 4 years of follow-up. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, p. 984-990, 2006.

BETSY, L.; NIKO, K.; TOMÁS, W. Iron deficiency in infancy: applying a physiologic framework for prediction. **Am J Clin Nutr**, v. 84, p. 1412-1421, 2006.

BHAGAVAN, N.V. et al. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia in myocardial infarction. **Clin Chem**, v. 49, p. 581-585, 2003.

BELLO, A.K.; NWANKWO, E.; EL NAHAS, A.M. Prevention of chronic kidney disease: a global challenge. **Kidney Int Suppl**, v. 98, p. 11-17, 2005.

BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymol**, v. 299, p. 15-27, 1999.

BEVILACQUA, F. et al. **Fisiopatologia Clínica**. 5ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1995.

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

BRUGGEMAN, L.A. et al. Neuropathy in human immunodeficiency virus-1 transgenic mice is due to renal transgene expression. **J Clin Invest**, v. 100, p. 84-92, 1997.

BUONOCORE, G. et al. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. **Pediatr Res**, v. 52, p. 46-49, 2002.

BUREN, P.V. et al. Iron overdose: a contributor to adverse outcomes in randomized trials of anemia correction in CKD. **Int Urol Nephrol**, v. 44, p. 499-507, 2012.

- BURON, F. et al. Estimating glomerular filtration rate in kidney transplant recipients: performance over time of four creatinine-based formulas. **Transplantation**, v. 92, p. 1005-1011, 2011.
- BURTIS, C.A. et al. **Fundamentos de Química Clínica (Tietz)**. 6 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2008.
- CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**, v. 87, p. 840-844, 2000.
- CALDECOTT, K.W. Single-strand break repair and genetic disease. **Nat Rev Genet**, v. 9, p. 619-631, 2008.
- CALONGE, T.M.; O'CONNELL, M.J. Turning off the G₂ DNA damage checkpoint. **DNA Repair**, v. 7, p. 136-140, 2008.
- CĂPUȘĂ, C.; MIRCESCU, G. Oxidative stress, renal anemia, and its therapies: Is there a link? **J Ren Nutr**, v. 5, p. 71-76, 2010.
- CEVERO, A.J. et al. Dental management in renal failure: Patients on dialysis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 13, p. 419-426, 2008.
- CHANG, A.; KRAMER, H. Should eGFR and albuminuria be added to the Framingham risk score? Chronic kidney disease and cardiovascular disease risk prediction. **Nephron Clin Pract**, v. 119, p. 171-178, 2011.
- CHEN, T.S.; LIOU, S.Y.; CHANG, Y.L. Chemiluminescent analysis of plasma antioxidant capacity in uremic patients undergoing hemodialysis. **Ren Fail**, v. 30, p. 843-847, 2008.
- CHEN, Y. et al. Validation of a PicoGreen-based DNA quantification integrated in an RNA extraction method for two-dimensional and three-dimensional cell cultures. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 18, p. 444-452, 2012.
- CHO, D.K. et al. Ischemia-modified albumin is a highly sensitive serum marker of transient myocardial ischemia induced by coronary vasospasm. **Coron Artery Dis**, v. 18, p. 83-87, 2007.
- CHUNG, S.H. et al. Association between residual renal function, inflammation and patient survival in new peritoneal dialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p. 590-597, 2003.
- COOMBES, J.S.; FASSETT, .RG. Antioxidant therapy in hemodialysis patients a systematic review. **Kidney Int**, v. 81, p. 233-246, 2012.
- CORREDOR, Z. et al. Genomic damage as a biomarker of chronic kidney disease status. **Environ Mol Mutagen**, v. 56, p. 301-312, 2015.
- CHRISTENSON, R.H. et al. Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. **Clin Chem**, v. 47, p. 464-470, 2001.

DAHE, G.J. et al. The biocompatibility and separation performance of antioxidative polysulfone/vitamin E TPGS composite hollow fiber membranes. **Biomaterials**, v. 32, p. 352-365, 2011.

DA SILVA, C.; SASSON, S.; CALDINI, N. **Biologia**. 10 ed. São Paulo. Ed. Saraiva, 2011.

DEL, R.D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 15, p. 316-328, 2005.

DELANEY, S. et al. Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA. **Free Radic Res**, v. 46, p. 420-441, 2012.

