

Maria do Sameiro Pinto César de Faria

**Biomarcadores preditivos de mortalidade em doentes renais crónicos em hemodiálise. Perfil lipídico, anemia, acesso vascular e inflamação.**

*Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Médicas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.*

**Orientador** – *Professora Doutora Alice Santos Silva*

Categoria – Professora Associada, Agregada

Afiliação – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

**Coorientador** - *Professor Doutor Alexandre Tiedtke Quintanilha*

Categoria – Professor Catedrático

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

**Coorientador** - *Professor Doutor Luís Filipe Barbosa Amado Belo*

Categoria – Professor Auxiliar

Afiliação – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.



It's really clear that the most precious resource we all have is time.

Steve Jobs

À memória do meu pai.

À minha mãe.

Ao meu filho



De acordo com a legislação em vigor, constam nesta tese os artigos originais, publicados em revistas internacionais, que a seguir se discriminam:

### Artigos

Maria do Sameiro Faria, Sandra Ribeiro, Elísio Costa, Denisa Mendonça, Laetitia Teixeira, Petronila Rocha-Pereira, João Fernandes, Henrique Nascimento, Michaela Kohlova, Flávio Reis, Leonilde Amado, Elsa Bronze-da-Rocha, Vasco Miranda, Alexandre Quintanilha, Luís Belo, Alice Santos-Silva. **Risk Factors for Mortality in Hemodialysis Patients: Two-Year Follow-Up Study.** Disease Markers 2013; 35: 791–798.

Maria do Sameiro Faria, Sandra Ribeiro, Petronila Rocha-Pereira, Vasco Miranda, Alexandre Quintanilha, Flávio Reis, Elísio Costa, Luís Belo, Alice Santos-Silva. **Vascular access versus the effect of statins on inflammation and fibrinolysis in renal dialysis patients.** Journal of Vascular Access 2013;14 (4): 335-341.

Maria do Sameiro Faria, Sandra Ribeiro, Petronila Rocha-Pereira, João Fernandes, Flávio Reis, Elsa Bronze-da-Rocha, Vasco Miranda, Alexandre Quintanilha, Elísio Costa, Luís Belo, Alice Santos-Silva. **Body mass index and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in maintenance hemodialysis patients.** Renal Failure 2013;35 (10): 1392-1398.

Maria do Sameiro Faria, Sandra Ribeiro, Henrique Nascimento, Petronila Rocha-Pereira, Vasco Miranda, Denisa Mendonça, Alexandre Quintanilha, Elísio Costa, Luís Belo, Alice Santos-Silva. **Adiponectin is an independent predictor of tissue plasminogen activator levels in patients under haemodialysis.** Scandinavian Journal of Urology and Nephrology 2012; 46: 461-465.

Sandra Ribeiro, Maria do Sameiro Faria, Filipa Mascarenhas-Melo, Isabel Freitas, Maria Isabel Mendonça, Henrique Nascimento, Petronila Rocha-Pereira, Vasco Miranda, Denisa Mendonça, Alexandre Quintanilha, Luís Belo, Elísio Costa, Flávio Reis, Alice Santos-Silva. **Main Determinants of PON1 Activity in Hemodialysis Patients.** American Journal of Nephrology 2012; 36: 317-323.

## **Trabalho realizado nas seguintes instituições**

- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto

- Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

- Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) da Universidade do Porto

- Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FM/UC)

- Universidade da Beira Interior (UBI).

- Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa, Porto.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>7</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>PREFÁCIO</b> .....	<b>13</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>1. DOENÇA RENAL CRÓNICA TERMINAL</b> .....	<b>21</b>
EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA .....	21
DEFINIÇÃO, SINTOMAS, ACHADOS LABORATORIAIS E COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS.....	24
<b>2. HEMODIÁLISE</b> .....	<b>25</b>
HISTÓRIA E FUNDAMENTOS DO PROCESSO DE DIÁLISE .....	25
TIPOS DE DIÁLISE .....	27
FREQUÊNCIA E A DURAÇÃO (DOSE) DA DIÁLISE .....	29
<b>3. MORTALIDADE NOS DOENTES EM HEMODIÁLISE</b> .....	<b>30</b>
ASPETOS GERAIS .....	30
CAUSAS DE MORTE .....	32
<i>Doença cardiovascular</i> .....	32
<i>Doença não cardiovascular</i> .....	33
FATORES DE RISCO DE MORTALIDADE .....	34
INFLAMAÇÃO.....	35
ACESSO VASCULAR.....	38
STRESS OXIDATIVO E PARAOXONASE 1.....	42
ANEMIA E ERITROPOIETINA.....	45
PERFIL LIPÍDICO E TERAPÊUTICA COM ESTATINAS.....	47
ESTADO NUTRICIONAL, OBESIDADE E ADIPONECTINA .....	49
DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, COAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE.....	52
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>57</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
“RISK FACTORS FOR MORTALITY IN HEMODIALYSIS PATIENTS: TWO-YEAR FOLLOW-UP STUDY” .....	63
“VASCULAR ACCESS VERSUS THE EFFECT OF STATINS ON INFLAMMATION AND FIBRINOLYSIS IN RENAL DIALYSIS PATIENTS” .....	73
“BODY MASS INDEX AND RESISTANCE TO RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN THERAPY IN MAINTENANCE HEMODIALYSIS PATIENTS” .....	83

“ADIPONECTIN IS AN INDEPENDENT PREDICTOR OF TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR LEVELS IN PATIENTS UNDER HAEMODIALYSIS” .....	93
“MAIN DETERMINANTS OF PON1 ACTIVITY IN HEMODIALYSIS PATIENTS” .....	101
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>113</b>
CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DOS DOENTES EM PROGRAMA DE HEMODIÁLISE. .	114
FACTORES EXÓGENOS MODULADORES DO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	118
<b>LIMITAÇÕES</b> .....	<b>125</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>126</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>131</b>



## **AGRADECIMENTOS**

Nos nossos dias, o aperfeiçoamento do conhecimento é geralmente acompanhado pelo crescente incremento da especialização. O conceito de investigação multidisciplinar oferece contudo a oportunidade de abrir novas áreas de pesquisa, ao fornecer diferentes abordagens para problemas específicos, através de novos conceitos e metodologias. Esse foi o caso deste projeto de investigação, que representou uma oportunidade para evidenciar a importância da colaboração de elementos de diferentes áreas, impulsionando dessa forma as possibilidades de descoberta e inovação.

Este trabalho envolveu a colaboração de investigadores de várias instituições, incorporando o trabalho e as sugestões de elementos do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto, do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) da Universidade do Porto, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FM/UC), da Universidade da Beira Interior (UBI), e do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa, no Porto.

A ajuda de todos eles, direta ou indiretamente tornou esta tese possível. A todos deixo aqui o meu agradecimento.

Não poderia deixar de realçar pelo profundo impacto que tiveram na concretização deste projeto as seguintes pessoas:

A Professora Doutora Alice Santos Silva, minha orientadora, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela permanente disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos. O seu apoio e estímulo persistente foram determinantes na elaboração desta Tese.

O Professor Doutor Luís Belo, meu co-orientador, pela competência científica e orientação dada, bem como por toda a disponibilidade e simpatia demonstrada.

O Professor Doutor Alexandre Quintanilha, a quem agradeço o privilégio de o poder ter como meu co-orientador desta dissertação, bem como a simpatia e disponibilidade demonstradas.

O Professor Doutor Elísio Costa, pioneiro nesta parceria, e que me desafiou para este projeto, com energia e otimismo contagiantes, agradeço-lhe o empenho que pôs na realização deste projeto de investigação, toda a amabilidade e amizade demonstradas.

Ao Dr. Vasco Miranda, amigo de longa data, agradeço todo a disponibilidade, interesse e apoio dado ao longo de todos estes anos e que tanto me tem sensibilizado.

A todos os restantes co-autores dos trabalhos que servem de base a esta tese, agradeço a colaboração, com particular destaque para a Dr.<sup>a</sup> Sandra Ribeiro.