DOGARU, C.B. et al. Venous versus arterial iron administration in haemodialysis. Influence on erythrocytes antioxidant parameters. **J Med Life**, v. 8, p. 69-73, 2015.

DRAIBE, S.; CENDEROGLO, M. Epidemiologia da insuficiência renal crônica (IRC) no Brasil. **Int Braz J Urol**, v. 29, p. 3-6, 2004.

DU PUCH, C.B.M. et al. Tools and strategies for DNA damage interactome analysis. **Mutat Res**, v. 752, p. 72-83, 2013.

DURAK, I. et al. Reduced erythrocyte defense mechanism against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. **Nephron**, v. 66, p. 76-80, 1994.

ELSHAMAA, M.F. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene intron4 VNTR polymorphism in patients with chronic kidney disease. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 22, p. 487-492, 2011.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clin Biochem**, v. 38, p. 1103-1111, 2005.

ERSSON, C. et al. The effects of hemodialysis treatment on the level of DNA strand breaks and oxidative DNA lesions measured by the comet assay. **Hemodial Int**, v. 17, p. 366-373, 2013.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med**, v. 11, p. 81-128, 1991.

FENTON, A. et al. Multidisciplinary care improves outcome of patients with stage 5. Chronic kidney disease. **Nephron Clin Pract**, v. 115, p. 283-288, 2010.

FERNANDES, N.; BASTOS, R.M.R.; BASTOS, M.G. Diagnóstico da doença renal crônica a partir da filtração glomerular estimada: CKD-EPI ou MDRD [Resumo]. **Congr Bras Nefrol**, v. 506, 2010.

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

FISCHER, S.G.L. et al. Oxidative Stress in Complex Regional Pain Syndrome (CRPS): No Systemically Elevated Levels of Malondialdehyde, F₂-Isoprostanes and 8OHdG in a Selected Sample of Patients. **Int J Mol Sci**, v. 14, p. 7784-7794, 2013.

FISHBANE, S. Iron management in nondialysis-dependent CKD. **Am J Kidney Dis**, v. 49, p. 736-743, 2007.

FISHBANE, S.; MATHEW, A.; VAZIRI, N.D. Iron toxicity: relevance for dialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 29, p. 255-259, 2014.

FLEISCHHACKER, M.; SCHMIDT, B. Circulating nucleic acids (CNAs) and câncer-a survey. **Biochim Biophys Acta**, v. 1775, p. 181-232, 2007.

GANZ, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**, v. 102, p. 783-788, 2003.

GANZ, T. Molecular control of iron transport. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p. 394-400, 2007.

GARNEATA, L. Intravenous iron, inflammation and oxidative stress: is iron a friend or an enemy of uremic patients? **J Ren Nutr**, v. 18, p. 40-45, 2008.

GEISZT, M. ; LETO, T.L. The Nox family of NADPH oxidases: host defense and beyond. **J Biol Chem**, v. 279, p. 51715-51718, 2004.

GEORGIU, C.D.; PAPAPOSTOULOU, I.; GRINTZALIS, K. Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks). **Nat Protoc**, v. 4, p. 125-131, 2009.

GHOTI, H. et al. Evidence for tissue iron overload in long-term hemodialysis patients and the impact of withdrawing parenteral iron. **Eur J Haematol**, v. 89, p. 87-93, 2012.

GIDENNE, S. et al. Analytical performance of the albumin cobalt binding (ACB®) test on the Cobas MIRA® Plus analyzer. **Clin Chem Lab Med**, v. 42, p. 455-461, 2004.

GODSTEIN, S.; MEYERSTEIN, D.; CZAPSKI, G. The Fenton reagentes. **Free Radic Biol Med**, v. 15, p. 443-445, 1993.

GOLD, R. et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. **Lab Invest**, v. 71, p. 219-225, 1994.

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 30, p. 390-397, 2008.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de fisiologia Médica. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, p. 224-246, 2011.

HA, T.T.N. et al. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **PLoS ONE**, v. 6, p. 259-269, 2011.

HACIŞEVKI, A. et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis and oxidative DNA damage in end-stage renal disease. **Clin Lab**, v. 59, p. 1353-1361, 2013.

HAZINI, A. et al. Investigation of ischemia modified albumin, oxidant and antioxidant markers in acute myocardial infarction. **Postepy Kardiol Interwencyjnej**, v. 11, p. 298-303, 2015.

HERRERA, J. et al. Melatonin prevents oxidative stress resulting from iron and erythropoietin administration. **Am J Kidney Dis**, v. 37, p. 750-757, 2001.

HERRERA, L.J. et al. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. **Clin Chem**, v. 51, p. 113-118, 2005.

HIMMELFARB, J.; LAZARUS, M.; HAKIM, R. Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis. **Am J Kidney Dis**, v. 17, p. 271-276, 1991.

HUKIC, F. et al. Biochemical markers of iron status in hemodialysis patients. **Med Arh**, v. 64, p. 219-222, 2010.

INRIG, J.K. et al. Mortality by dialysis modality among patients who have end-stage renal disease and are awaiting renal transplantation. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 1, p. 774-779, 2006.

JACOB, K.D. et al. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. **Mech Ageing Dev**, v. 134, p. 139-157, 2013.

JAIRAM, A. et al. Iron status, inflammation and hepcidin in ESRD patients: The confounding role of intravenous iron therapy. **Indian J Nephrol**, v. 20, p. 125-131, 2010.

JOHNSON, R.J.; GLASER, J.; SÁNCHEZ-LOZADA, L.G. Chronic kidney disease of unknown etiology: a disease related to global warming? **MEDICC Rev**, v. 16, p. 79-80, 2014.

JOURDE-CHICHE, N. et al. Vascular incompetence in dialysis patients-proteinbound uremic toxins and endothelial dysfunction **Semin Dial**, v. 24, p. 327-337, 2011.

KALANTAR-ZADEH, K. et al. Intravenous iron versus erythropoiesis-stimulating agents: friends or foes in treating chronic kidney disease anemia? **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 16, p. 143-51, 2009.

KALOUSOVÁ, M. et al. Advanced oxidation protein products in pregnancy. **Ceska Gynekol**, v. 67, p. 194-197, 2002.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutat Res**, v. 498, p. 67-77, 2001.

KAN, E. et al. Assessment of DNA strand breakage by the alkaline COMET assay in dialysis patients and the role of vitamin E supplementation. **Mutat Res**, v. 520, p. 151-159, 2002.

KANEDA, H. et al. Increased level of advanced protein products in patients with coronary artery diseases. **Atheroscler**, v. 162, p. 221-225, 2002.

KAO, M.P. et al. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. **J Hum Hypertens**, v. 24, p. 1-8, 2010.

KATO, J. et al. Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy 2_-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. **Cancer Res**, v. 61, p. 8697-8702, 2001.

KELM, M. Nitric oxide metabolism and breakdown. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, p. 273-289, 1999.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. **Mutagenesis**, v. 26, p. 177-184, 2011.

KOHLOVA, M. et al. Circulating cell-free DNA levels in hemodialysis patients and its association with inflammation, iron metabolism, and rhEPO doses. **Hemodial Int**, v. 17, p. 664-670, 2013.

KOOMAN, J.P. et al. Chronic kidney disease and premature ageing. *Nat Rev Nephrol*, v. 10, p. 732-742, 2014.

KOZAK, J. et al. Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis thaliana* is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance. **DNA Repair**, v. 8, p. 413-419, 2009.

KOVESDY, C.P. Iron and clinical outcomes in dialysis and non-dialysis-dependent chronic kidney disease patients. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 16, p. 109-116, 2009.

KRUSZEWSKI, M. et al. Direct use of the comet assay to study cell cycle distribution and its application to study cell cycle-dependent DNA damage formation. **Mutagenesis**, v. 27, p. 551-558, 2012.

KUMARI, S. et al. DNA damage: detection strategies. **EXCLI J**, v. 7, p. 44-62, 2008.

KUMBASAR, A. et al. The effect of different doses and types of intravenous iron on oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. **J Nephrol**, v. 25, p. 825-832, 2012.

KUO, K. et al. Intravenous iron exacerbates oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes in chronic hemodialysis patients. **J Am Soc Nephrol**, v. 19, p. 1817-1826, 2008.

LANKHORST, C.E.; WISH, J.B. Anemia in renal disease: Diagnosis and management. **Blood Rev**, v. 24, p. 39-47, 2010.

LEE, C.C.; SUN, C.Y.; WU, M.S. Long-term modality related analysis in incident dialysis patients. **Perit Dial Int**, v. 29, p. 182-190, 2009.