A todos os elementos da equipa de enfermagem e elementos do secretariado das clínicas de hemodiálise envolvidas, em particular à Enfermeira Leonilde Amado, agradeço de igual forma.

A todas as minhas colegas do Serviço de Nefrologia Pediátrica do Centro Hospitalar do Porto, lideradas pela Dr.<sup>a</sup> Conceição Mota, agradeço a sua disponibilidade, colaboração e amizade.

A todos os meus familiares, principalmente à minha mãe e às minhas irmãs, gostaria de lhes agradecer todo o carinho e amizade que me deram ao longo deste período.

Ao meu filho, Pedro Diogo Nunes, dedico esta obra, pela compreensão e ternura sempre manifestadas. Ao meu marido José Pedro Nunes, agradeço todo o empenho e firmeza inquebrantável com que me apoiou e que me fez prevalecer.

E, por último, mas não menos importante, expresso também a minha gratidão a todos os doentes que aceitaram participar neste projeto permitindo que este estudo fosse possível.

## **ABREVIATURAS**

**AEE Agentes estimuladores da eritropoiese**

**Apo Apolipoproteína**

**CVC Cateter venoso central**

**CRP Proteína C Reativa**

**DRCT Doença renal crónica terminal**

**EPO Eritropoietina**

**ERA – EDTA *European Renal Association–European Dialysis and Transplant Association***

**FAV Fístula artério-venosa**

**HD Hemodiálise**

**HDL Lipoproteínas de alta densidade**

**IL Interleucina**

**BMI Índice de massa corporal**

**LDL Lipoproteínas de baixa densidade**

**PAI-1 Inibidor do ativador do plasminogénio tipo 1**

**PON Paraoxonase**

**t-PA Ativador do plasminogénio tecidual**

**rHu-EPO Eritropoietina recombinante humana**

**TMAO *Trimethylamine N-oxide***

**TNF- $\alpha$  Fator de Necrose Tumoral Alfa**

**VLDL Lipoproteínas de muito baixa densidade**

**USRDS *United States Renal Data System***



## Prefácio

*...one can entertain the following important prediction: A patient with end-stage renal failure who is in the 20 to 50 year age range and is otherwise well who starts renal replacement therapy in the 1980's should have a nearly normal life expectancy...*

*BELDING H. SCRIBNER 1989*

A hemodiálise move-se atualmente de forma irreversível, em direção a uma tecnologia progressivamente mais inovadora, com novas formas de tratamento e novos avanços farmacológicos. As sessões de diálise decorrem hoje de forma eficaz e segura, com morbidade intra-dialítica reduzida. Contudo, apesar dos contínuos esforços nesta área, os doentes com insuficiência renal crónica sob terapêutica de hemodiálise continuam a manter na atualidade uma mortalidade e morbidade muito superiores à da população geral. Para quem trabalha com doentes renais crónicos em tratamento regular por hemodiálise, como é a minha situação há longos anos, o espectro desta elevada mortalidade, presente em todas as faixas etárias, associa-se sempre a uma grande frustração pessoal pela incapacidade clínica de fazer mais por estes doentes.

Fez portanto sentido para mim aceitar o desafio que me foi colocado: avaliar a mortalidade nos doentes Portugueses com insuficiência renal crónica sob terapêutica de hemodiálise e tentar estabelecer uma relação entre a mortalidade e diferentes parâmetros. Entre estes últimos contaram-se as diferentes modificações fisiopatológicas associadas à insuficiência renal, os fatores de risco cardiovascular “tradicionais”, a anemia e/ou a resistência à terapêutica com agentes estimuladores da eritropoiese e o tipo de acesso vascular utilizado na hemodiálise. Tal como B. Scribner observou, a hipertensão arterial e o tipo de acesso vascular continuam a ser fatores de extrema importância para assegurarmos a longevidade destes doentes, mas muitos outros biomarcadores se perfilam na lista de potenciais candidatos. Neste projeto avaliámos alguns desses aspetos que nos pareceram mais significativos.

Com este estudo pretendeu-se dar um contributo, ainda que modesto, para o esforço contínuo que deve representar a melhoria dos cuidados clínicos, da qualidade de vida e da longevidade dos doentes renais crónicos em hemodiálise.

## Resumo

Os doentes com doença renal crónica terminal em programa de hemodiálise apresentam uma mortalidade elevada. Uma parte importante dessa mortalidade é devida a doença cardiovascular e a infeções. Fatores como a inflamação, a dislipidemia, as alterações na eritropoiese, no metabolismo do ferro, na função endotelial e no estado nutricional têm sido descritas neste tipo de doentes. O objetivo principal deste estudo consistiu na identificação de uma associação entre estes parâmetros e a mortalidade num conjunto de doentes em hemodiálise, mediante um seguimento de 2 anos. Foram ainda estudadas uma série de questões conexas, no sentido de tentar aumentar o conhecimento desta área. Um conjunto alargado de dados foi obtido, relativos a um conjunto de 189 doentes em programa de hemodiálise (55 % do sexo masculino; média de idade de  $66,4 \pm 13,9$  anos), incluindo dados hematológicos, perfil lipídico, metabolismo do ferro, índice de massa corporal, marcadores de inflamação, marcadores de disfunção endotelial e de adequação da diálise. Faleceram 35 doentes (18,5%) durante o período de follow-up. O tipo de acesso vascular, o valor da CRP (um marcador de inflamação), e os triglicéridos (um marcador de metabolismo lipídico e de estado nutricional) foram parâmetros que se apresentaram como estando associados a diferenças na mortalidade.

Este estudo mostrou ainda que os doentes com CVC, em particular os que não se encontravam medicados com estatina, apresentaram valores mais elevados de D-dímeros, possivelmente na dependência de uma maior degradação de fibrina. Foi ainda notado que a terapêutica com estatinas se associou a uma menor inflamação nos doentes com CVC, enquanto nos doentes com fístula arterio-venosa (FAV), a mesma terapêutica se associou a menores níveis de adiponectina e a valores mais elevados de tPA e de PAI-1. Este estudo demonstrou ainda que os doentes em hemodiálise através de CVC, particularmente aqueles que não estão sob terapia com estatinas, apresentam maior turnover de fibrina e uma maior proporção de partículas de LDL oxidado, quando comparados com os doentes com FAV e sem tratamento com estatinas, o que lhes poderá

conferir maior risco cardiovascular. O tipo de acesso vascular para hemodiálise poderá influenciar a inflamação e fibrinólise/ função endotelial nestes doentes, sendo menos certo o papel da terapêutica com estatinas.

Este trabalho apontou ainda no sentido de os doentes em hemodiálise com resistência aos agentes estimuladores da eritropoiese apresentarem uma deficiência de ferro funcional, associada a um estado inflamatório exacerbado, não obstante apresentarem valores de índice de massa corporal (BMI) mais baixos e valores mais altos de adiponectina, quando comparados com os restantes doentes. Foi ainda verificado que nos doentes em hemodiálise a adiponectina apresentou uma correlação inversa com o BMI. Contudo, nesta população de doentes, o BMI não apresentou uma relação nítida com a IL-6 nem com a CRP.

Numa outra vertente, o presente estudo permitiu concluir que a adiponectina, o PAI-1 e a idade se comportaram como fatores determinantes dos valores de t-PA nos doentes em hemodiálise. Os resultados obtidos sugerem que o t-PA possa funcionar como um marcador de disfunção sistémica, possivelmente envolvendo o endotélio, o tecido adiposo (através da adiponectina), no contexto de um estado inflamatório crónico, frequentemente presente neste tipo de doentes.

Por outro lado, o presente trabalho apontou no sentido de diferentes fatores, genéticos e não genéticos, se comportarem como determinantes da atividade para-oxonase 1 (PON1) plasmática em doentes em hemodiálise, a qual se encontra reduzida nestes doentes, quando comparada com controlos. Os polimorfismos genéticos L55M e Q192R do gene pon1, as VLDL, o colesterol LDL, a Apo A, a CRP, o tempo em diálise e a dose de AEE foram outros fatores que pareceram influenciar a atividade da enzima. A PON1 poderá ter um papel protetor, designadamente no que respeita à aterosclerose, pelo que a sua atividade diminuída, seja por razões genéticas, seja pela inflamação, seja por outros motivos, poderá associar-se ao prognóstico frequentemente negativo destes doentes.