- LEE, D.I. et al. A convenient preparation of dityrosine via Mn (III) – mediated oxidation of tyrosine. **Process Biochem**, v. 43, p. 999-1003, 2008.
- LEVEY, A.S. et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Ann Intern Med**, v. 150, p. 604-612, 2009.
- LEHMANN, A.R.; FUCHS, R.P. Gaps and fprks in DNA replication: Rediscovering ol models. **DNA Repair**, v. 5, p. 1495-1498, 2006.
- LEVEY, A.S.; INKER, L.A.; CORESH, J. GFR estimation: from physiology to public health. **Am J Kidney Dis**, v. 63, p. 820-834, 2014.
- LIBETTA, C. et al. Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis. **Clin Biochem**, v. 44, p. 1189-1198, 2011.
- LILES, A.M. Intravenous versus oral iron for treatment of iron deficiency in non-hemodialysis-dependent patients with chronic kidney disease. **Am J Health Syst Pharm**, v. 69, p. 1206-1211, 2012.
- LORENZI, T.F. **Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada**. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- MALYSZKO, J. et al. New parameters in iron metabolismo and functional iron deficiency in patients on maintenance hemodialysis. **Pol Arch Med Wewn**, v. 122, p. 537-542, 2012.
- MALLICK, N.P.; GOKAL, R. Haemodialysis. **The Lancet**, v. 353, p. 737-742, 1999.
- MARKESBERY, W.R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer disease. **Free Radic Biol Med**, v. 23, p. 134-147, 1997.
- MARUYAMA, Y. et al. Effect of repeated intravenous iron administration in haemodialysis patients on serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels. **Nephrol Dial Transplant**, v. 22, p. 1407-1412, 2007.
- MCGREGOR, D. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties **Crit. Rev. Toxicol**, v. 37, p. 887-914, 2007.
- MEKKI, A.N.; HASSAN, A.N.; ELSAYED, E.M. Extended spectrum beta lactamases among multi drug resistant Escherichia coli and Klebsiella species causing urinary tract infections in khartoum. **J Bacteriol**, v. 2, p. 18-21, 2010.
- MENENDEZ, J.A. et al. "Metformin and the ATM DNA damage response (DDR): accelerating the onset of stress-induced senescence to boost protection against cancer". **Aging (Albany NY)**, v. 11, p. 1063-1077, 2011.
- MERCER, J.; MAHMOUDI, M.; BENNETT, M. DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease. **Mutat Res**, v. 621, p. 75-86, 2007.
- MIMIĆ-OKA, J. et al. Evaluation of oxidative stress after repeated intravenous iron supplementation. **Ren Fail**, v. 27, p. 345-351, 2005.

MINZ, M. et al. Oxidative status in stable renal transplantation. **Transplant Proc**, v. 38, p. 2020-2021, 2006.

MIGUEL, A.; LINARES, M.; PEREZ, A. Evidence of and increased susceptibility to lipid peroxidation in red blood cells of chronic renal failure patients. **Nephron**, v. 50, p. 64-61, 1998.

MIRCESCU, G. et al. Global assessment of serum antioxidant status in hemodialysis patients. **J Nephrol**, v. 18, p. 599-605, 2005.

MORROW, D.A. et al. The search for a biomarker of cardiac ischemia. **Clin Chem**, v. 49, p. 537-539, 2003.

MOTA, V.T. Bioquímica Clínica: princípios e interpretação. 3ed Porto Alegre. **Editora Médica Missau**, 2000.

MOTHES, E.; FALLER, P. Evidence that the principal CoII-binding site in human serum albumin is not at the N-terminus: implication on the albumin cobalt binding test for detecting myocardial ischemia. **Biochem**, v. 46, p. 2267-2274, 2007.

MOURA, A. et al. Effect of Aging in the Perception of Health-Related Quality of Life in End-Stage Renal Disease Patients under Online-Hemodiafiltration. **Aging Dis**, v. 25, p. 17-26, 2014.

NAITO, Y. et al. Adaptive response of the heart to longterm anemia induced by iron deficiency. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, p. 585-593, 2009.

NGUYEN-KHOA, T. et al. Oxidative stress an Haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. **Nephrol Dial Transplant**, v. 16, p. 335-340, 2001.

NISHIKAWA, T. et al. Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxy-guanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1507-1512, 2003.

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

O'DRISCOLL, M.; JEGGO, P.A. The role of double-strand break repairinsights from human genetics. **Nat Rev Genet**, v. 7, p. 45-54, 2006.

OLIVEIRA, M.B.; ROMÃO, J.E.; ZATZ, R. End-stage renal disease in Brazil: epidemiology, prevention and treatment. **Kidney Int**, v. 68, p. 82-86, 2005.

OPATRINA, S. et al. Cell-free plasma DNA during Hemodialysis. **Ren Fail**, v. 31, p. 475-480, 2009.

ORINO, K. et al. Ferritin and the response to oxidative stress. **Biochem J**, v. 357, p. 241-247, 2001.

PAIDIPALLI, M. et al. Single-step intercalating dye strategies for DNA damage studies. **J Microbiol Methods**, v. 94, p. 144-151, 2013.

PALEVSKY, P.M. Indication and timing of renal replacement therapy in acute kidney injury. **Crit Care Med**, v. 36, p. 224-228, 2008.

PAN, H.Z. et al. Oxidative damage to DNA and its relationship with diabetic complications. **Biomed. Environ Sci**, v. 20, p. 160-163, 2007.

PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxid Med Cell Longev**, v. 3, p. 2-12, 2010.

PARRA, J.M.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S.; CASTAÑO, A. Assessment of genotoxic effects induced by selected pesticides on RTG-2 fish cells by means of a modified fast micromethod assay. **Environ Toxicol**, v. 27, p. 238-243, 2012.

PAVÃO, P.R.G. et al. Ausência de efeito genotóxico induzido por esteróides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. **Rev Bras Educ Fís Esp**, v. 21, p. 5-10, 2007.

PERES, L.A.B. et al. Estudo epidemiológico da doença renal crônica terminal no oeste do Paraná: uma experiência de 878 casos atendidos em 25 anos. **J Bras Nefrol**, v. 32, p. 51-56, 2010.

PERES, L.A.B. et al. Biomarcadores da injúria renal aguda. **J Bras Nefrol**, v. 35, p. 229-236, 2013.

PINTO, P.S. et al. Inadequabilidade da creatinina sérica na identificação precoce da disfunção renal. **J Bras Nefrol**, v. 26, p. 196-201, 2004.

PRATS, M. et al. Oxidative stress markers in predicting response to treatment with ferric carboxymaltose in nondialysis chronic kidney disease patients. **Clin Nephrol**, v. 81, p. 419-426, 2014.

PULKKANEN, K.J. et al. False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. **Apoptosis**, v. 5, p. 329-333, 2000.

RAMACHANDRAN, K. et al. Free circulating DNA as a biomarker of prostate cancer: comparison of quantitation methods. **Anticancer Res**, v. 33, p. 4521-4529, 2013.

RAMBOD, M.; KOVESDY, C.P.; KALANTAR-ZADEH, K. Combined high serum ferritin and low iron saturation in hemodialysis patients: the role of inflammation. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 3, p. 1691-1701, 2008.

RAMIREZ, T. et al. In vitro effects of albendazole and its metabolites on the cell proliferation kinetics and micronuclei frequency of stimulated human lymphocytes. **Arch Med Res**, v. 32, p. 119-122, 2001.

RANGEL-LÓPEZ, A. et al. Genetic damage in patients with chronic kidney disease, peritoneal dialysis and haemodialysis: a comparative study. **Mutagenesis**, v. 28, p. 219-225, 2013.

RIELLA, M.C. Principios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos. 4ª Ed Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2003.

ROBERTS, C.K. ; SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sci**, v. 84, p. 705-712, 2009.

ROBBINS, S.T.; COTRAN, R.S. **Patologia. Bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

RODRÍGUEZ-RIBERA, L. et al. Genetic damage in patients moving from hemodialysis to online hemodiafiltration. **Mutagenesis**, v. 31, p. 131-135, 2016.

ROEHRS, M. et al. The plasma retinol levels as pro-oxidant/oxidant agents in haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 24, p. 2212-2218, 2009.

ROSTOKER, G. et al. Hemodialysis-associated hemosiderosis in the era of erythropoiesis-stimulating agents: a MRI study. **Am J Med**, v. 125, p. 991-999, 2012.

ROY, D. et al. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. **Heart**, v. 92, p. 113-114, 2006).