## Abstract

End-stage renal disease (ESRD) patients under hemodialysis therapy (HD) have a high mortality rate. Inflammation, dyslipidemia, and several types of disturbances, in erythropoiesis, in iron metabolism, in endothelial function, and in nutritional status have been reported in these patients. The major aim of the present investigation was to try to identify any significant association of mortality with these disturbances, by performing a two-year follow-up study. Further investigations were also carried out, in order to try to increase our knowledge of this subject. A large set of data was obtained from 189 HD patients (55.0% male;  $66.4 \pm 13.9$  years old), including hematological data, lipid profile, iron metabolism, nutritional, inflammatory, and endothelial dysfunction markers, and dialysis adequacy. A total number of 35 patients (18.5%) died along the follow-up period. The type of vascular access, the C-reactive protein (CRP) plasma value (a marker for inflammation), and plasma triglycerides (a marker for lipid metabolism and for nutritional status) were three parameters that were found to be associated to mortality.

The present investigation also showed that patients with central venous catheter (CVC), in particular those that were not under statin therapy, had higher values for D-dimers, possibly due to a greater production and degradation of fibrin. It was also noted that statin therapy was associated to a lesser degree of inflammation in patients with CVC, whereas in patients with arterio-venous fistula (AVF), the same type of therapy was associated to lesser levels of adiponectin and higher values for tPA and PAI-1. This study also showed that hemodialysis patients with CVC, particularly those that are not under statin therapy, have a greater production and turnover of fibrin, as well as a greater proportion of oxidized LDL particles, when compared to patients with AVF and without statin treatment, what could lead to an increased cardiovascular risk. The type of vascular access for hemodialysis may influence inflammation and fibrinolysis/ endothelial function in these patients; the role played by statins in this setting is less clear.

This paper also pointed towards hemodialysis patients with resistance to erythropoiesis stimulating agents (ESA) presenting a functional iron deficiency, associated with an exacerbated inflammatory state, despite having lower body mass index (BMI) values and higher values for adiponectin, when compared with other patients. It was also found that for patients undergoing hemodialysis, adiponectin showed an inverse correlation with BMI. However, in this patient population, BMI did not show a clear relationship either with IL-6 or with C-reactive protein (CRP).

In another aspect, the present study showed that adiponectin, PAI-1 and age behaved as determinants of t-PA values for patients undergoing hemodialysis. The results presented suggest that t-PA can act as a marker for systemic dysfunction, possibly involving the endothelium, adipose tissue (through adiponectin) in the context of a chronic inflammatory condition, often present in such patients.

On the other hand, this research point towards different factors, genetic and non-genetic, behaving as determinants of the activity of plasma paraoxonase 1 (PON1) in patients on hemodialysis, which is reduced in these patients compared with controls. Genetic polymorphisms L55M and Q192R of the pon1, gene, VLDL, LDL- cholesterol, Apo A, CRP, dialysis time and the dose of ESA were other factors that appear to influence the activity of the enzyme. PON1 may have a protective role, particularly with regard to atherosclerosis, so its decreased activity, whether for genetic reasons or caused by inflammation, or for other reasons, may concur to the often negative prognosis of these patients.

# INTRODUÇÃO

---



# 1. Doença renal crónica terminal

## Epidemiologia e etiologia

Os rins são dois órgãos abdominais (retroperitoneais), que embora tenham dimensões e peso relativamente pequenos (menos de 200 g no caso de rins normais) (1), desempenham funções fundamentais no organismo humano, bem como nos mamíferos em geral. Os rins são caracterizados por receberem uma irrigação sanguínea abundante, correspondente a cerca de um quinto do débito cardíaco total. A estrutura funcionalmente mais importante do rim é o glomérulo, um conjunto de capilares modificados que funcionam como uma membrana semipermeável, permitindo a passagem de água e de solutos para a cápsula (de Bowman) – fenómeno designado como filtração glomerular.

Os rins desempenham funções fundamentais na homeostasia do organismo humano, assegurando a excreção de diversas substâncias tóxicas, incluindo a ureia. As suas funções incluem a regulação da volemia, da pressão arterial, da concentração de diversos eletrólitos, da osmolaridade plasmática e do equilíbrio ácido/base. Os rins funcionam ainda como órgãos endócrinos, com a produção, designadamente, de renina, eritropoietina e calcitriol.

As doenças dos rins podem apresentar-se de uma forma variada. Por vezes, como no caso de algumas infeções, podem ser de natureza potencialmente reversível. Noutros casos, as doenças determinam o declínio da função renal, e muitas dessas situações clínicas são dotadas de irreversibilidade, estabelecendo-se uma situação de insuficiência renal crónica. A insuficiência renal é facilmente diagnosticada através da elevação de biomarcadores plasmáticos, dos quais a creatinina e a ureia são os mais frequentemente utilizados.

Quando o grau de função renal declina marcadamente e de forma irreversível, estabelece-se uma insuficiência renal crónica terminal, uma situação clínica cuja evolução natural resultaria na morte da pessoa afetada. A ciência médica desenvolveu diferentes técnicas substitutivas de função renal, que permitem a sobrevivência de muitos doentes afetados por insuficiência renal crónica, constituindo um notável marco na História da Medicina e na aplicação prática da inteligência humana. A doença renal crónica terminal (DRCT) é também conhecida como estadio 5 da doença renal crónica, segundo a classificação da

National Kidney Foundation, correspondente a doentes com taxa de filtração glomerular inferior a 15 mL/minuto/1,73 m<sup>2</sup> ou em programa de diálise (os restantes estadios são o I, II, III e IV, com taxas de filtração glomerular > 90, de 60-89, de 30-59 e de 15-29 mL/minuto/1,73 m<sup>2</sup>, respetivamente) (2).

A DRCT afeta um número importante de doentes. Em Portugal verifica-se uma incidência e prevalência particularmente elevadas de doentes com DRCT em tratamento substitutivo da função renal. Esse aspeto foi evidenciado, designadamente, no Relatório Anual do Registo de 2012 da ERA – EDTA (European Renal Association–European Dialysis and Transplant Association) (3), que usa dados provenientes de registos nacionais de 30 países Europeus. Verifica-se que, entre os países analisados, Portugal apresentou a taxa de incidência (não ajustada para idade e sexo) mais elevada de doentes em terapêutica substitutiva de função renal, por milhão de habitantes (220 casos por milhão de habitantes). O mesmo sucedeu relativamente à prevalência da mesma terapêutica (1670 casos por milhão de habitantes). Relativamente à distribuição dos doentes incidentes pelas modalidades de tratamento substitutivo (hemodiálise, diálise peritoneal e transplantação renal), Portugal apresentou a incidência não ajustada mais elevada de doentes adstritos à hemodiálise (184,7 casos por milhão de habitantes). No que respeita à distribuição dos doentes prevalentes pelas modalidades de tratamento, Portugal apresentou a prevalência não ajustada mais elevada para hemodiálise (997,6 casos por milhão de habitantes), do grupo de 30 países (3).

Segundo o registo da Sociedade Portuguesa de Nefrologia referente ao ano de 2014, iniciaram tratamento substitutivo da função renal em Portugal um total de 2473 doentes (237,2 casos por milhão de habitantes) (4), e destes, 2233 iniciaram hemodiálise. No que respeita aos doentes em tratamento, no mesmo ano de 2014, 11350 doentes encontravam-se em tratamento com programa de hemodiálise, 6618 tinham sido submetidos a transplante renal e 735 encontravam-se em programa de diálise peritoneal (sendo o total de 18703 doentes ou 1793,7 casos por milhão de habitantes; Tabela 1) (4). Esta elevada incidência e prevalência de doentes, registada em Portugal, poderá associar-se, em parte, ao maior envelhecimento da nossa população. Nos últimos anos verificou-se um perfil ascendente da idade média dos doentes prevalentes em hemodiálise (67,2 anos em 2014) sendo que 58,5% eram do sexo masculino.

**Tabela 1.** Número de doentes em tratamento substitutivo da função renal em 2014, em Portugal

Hemodiálise	Diálise peritoneal	Transplante renal
11350	735	6618

(Adaptado do Relatório anual da Sociedade Portuguesa de Nefrologia (4))

A etiologia da DRCT nem sempre é conhecida com precisão (Tabela 2). Em muitos casos, o diagnóstico é estabelecido com base na respetiva clínica, como acontece com muitos casos de nefropatia diabética ou de doença hipertensiva. Outras causas relativamente comuns da DRCT são as doenças obstrutivas do sistema urinário (incluindo as doenças da próstata) e as infeções dos rins (pielonefrites).

No que respeita às doenças renais estudadas através da técnica de biópsia renal, Carvalho e col. estudaram um conjunto de 2216 amostras com origem em Portugal, e encontraram como tipo de doença mais comum as glomerulonefrites primárias e como tipo histológico mais comum a nefropatia IgA (5). Nesse estudo, publicado em 2006, o síndrome nefrótico constituiu a apresentação clínica mais comum (42,0% dos doentes), seguindo-se as anomalias urinárias, (28,5%), a insuficiência renal aguda (9,7%), a insuficiência renal crónica (9,3%) e o síndrome nefrítico (9,3%) (5).

No que respeita à distribuição das doenças renais em populações pediátricas, e de novo no que respeita aos casos estudados através de biópsia renal, neste caso através de uma série de 142 casos, as glomerulonefrites primárias foram também as mais frequentes (6). A doença renal pode ter diferentes etiopatogénias, muitas das quais ainda relativamente mal compreendidas. Em alguns casos, contudo, é possível associar um tipo de doença renal a um determinado fator sistémico, tal como é o caso das glomerulonefrites membrano-proliferativas em doentes com exposição a consumo de heroína, nas quais a infeção por vírus da hepatite C se encontra frequentemente presente (7). Como foi já referido, a *Diabetes mellitus* e a hipertensão arterial apresentam-se como fatores etiológicos prováveis em grande número de

doentes com insuficiência renal crónica terminal, contudo muitos destes doentes não são submetidos a biópsia renal (Tabela 2).

**Tabela 2.** *Etiologia da DRCT em doentes prevalentes em tratamento substitutivo da função renal com hemodiálise ou diálise peritoneal em 2014, em Portugal (total de 11.992 doentes)*

<i>Diabetes mellitus</i>	27,8%
Hipertensão arterial	14,9%
Glomerulonefrite	12,4%
Doença renal policística	6,1%
Outras etiologias	19,1%
Indeterminada	19,8%

*(Adaptado do Relatório anual da Sociedade Portuguesa de Nefrologia (4))*

### **Definição, sintomas, achados laboratoriais e complicações associadas**

O prognóstico da insuficiência renal crónica terminal não tratada é mau, sendo que a ausência de função renal é incompatível com a vida, exceto se for providenciada uma técnica substitutiva da função renal. A hemodiálise é a técnica mais frequentemente utilizada para esse efeito.

É frequente designar por síndrome urémico o conjunto de sinais e sintomas associados à insuficiência renal crónica terminal, que incluem a fraqueza progressiva, a anorexia, as náuseas e os vómitos, a atrofia muscular, o trémulo, as alterações mentais e respiratórias e a acidose metabólica. A anemia, a hipertensão arterial, a desnutrição, a hipervolemia, a hipercalemia, a hipocalcemia e a hiperfosfatemia são também comuns. O derrame pericárdico urémico pode surgir e levar o doente à morte. Acredita-se que o síndrome urémico seja devido à acumulação de produtos químicos que seriam em condições normais excretados pelo rim. Estes produtos de retenção associados



à DRCT são designados como toxinas urêmicas sempre que produzam interações negativas com as funções biológicas (8).

O diagnóstico de um estado de insuficiência renal é efetuado através de análises sanguíneas, geralmente através da medição da ureia (“*blood urea nitrogen*”) e da creatinina plasmáticas, substâncias excretadas pelos rins e que se acumulam na insuficiência renal. Os valores de creatinina plasmática são influenciados, para além da função renal, pela massa muscular, enquanto que no caso da ureia, o estado da volemia e a ingestão proteica podem afetar os valores plasmáticos. A ureia é o produto final do metabolismo proteico, foi identificada pela primeira vez na urina no século XVII, tendo sido o primeiro soluto de retenção urémica a ser identificado e tem sido utilizado como marcador de doença renal desde então (9). A cistatina C é um outro marcador de função renal, que poderá ter uma melhor correlação com a taxa de filtração glomerular do que a creatinina (10). Em termos experimentais, a inulina pode ser utilizada como marcador essencialmente excretado por filtração glomerular. Presentemente utilizam-se com frequência fórmulas para o cálculo da taxa de filtração glomerular, sendo as mais utilizadas a de Cockcroft e Gault (11) e a fórmula do “*Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study*” (12).

## 2. Hemodiálise

### História e fundamentos do processo de diálise

A hemodiálise foi inicialmente desenvolvida com o intuito de tratar doentes com insuficiência renal aguda. Na sequência de trabalhos pioneiros de Abel e col. (publicados em 1913) (13), a primeira hemodiálise no ser humano terá sido efetuada por G. Hass (em Giessen, Alemanha, em 1924) (14). A técnica foi depois desenvolvida por W. Kolff, que construiu um aparelho de hemodiálise (Holanda, 1943-1945) (15).

Em Março de 1960 teve lugar o primeiro tratamento prolongado, pela técnica de hemodiálise, de um doente com insuficiência renal crónica terminal (no Seattle’s University of Washington Hospital (16)), sob o impulso de B. Scribner e W. Quinton, sendo que a primeira unidade de hemodiálise não hospitalar iniciou funções em 1962 (o Seattle Artificial Kidney Center) (16).

A técnica de hemodiálise evoluiu ao longo do primeiro meio século que teve de vida, e um avanço importante foi a criação em 1966 da técnica da fístula arterio-venosa (FAV) por Brescia e col. (17) (Figura 1).

A primeira sessão de hemodiálise efetuada por Hass durou 15 minutos, enquanto que a primeira sessão de hemodiálise efetuada por Scribner, no início de um tratamento crónico, durou 76 horas. Em 1960, a hemodiálise era realizada cada 5 a 7 dias, quando os sintomas de uremia voltavam a aparecer (16). O aparecimento de hipertensão arterial e de neuropatia levaram a que se tornasse necessário realizar diversos tratamentos por semana (16).



*Figura 1 – Fístula arterio-venosa (FAV) de doente em início de um tratamento de hemodiálise. A FAV é uma conexão artificial entre uma artéria e uma veia. O sangue circula através de um circuito extra-corporal que inclui o filtro de hemodiálise.*

De uma forma geral, a técnica hemodialítica (18) consiste na passagem de duas correntes líquidas, o sangue do doente e o líquido de diálise, em sentidos opostos e separadas por uma membrana semi-permeável, permitindo a troca de solutos em função de gradientes de concentração eletro-químicos (Figura

2). A diálise em si própria consiste num fenómeno de difusão (18). A concentração de solutos e o respetivo peso molecular são os principais determinantes das taxas de difusão. Adicionalmente, uma vez que os doentes com DRCT aumentam de peso entre os tratamentos de hemodiálise, devido predominantemente à ingestão de líquidos e sólidos, a hemodiálise é usualmente acompanhada da técnica da ultrafiltração, através da qual é retirada água ao doente, neste caso através de uma diferença de pressão entre os dois lados da membrana semi-permeável.