ROSTOKER, G. et al. Maximal standard dose of parenteral iron for hemodialysis patients: an MRI-based decision tree learning analysis. **PLoS One**, v. 9, p. e115096, 2014.

RUSKOVSKA, T.; JANSEN, E.H.; ANTAROROV, R. Evaluation of assays for measurement of sérum (anti) oxidants in hemodialysis patients. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 843157, 2014.

SANDOVAL, S.B. et al. Genetic damage in chronic renal failure patients is associated with the glomerular filtration rate index. **Mutagenesis**, v. 25, p. 603-608, 2010.

SANTOS, A.M.R.; LEMOS, C.C.S.; BREGMAN, R. Proteinúria – marcador clássico de comprometimento glomerular. **J Bras Nefrol**, v. 23, p. 217-220, 2001.

SCHENA, F.P. Epidemiology of end-stage renal disease: International comparisons of renal replacement therapy. **Kidney Int**, v. 57, p. 39-45, 2000.

SCHUPP, N. et al. Effect of different hemodialysis regimens on genomic damage in end-stage renal failure. **Semin Nephrol**, v. 26, p. 28-32, 2006.

SCHUPP, N.; HEIDLAND, A.; STOPPER, H. Genomic damage in endstage renal disease-contribution of uremic toxins. **Toxins (Basel)**, v. 2, p. 2340-2358, 2010.

SHARMA, R. et al. Transport of glutathione-conjugates in human erythrocytes. **Acta Biochim Pol**, v. 47, p. 751-762, 2000.

SHARMA, R. et al. Ischemia modified albumin predicts mortality in ESRD. **Am J Kidney Dis**, v. 47, p. 493-502, 2006.

SILVA, J.; FREITAS, T.R.O.; MARINHO, J.R. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay) to environmental in vivo biomonitoring with native rodents. **Genet Mol Biol**, v. 23, p. 241-245, 2000.

SILVERBERG, D.S. et al. Correction of iron deficiency in the cardiorenal syndrome. **Int J Nephrol**, doi: 10.4061/2011/365301, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia 2013**. Disponível em: http://www.sbn.org.br/pdf/censo_2013-14-05.pdf. Acesso em: 12 mar. 2016.

SONNWEBER, T. et al. Impact of iron treatment on immune effector function and cellular iron status of circulating monocytes in dialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, p. 977-987, 2011.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Met Mol Biol**, v. 113, p. 203-212, 1999.

STACHOWICZ-STENCEL, T. et al. Association between intestinal and antioxidante barriers in children with câncer. **Acta Biochim Pol**, v. 59, p. 237-242, 2012.

STOPPER, H. et al. Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. **Am J Kidney Dis**, v. 34, p. 433-437, 1999.

STOPPER, H. et al. Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. **Am J Kidney Dis**, v. 38, p. 296-301, 2001.

STOYANOVA, E. et al. Oxidative DNA damage in chronic renal failure patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 25, p. 879-885, 2010.

STOYANOVA, E. et al. Bas excision repair capacity in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis treatment. **Cell Biochem Funct**, v. 32, p. 177-182, 2014.

STROUN, M. et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. **Clin Chim Acta**, v. 313, p. 139-142, 2001.

SUSANTITAPHONG, P.; ALQAHTANI, F.; JABER, B.L. Efficacy and safety of intravenous iron therapy for functional iron deficiency anemia in hemodialysis patients: a meta-analysis. **Am J Nephrol**, v. 39, p. 130-141, 2014.

SWARNALATHA, G. et al. Oxidative stress in hemodialysis patients receiving intravenous iron therapy and the role of N-acetylcysteine in preventing oxidative stress. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 21, p. 852-858, 2010.

SZPECHCINSKI, A. et al. Evaluation of fluorescence-based methods for total vs. amplifiable DNA quantification in plasma of lung cancer patients. **J Physiol Pharmacol**, v. 59, p. 675-681, 2008.

SZUSTER, D.A.C. et al. Sobrevida de pacientes em diálise no SUS no Brasil. **Cad Saude Publica**, v. 28, p. 415-424, 2012.

TANAKA, S.; TANAKA, T. How to Supplement Iron in Patients with Renal Anemia. **Nephron**, v. 131, p. 138-144, 2015.

TARPEY, M.M.; WINK, D.A.; GRISHAM, M.B. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* consideration. **Am J Physiol**, v. 286, p. 431-444, 2004.