A prescrição de hemodiálise é ajustada de forma a remover cerca de dois terços da ureia corporal em cada tratamento (19). Contudo, existem diversos solutos que não são retirados em quantidades tão apreciáveis aquando das sessões de hemodiálise, em virtude de fatores como o peso molecular elevado (maior que 1 kD), a ligação à albumina ou a sequestração em diferentes compartimentos corporais (tal como sucede com o fosfato, a creatinina, o ácido úrico, ou a beta<sub>2</sub>-microglobulina) (19). Segundo Dhondt e col., a hemodiálise é eficaz na remoção das moléculas com peso molecular baixo; as moléculas com peso molecular intermédio podem ser removidas mais facilmente utilizando membranas com poros maiores, mas essa técnica não é eficaz na remoção de moléculas ligadas às proteínas (20).

O processo de diálise utiliza grandes volumes de água na preparação da solução de diálise. Um doente em hemodialise pode ser exposto a mais de 190 litros de água por dialise. Os aperfeiçoamentos observados nos equipamentos de tratamento da água para hemodiálise resultaram na melhoria da qualidade química da água. A qualidade microbiológica da água também representa uma fonte de preocupação, pois sabe-se que endotoxinas e fragmentos bacterianos presentes na água e na solução de diálise podem atravessar a membrana de diálise.

### **Tipos de diálise**

Na hemodiálise, os solutos atravessam a membrana por difusão, em função das concentrações presentes nos dois lados, tal como referido acima. Na técnica da hemofiltração, a passagem dos solutos depende da presença de uma pressão, e processa-se por convecção, levando a que maiores moléculas possam atravessar a membrana (19).



*Figura 2. Aparelho de hemodiálise, vendo-se a circulação do sangue e do líquido de hemodiálise, em sentido inverso, permitindo a difusão de solutos em função de gradientes de concentrações.*

A hemodiafiltração (uma técnica que combina hemodiálise e hemofiltração) foi comparada com a hemodiálise convencional em numerosos estudos, e muito embora alguns dados apontem no sentido da existência de resultados favoráveis para as técnicas convectivas no que respeita à mortalidade (21), três meta-análises não confirmaram esse achado (22-24), embora tenham mostrado tendências não significativas nesse sentido. No estudo de Susantitaphong e col., as técnicas convectivas foram significativamente melhores do que a hemodiálise no que respeita à mortalidade cardiovascular, à hipotensão associada à técnica, à depuração de ureia, de creatinina, de fosfato, de  $\beta$ -2 microglobulina, de homocisteína, bem como a uma redução da IL-6 (24). Estes autores não notaram diferenças no que respeita à morfologia ou à função cardíacas, à pressão arterial ou à anemia (24). Contudo, a

hemodiafiltração poderá associar-se a uma mais importante ativação das plaquetas do que a hemodiálise (25).

### **Frequência e a duração (dose) da diálise.**

No *National Cooperative Dialysis Study*, Lowrie e col. publicaram em 1981 dados relativos a um conjunto de 151 doentes, divididos em 4 grupos, em função da duração da diálise (curta *versus* longa) e do valor da ureia (*blood urea nitrogen*; alta ou baixa) (26). Embora não se tenham verificado diferenças na mortalidade entre os grupos, o abandono do estudo por razões médicas e a taxa de hospitalização foram superiores nos doentes com ureia elevada (26).

Owen e col. estudaram 13.473 doentes em hemodiálise, e verificaram que a *ratio* de redução de ureia inferior a 60% se associava a uma maior mortalidade, mas a albumina sérica menor que 4 g/dL era um fator preditor de mortalidade mais poderoso (27). A importância prognóstica da albumina foi verificada noutros estudos (28).

A dose de hemodiálise apresentou uma correlação inversa com a mortalidade neste tipo de doentes no estudo de Held e col. Estes autores estudaram um grupo de 2311 doentes em hemodiálise e verificaram, ainda, a existência de um limiar a partir do qual um aumento da dose de hemodiálise não se associava a uma menor mortalidade (*ratio* de redução da ureia de 70% ou Kt/V da ureia de 1,3) (29).

Num estudo mais recente, levado a cabo em 1846 doentes em hemodiálise tri-semanal, Eknoyan e col. efetuaram um ensaio clínico comparando uma dose de diálise padrão *versus* dose alta e um dializador de baixo fluxo *versus* alto fluxo (30). Neste estudo (Hemodialysis Study Group - HEMO) não foram encontradas diferenças na mortalidade entre as modalidades de hemodiálise testadas (30).

No que respeita à frequência dos tratamentos de hemodiálise, Culleton e col. estudaram um conjunto de 52 doentes em hemodiálise, comparando um esquema tradicional de três sessões por semana com um esquema de hemodiálise noturna, 6 vezes por semana (31). Os autores concluíram que a hemodiálise noturna frequente se associava a uma menor massa ventricular

esquerda, a uma redução na necessidade de medicamentos anti-hipertensores, e a uma melhoria em alguns parâmetros de metabolismo mineral (31).

Pelo seu lado, Rocco e col., no estudo “*Frequent Hemodialysis Network Nocturnal Trial*”, estudaram um conjunto de 87 doentes, comparando, de novo, o tratamento de hemodiálise 3 vezes/semana com 6 vezes/semana, noturno (32). A hiperfosfatemia e a hipertensão arterial mostraram melhores valores com a hemodiálise mais frequente, mas não se verificou uma diferença significativa no que respeita à mortalidade ou à massa ventricular esquerda (32).

### **3. Mortalidade nos doentes em hemodiálise**

#### **Aspetos gerais**

No último meio-século, o uso generalizado da hemodiálise para prolongar a vida nos doentes com DRCT constituiu um sucesso considerável, prevenindo a morte por uremia de muitos destes doentes. Presentemente, esta modalidade terapêutica expandiu-se largamente, e é correntemente utilizada por uma população que inclui numerosos doentes idosos, levando a consequências clínicas e económicas importantes para os doentes e para os sistemas de saúde. Os doentes com DRCT têm uma mortalidade elevada (33, 34), a qual excede largamente a mortalidade da população sem essa doença (35), acrescida de uma alta taxa de hospitalização e de uma diminuição da qualidade de vida.

O nosso conhecimento atual dos mecanismos associados à mortalidade elevada, neste contexto, é incompleto. Nas últimas décadas, este campo médico registou importantes avanços tecnológicos e farmacológicos. Não obstante os avanços verificados, a sobrevida destes doentes é ainda relativamente baixa.

Segundo dados do Relatório Anual de 2013 do United States Renal Data System (USRDS), a taxa *ajustada* da mortalidade global na população em diálise é 6,5 a 7,9 vezes maior do que a da população geral (36). O período inicial em hemodiálise parece ser o período mais vulnerável em termos de mortalidade, em particular os primeiros 3 meses (37, 38). A ausência de cuidados nefrológicos pré diálise associa-se fortemente a esta mortalidade

inicial (37). Efetivamente, a otimização dos cuidados pré dialise é importante, não só por poder contribuir para atrasar a progressão da doença renal para a sua fase terminal, mas também para promover as melhores condições para o paciente iniciar a hemodialise, como é o caso da criação precoce de um acesso vascular definitivo (38).

Apesar do aumento da idade média dos pacientes em diálise e do aumento do número de co-morbilidades que apresentam, nos últimos anos verificou-se uma redução na mortalidade dos doentes incidentes e prevalentes em hemodiálise (36, 39, 40). Contudo, como a sobrevida na população geral também aumentou nas últimas décadas, os avanços verificados na população com DRCT tornam-se menos expressivos. Assim, por exemplo, e segundo dados do registo ERA-EDTA 2012, um individuo de 50 anos, tem uma perspetiva de sobrevida na população geral europeia de 32,1 anos, mas de apenas 8 anos se estiver em diálise. Ao contrário do que acontece na população geral, em que as mulheres apresentam vantagem em termos de sobrevida relativamente aos homens, nas mulheres com DRCT em hemodiálise essa vantagem parece anular-se (41), aspeto que poderá dever-se a um aumento da mortalidade não cardiovascular nas mulheres em diálise (41, 42).

Na prática clínica, existiu historicamente uma variação considerável no momento do início da diálise para doentes com DRCT (classe V). Contudo, estudos efetuados nos últimos anos (43), como é o caso do estudo *Initiating Dialysis Early and Late (IDEAL)* (44), indicam que não parece haver vantagem no início mais precoce da diálise (taxa de filtração glomerular estimada de 10,0-14,0 ml por minuto), quando comparado com o início eletivamente mais tardio (taxa de filtração glomerular estimada de 5,0 a 7,0 ml por minuto), em termos de melhoria de sobrevida ou desfechos clínicos. Este estudo pode levar muitos clínicos a optar por propor o início da hemodiálise num momento mais tardio da evolução da doença. Tem-se verificado uma atenuação do progressivo aumento de incidência de doentes, observado em anos anteriores.

A mortalidade nos doentes em hemodiálise poderá estar associada a alguns parâmetros que não foram estudados em detalhe na presente investigação. Assim, os distúrbios do metabolismo do fósforo e do cálcio são reconhecidos como estando associados a alterações da mortalidade destes doentes, sendo que a mortalidade é maior com valores mais elevados do fósforo (45), do cálcio

e da hormona paratiroideia (PTH) (46, 47). Poderá assinalar-se, a esse respeito, a tendência para a calcificação vascular destes doentes (48).

## **Causas de morte**

### ***Doença cardiovascular***

A doença cardiovascular tem sido considerada como a causa de morte mais frequente nestes doentes (49), causando, em algumas séries, mais de 40% dos óbitos (36, 50). Foley e col., em 1998, descreveram a associação entre a DRCT e a doença cardiovascular, nos seguintes termos: prevalência de doença coronária de cerca de 40%; prevalência de hipertrofia ventricular esquerda de cerca de 75%; mortalidade cardiovascular de cerca de 9% por ano e cerca de 10 a 20 vezes superior à da população em geral; prevalência de insuficiência cardíaca de cerca de 40% (51).

A morte por doença cardiovascular (DCV) nos doentes em hemodiálise engloba várias causas, com diferentes mecanismos patogénicos, como a aterosclerose, a insuficiência cardíaca e a morte súbita (paragem cardíaca devido a arritmias fatais desencadeadas por isquemia coronária ou por mecanismos não isquémicos). Segundo dados do Relatório Anual de 2013 doUSRDS, a DCV foi responsável, entre 2009 e 2011, por 42,3% das causas de morte nos doentes prevalentes em HD; destes casos, a morte súbita/arritmia representou 26,9% dos óbitos (36).

Os fatores de risco para morte súbita/arritmia podem incluir aspetos como a idade, a presença de *Diabetes mellitus*, de doença vascular periférica ou de doença cardíaca isquémica (52). Shastri e col. publicaram dados relativos ao estudo HEMO (com 1745 participantes), e mostraram que a morte súbita cardíaca era responsável por 22% dos óbitos, enquanto que a morte cardíaca não súbita foi encontrada em 17% dos casos e a morte não cardíaca em 61% dos óbitos (52).

No estudo *Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study* (DOPPS), foram analisados 37,765 participantes, provenientes de 12 países (53). Neste estudo, a morte súbita (definida por arritmia cardíaca, paragem cardíaca, e/ou hipercaliemia), representou globalmente 26% de todas as mortes, mas com diferenças substanciais entre países: 33,4% nos Estados Unidos, a comparar



com uma média europeia de 17,8%. Segundo Herzog e col., a especial vulnerabilidade da população em hemodiálise para a morte associada a arritmias cardíacas, pode dever-se à presença de doença das artérias coronárias, a uma tolerância diminuída à isquemia do miocárdio, a mudanças rápidas da concentração de eletrólitos, ou a disfunção do sistema nervoso autónomo (50). A própria natureza intermitente do tratamento de hemodiálise, ao longo da semana, pode contribuir para um aumento da taxa de mortalidade. Como Bleyer e col. notaram, poderá verificar-se um possível aumento da mortalidade cardíaca e por morte súbita, às segundas e terças-feiras (54). Também Foley e col., num estudo efetuado em 32,065 pacientes, verificaram que a mortalidade global, a mortalidade cardíaca, a morte súbita e a morte por infeção se associaram com maior frequência ao dia após o intervalo mais longo (55).

### **Doença não cardiovascular**

Os doentes que iniciam diálise têm um risco de mortalidade global aumentada, que em parte não se deve a causas cardiovasculares. Num estudo de Jager e col. (56), utilizando dados provenientes de 123.407 doentes do registo ERA-EDTA, verificou-se que as causas de morte foram cardiovasculares em 39% dos doentes, e não cardiovasculares em 51% dos doentes. A mortalidade cardiovascular foi 8,8 vezes maior do que na população geral, enquanto que a mortalidade não cardiovascular foi 8,1 vezes maior do que na população geral (56).

As infeções e a malignidade são as causas de morte não cardiovasculares mais comuns nos doentes em terapêutica substitutiva da função renal. Sarnak e col. (57) encontraram um valor 50 vezes superior para a mortalidade devida a sepsis nos doentes em diálise, quando comparada com a população geral. Segundo Vogelzang e col. (58), autores que avaliaram a mortalidade por infeções e neoplasia em 168.156 doentes provenientes do registo ERA-EDTA, a mortalidade relacionada a infeção está muito aumentada nos doentes em diálise (risco de morte por infeção 82 vezes maior que o da população em geral) .

As infeções que mais frequentemente causam a morte destes doentes são a septicemia, as infeções urinárias e a pneumonia (59). Powe e col. descreveram

a incidência de pelo menos um episódio de septicemia em 4005 doentes em hemodiálise durante um período de 7 anos, tendo encontrado um valor de 11,7% (60). A idade avançada, a presença de *Diabetes mellitus*, a albumina sérica baixa, o acesso vascular temporário e a reutilização do dialisador (filtro de hemodiálise) estiveram associados a um risco aumentado de infeção (60).

A mortalidade relacionada com malignidade está moderadamente aumentada nos pacientes em diálise (risco de morte cerca de 3 vezes maior que o da população geral) (36, 58).

Em Portugal, segundo os registos da Sociedade Portuguesa de Nefrologia (4), as causas de morte dos pacientes em hemodiálise no ano de 2014 foram em 24,2% dos casos por doença cardiovascular e por morte súbita (esta última representou 8,9% de todas as causas de mortalidade). A infeção (23,9%) e a malignidade (10,1%), representaram 34% das causas de mortalidade. A caquexia foi referida como causa de morte em 8,3% dos casos. Apesar do número crescente de idosos em diálise no nosso país, a taxa de mortalidade global em hemodiálise baixou, em 2014, tendo sido de 12,49%. Dos doentes que iniciaram HD em 2014, cerca de 5,6% faleceram nos primeiros 90 dias de tratamento, o período considerado mais vulnerável, e 70,2% apresentaram seguimento prévio por nefrologista (por mais do que 3 meses).

### **Fatores de risco de mortalidade**

O elevado risco de mortalidade e morbilidade nos doentes em hemodiálise associa-se a uma elevada prevalência de fatores de risco cardiovascular “clássicos” (tais como hipertensão arterial, *Diabetes mellitus*, dislipidemia, hipertrofia ventricular esquerda, tabagismo e idade avançada). Para além disso, diversos fatores relacionados com a uremia (19) podem ter um papel importante, incluindo a sobrecarga de volume, a hiperfosfatemia (61), um valor elevado do produto fosfo-cálcico, a calcificação vascular, a acumulação de toxinas urémicas, a acidose metabólica, as alterações de outros eletrólitos, a anemia, a inflamação, o *stress* oxidativo, a disfunção endotelial, a resistência à insulina, a hiperatividade simpática, a hiper-homocisteinemia (62), a lipoproteína (a) elevada (63) e ainda valores elevados de dimetilarginina assimétrica (64-67). Este último biomarcador (68) associa-se a maior mortalidade apenas nos doentes que não tenham origem Africana (69). A

própria doença renal crónica tem sido encarada como fator de risco para DCV (2, 64). Para além disso, haverá ainda a considerar a natureza da doença renal subjacente, bem como a presença de co-morbilidades.