TILLEY, M.; BEAN, S.R.; TILLEY, K.A. Capillary electrophoresis for monitoring dityrosine and 3-bromotyrosine synthesis. **J Chromatogr**, v. 1103, p. 368-371, 2006.

TILLEY, M. et al. Nonenzymatic preparative-scale synthesis of dityrosine and 3-bromotyrosine. **Anal Biochem**, v. 334, p. 193-195, 2004.

TOKER, A. et al. Serum and saliva levels of ischemia-modified albumin in patients with acute myocardial infarction. **J Clin Lab Anal**, v. 27, p. 99-104, 2013.

THOMAS, C. et al. The diagnostic plot: a concept for identifying different states of iron deficiency and monitoring the response to epoetin therapy. **Med Oncol**, v. 23, p. 23-36, 2006.

TOVBIN, D. et al. Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: Role of inflammation. **Am J Kidney Dis**, v. 40, p. 1005-1012, 2002.

TOVBIN, D. et al. Circulating cell-free DNA in hemodialysis patients predicts mortality. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, p. 3929-3935, 2012.

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.

TURKMEN, K. et al. The relationship between oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis in renal transplant and end-stage renal disease patients. **Ren Fail**, v. 34, p. 1229-1237, 2012.

TUCKER, P.S. et al. Clinical and research markers of oxidative stress in chronic kidney disease. **Biomarkers**, v. 18, p. 103-115, 2013.

VALENTINI, J. et al. Human erythrocyte delta-aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. **Clin Biochem**, v. 40, p. 591-594, 2007.

VAMVAKAS, S. et al. Impairment of DNA repair in the course of long-term hemodialysis and under cyclosporine immunosuppression after renal transplantation. **Transplant. Proc**, v. 28, p. 3468-3473, 1996.

VARAN, H.I. et al. Acute effects of hemodialysis on oxidative stress parameters in chronic uremic patients: comparison of two dialysis membranes. **Int J Nephrol Renovasc Dis**, v. 3, p. 39-45, 2010.

VAZIRI, N.D. Understanding iron: promoting its safe use in patients with chronic kidney failure treated by hemodialysis. **Am J Kidney Dis**, v. 61, p. 992-1000, 2013.

VUJANAC, A. et al. Nitroglycerine effects on portal vein mechanics and oxidative stress in portal hypertension. **World J Gastroenterol**, v. 18, p. 331-339, 2012.

WATSON, D. J. et al. *Biologia Molecular do Gene*. 5 ed. Porto Alegre. **Artmed**, 2006.

WEI, S.Y. et al. Chronic kidney disease care program improves quality of pre-end-stage renal disease care and reduces medical costs. **Nephrology**, v. 15, p. 108-115, 2010.

WEISS, G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. **Acta Biochim Biophys**, v. 1790, p. 682-693, 2009.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int**, v. 49, p. 1304-1313, 1996.

WORSTER, A. et al. Capability of ischemia-modified albumin to predict serious cardiac outcomes in the short term among patients with potential acute coronary syndrome. **CMAJ**, v. 173, p. 1685-1690, 2005.

YILDIZ, G. et al. Influence of single hemodialysis session on serum paraoxonase-1, arylesterase activity, total oxidant status and total antioxidant status. **Minerva Med**, v. 105, p. 79-87, 2014.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001.

ZAHA, A. ; FERREIRA, H. B. ; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 5 ed. Porto Alegre. Artmed, 2014.

ZALBA, G. et al. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **J Physiol Biochem**, v. 56, p. 57-64, 2000.

ZARITSKY, J. et al. Heparin a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 4, p. 1051-1056, 2009.

ZHANG, Z.H. et al. Metabolomics insights into chronic kidney disease and modulatory effect of rhubarb against tubulointerstitial fibrosis. **Sci Rep**, v. 5, p. 14472, 2015.

ZHOU, Q. et al. Accumulation of circulating advanced oxidation protein products is an independent risk factor for ischaemic heart disease in maintenance haemodialysis patients. **Nephrology**, v. 17, p. 642-649, 2012.

ZUWAŁA-JAGIEŁŁO, J.; WARWAS, M.; PAZGAN-SIMON, M. Ischemia-modified albumin (IMA) is increased in patients with chronic hepatitis C infection and related to markers of oxidative stress and inflammation. **Acta Biochim Pol**, v. 59, p. 661-667, 2012.