Tal como referido em baixo, nos doentes em hemodiálise, alguns fatores de risco para outras populações, apresentam-se como protetores nestes doentes (epidemiologia inversa ou paradoxal), incluindo, entre outros, o índice de massa corporal e o colesterol.

Nos doentes que iniciam hemodiálise, crescem alguns fatores de risco específicos da hemodiálise, os quais se relacionam com o tipo de acesso vascular (por vezes com infeção associada), com possíveis alterações rápidas do volume intravascular e da concentração de eletrólitos, com a ativação do sistema imunológico, com a contaminação viral potencial, bem como com impurezas da água de hemodialise. A presença de função renal residual poderá também ter importância neste contexto.

### **Inflamação**

A inflamação crónica, comum nos doentes em hemodiálise (70-72), é uma situação clínica na qual é frequente a presença de doença cardiovascular aterosclerótica (CVD). O processo inflamatório na doença renal crónica pode favorecer o aparecimento de doença cardiovascular, e pode estar associado à elevada morbidade e mortalidade destes doentes (73-75).

A presença de inflamação crónica ou episódica associa-se a aumento do risco de mortalidade. Os marcadores inflamatórios são poderosos preditores de mortalidade após ajustamento para outros fatores de risco (76, 77). A inflamação está associada a outros fatores de risco para a mortalidade nestes doentes, como a resistência à eritropoietina (78), a malnutrição, a doença vascular e a hipertrofia ventricular esquerda.

Em trabalhos anteriores, foi encontrada uma possível interação entre parâmetros da hemostase e marcadores de inflamação aumentados em doentes em hemodiálise, apontando para a hipótese de existir uma relação próxima entre inflamação, disfunção endotelial e alterações da hemostase (79, 80).

A inflamação sistêmica está frequentemente presente nos doentes em hemodiálise, e o uso de cateter venoso central (CVC; Figura 3) foi associado a uma exacerbação do estado inflamatório (79).

A proteína C reativa (CRP; cujo nome deriva da sua capacidade para precipitar o polisacarídeo C somático do *Streptococcus pneumoniae*) liga-se a fosfatos de colina (81, 82), levando à ativação do complemento (83). A CRP plasmática tem origem predominantemente no fígado, sendo a sua síntese promovida pela citocina interleucina-6 (IL-6) (84). Zocalli e col. encontraram uma associação entre a CRP e a aterosclerose carotídea, em doentes em diálise (85).

Zimmermann e col. (76) estudaram um conjunto de 280 doentes em hemodiálise, e verificaram que a idade e a concentração de CRP se correlacionavam negativamente com a sobrevivência na população estudada. Estes autores verificaram que 46% dos doentes apresentavam CRP elevada – demonstrando que a inflamação crónica é comum neste tipo de doentes.

Yeun e col. (75), pelo seu lado, estudaram um conjunto de 91 doentes em hemodiálise, e concluíram, de igual forma, que a CRP se associava à mortalidade. Panichi e col. estudaram 218 doentes em hemodiálise, e concluíram que a IL-6 é um preditor de mortalidade mais poderoso que a CRP neste contexto (77).

A ferritina sérica muito elevada (> 800 ng/ml) poderá associar-se a um mau prognóstico nestes doentes, possivelmente como um contributo do estado inflamatório (86).

Akchurin e Kaskel publicaram uma revisão sobre a inflamação na doença renal crónica (87). Para estes autores, um estado de inflamação crónica de baixo grau caracteriza esta doença, com impacto na sua pato-fisiologia e podendo contribuir para a doença cardiovascular e para a mortalidade destes doentes, bem como para o estado de “*protein-energy wasting*” (87). Os mesmos autores identificaram um conjunto de fatores que podem contribuir para o estado inflamatório destes doentes (Tabela 3).

Vários fatores extracorporais relacionados com a técnica de hemodiálise têm sido implicados como podendo contribuir para manter um estado inflamatório crónico, nomeadamente a exposição aos circuitos e membranas de diálise, e ainda a eventual presença de impurezas e de endotoxinas bacterianas no líquido de diálise.

**Tabela 3.** *Alguns fatores que podem contribuir para o estado inflamatório dos doentes em hemodialise, e menção a alguns achados correlacionados.*

Fator	Achados
<p>Doença de base, incluindo doenças auto-imunes. Co-morbilidades, como a obesidade ou a hipertensão arterial. Efeitos de citocinas inflamatórias, tais como a CRP, a IL-6 ou o TNF-alfa.</p> <p>Stress oxidativo Acidose Infeções, incluindo doença peri-odontal Metabolismo do tecido adiposo alterado</p> <p>“Intestinal dysbiosis”</p> <p>Deficiência em Vitamina D Presença de CVC Presença de rim transplantado não funcionando Fatores no circuito de diálise: retenção de mediadores inflamatórios; desequilíbrio oxidativo; acetato; substâncias pirogênicas no dialisado; ativação do complemento; membranas e outro material bio-incompatível.</p>	<p><i>Associação CRP/mortalidade (76). Associação IL-6/ mortalidade (77). Associação IL-2/ prurido urémico (88). Associação TNF-alfa/ fraturas (75). Associação predisposição genética para produzir pouca interleucina 10/ depressão (89).</i></p> <p><i>Ratio leptina/adiponectina como preditor de mortalidade (90). Associação de “Indoxyl sulfate” e de “p-cresyl sulfate” (toxinas produzidas pela flora intestinal) / IL-6 (91).</i></p>

(Tabela preparada após consulta dos trabalhos de revisão de Akchurin e Kaskel (87), de Jofré e col. (92) e de Kovesdy e col. (93); para abreviaturas ver texto)

Relativamente à insuficiência cardíaca, foi apresentada a “hipótese endotoxina/ lipoproteína” (94), a qual defende que as endotoxinas bacterianas, com proveniência no intestino, penetram na corrente sanguínea em quantidades aumentadas naquela situação clínica, cabendo às lipoproteínas a sua neutralização (95), podendo as endotoxinas contribuir para o estado inflamatório destes doentes. Nos doentes em hemodiálise, o mesmo raciocínio se poderia fazer, acrescentando-se a possibilidade das endotoxinas terem

proveniência no líquido/circuito de hemodiálise, podendo atravessar a membrana da diálise (96). Esta teoria poderia justificar a associação da mortalidade com colesterol baixo nos doentes em hemodiálise.

Tem atraído muita atenção a possibilidade da existência de toxinas urêmicas com proveniência na dieta. Entre estas, o TMAO (“*trimethylamine N-oxide*”), um metabolito, produzido por bactérias intestinais, da fosfatidilcolina, da colina e da L-carnitina poderá ter grande relevo (97, 98). O TMAO associa-se ao risco de morte em doentes com insuficiência renal, enquanto que, em termos experimentais, se associa a fibrose tubulo-intersticial e a disfunção renal (97).

O composto “*Bardoxolone Methyl*”, apresentado como um antioxidante modulador da inflamação, é um ativador do Nrf2 (“*Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*”), que regula a inflamação e o stress oxidativo (99). O ensaio clínico “*Bardoxolone Methyl Evaluation in Patients with Chronic Kidney Disease and Type 2 Diabetes Mellitus: the Occurrence of Renal Events*” (BEACON) foi interrompido precocemente devido a um aumento da incidência de eventos cardio-vasculares (100).

Não são conhecidos ensaios clínicos que demonstrem que os desfechos clínicos dos doentes em hemodiálise sejam melhorados através de intervenções agindo diretamente sobre a inflamação (93). Contudo, a investigação que tem vindo a ser conduzida nesta área tem estudado uma variedade de fármacos de diferentes classes farmacológicas (93), incluindo a pentoxifilina (101), a vitamina C (102), ou ainda o anakinra (antagonista IL-1 $\beta$ ) (103).

### **Acesso vascular**

É necessário um acesso vascular funcionante para a execução da técnica da hemodiálise. A hemodiálise requer o acesso aos vasos sanguíneos, de forma a estabelecer um circuito sanguíneo extra-corporal (tipicamente, três vezes por semana). Este campo tem registado uma evolução escassa nos últimos anos, não obstante a importância da morbilidade causada por disfunção do acesso vascular neste tipo de população (104). Os problemas relacionados com o acesso vascular são responsáveis por um importante número de hospitalizações. Nos doentes estudados por Ifudu e col., os problemas

relacionados com o acesso vascular estiveram ligados a 48% das hospitalizações (105).

Existem três formas de acesso vascular para hemodiálise: a fístula arterio-venosa (FAV), a prótese vascular, e o cateter venoso central (CVC; Figura 3). Cada uma destas modalidades apresenta vantagens e inconvenientes.

A FAV, que consiste numa simples anastomose entre as artérias e veias do antebraço, é geralmente a primeira escolha para acesso vascular para hemodiálise crónica, uma vez que o seu uso se associa a uma menor incidência de infeção e de trombose, com duração de utilização média prolongada. Mais frequentemente são utilizadas FAV com anastomoses da artéria radial com veia cefálica (radio-cefálica), e FAV com artéria braquial e veia cefálica (braquio-cefálica) ou veia basílica (braquio-basílica). A veia basílica pode ser transposta lateralmente (FAV braquio-basílica com transposição). Contudo, este tipo de acesso vascular necessita de maturar por várias semanas ou meses antes de poder ser utilizado, pelo que deve ser construída precocemente, de forma a poder ser utilizada, quando o doente inicia hemodiálise crónica. A FAV tem duas complicações importantes: a disfunção da fístula imediatamente após a sua construção, por um lado, e a estenose da secção venosa com fenómenos de trombose associados (106). As FAV com disfunção podem ser tratadas através de angioplastia, mas são sujeitas a fenómenos de re-estenose, nos quais é frequente a elevada proliferação celular (107).

A prótese vascular sintética é relativamente fácil de colocar e de utilizar. São geralmente utilizadas nos doentes cujos vasos nativos não têm condições para FAV. Contudo, foram descritas incidências elevadas de estenose, trombose e infeção para este tipo de acesso vascular (108). A prótese vascular poderá ter uma menor duração de uso ("*access survival*"), quando comparada com a FAV (109).

O uso de CVC (com túnel subcutâneo) é o método geralmente considerado como menos desejável para efetuar a hemodiálise crónica. O seu uso tornou-se comum a partir da década de 1980, sendo a veia jugular interna a mais frequentemente utilizada (110, 111). Apesar de poderem ser utilizados logo após a sua implantação, os CVC associam-se a taxas particularmente elevadas de infeção, hospitalização e morte (112), sendo a infeção e a trombose as

complicações mais temidas (113). De uma forma geral, as complicações associadas ao uso de cateteres venosos centrais dividem-se em mecânicas, trombóticas e infecciosas (114). As complicações mecânicas podem surgir logo aquando da colocação do cateter, incluindo a punção arterial, o hematoma, o hemotórax e o pneumotórax (114). No caso da punção subclávia, a taxa de complicações mecânicas associadas à colocação de um CVC poderá estar entre os 6,2 e os 10,7% (114). Foram descritas complicações mecânicas tão diversas como o tamponamento cardíaco, a hidrocefalia ou a embolia gasosa, entre outras (115). No caso de se verificar uma infeção associada ao cateter, pode ser necessária a sua remoção e ulterior substituição (114). As infeções dos cateteres de hemodiálise são frequentemente causadas pelo agente *Staphylococcus aureus* (116). Os CVC são propensos a oclusão parcial ou total, o que pode levar a diálises inadequadas ou não efetuadas (112). A estenose venosa central pode ocorrer em associação ao uso de CVC (111).

Em Portugal, segundo o relatório anual do gabinete do Registo da Sociedade Portuguesa de Nefrologia de 2013, dos doentes prevalentes em hemodiálise, 70,7% tinham uma FAV como acesso vascular, 12,4% apresentavam uma prótese e 16,7% eram portadores de um CVC de longa duração (4). O uso prolongado de CVC (com túnel subcutâneo) pode ser justificado nalgumas situações, tais como inexistência de FAV ou prótese em condições adequadas de utilização, bem como em casos de exaustão de outras opções.

O aspeto mais preocupante na utilização de CVC é a alta taxa de infeção (117). No estudo “*Dialysis Morbidity and Mortality Wave 2*”, Ishani e col. estudaram a incidência de septicemia e de bacteremia em doentes em hemodiálise (118). O tipo de acesso para hemodiálise associou-se a diferenças na incidência de septicemia e de bacteremia. Os CVC permanentes apresentaram um aumento de 95% na incidência desse tipo de infeções. A presença de septicemia ou de bacteremia associou-se ao risco de morte, de enfarte do miocárdio, de insuficiência cardíaca, de doença vascular periférica e de acidente vascular cerebral (118).

Num outro estudo (119), envolvendo 66.595 doentes, a mortalidade ao final de um ano foi de 24,9% para os doentes com FAV, a comparar com 27,2% para os doentes com prótese venosa autóloga, 28,1% para os doentes com prótese sintética e de 41,5% para doentes com CVC (119).



No estudo “*U.S. Renal Data System Dialysis Morbidity and Mortality Study Wave 1*”, relativo a 5507 doentes em hemodiálise, a mortalidade foi mais elevada nos doentes com CVC do que nos doentes com FAV, incluindo a mortalidade relacionada com infeção, e também a mortalidade cardio-vascular (120). Pastan e col. publicaram dados no mesmo sentido, num estudo envolvendo 7497 doentes em hemodiálise (121).

Ocak e col. estudaram um conjunto de 1109 doentes holandeses, e confirmaram a mortalidade mais elevada nos doentes com CVC (122). Quando os doentes eram separados em função da idade ser ou não inferior a 65 anos, os autores notaram que os idosos tinham maior mortalidade, sendo que os idosos com CVC apresentaram uma mortalidade particularmente elevada (global, de causa infecciosa e cardiovascular) (122).



*Figura 3. Cateter venoso central (CVC) utilizado em tratamento de hemodiálise.*

Os doentes em hemodiálise poderão apresentar alterações na fibrinólise e/ou disfunção endotelial. Os estudos de marcadores de fibrinólise efetuados nos doentes com DRCT têm apresentado resultados variáveis (123). O tipo de acesso vascular pode ser de importância na análise dos parâmetros

inflamatórios e fibrinolíticos (79, 124, 125). Em trabalho anterior verificou-se uma relação entre a presença de CVC e níveis elevados de D-dímeros, ativador do plasminogénio tecidual (t-PA) e marcadores inflamatórios, tendo sido colocada a hipótese de existir uma relação entre o tipo de acesso vascular utilizado na hemodiálise e o risco de trombogénese (79).

No estudo “*Choices for Healthy Outcomes in Caring for ESRD*” (*CHOICE*), a mortalidade anual foi de 11,7% para os doentes com FAV, de 14,2% para os doentes com próteses, e de 16,1% para os doentes com CVC (126). No mesmo estudo, efetuado em 583 doentes em hemodiálise, os doentes com CVC ou prótese vascular apresentavam um valor mais elevado de CRP (62% e 30%, respetivamente) (127). A presença de CVC não se associava de forma significativa à mortalidade destes doentes após os dados serem ajustados para os níveis dos marcadores inflamatórios (127).

Dados do registo *Australian and New Zealand Dialysis and Transplant Association* (ANZDATA), englobando 612 óbitos ocorridos em 3749 doentes, apontam no sentido de uma maior mortalidade nos doentes com CVC ou com prótese vascular (128). Os autores acreditam, para além disso, que a FAV se associa a uma maior longevidade e a menores taxas de infeção e de intervenção (128).

Ravani e col. publicaram uma revisão sistemática e meta-análise sobre o tema do acesso vascular em doentes em hemodiálise (129). Comparados com os doentes com FAV ou com próteses vasculares, os doentes com CVC apresentaram maior mortalidade e maior incidência de infeções fatais e de eventos cardiovasculares (129). Os doentes com próteses vasculares apresentaram maior mortalidade e maior incidência de infeções fatais, quando comparados com os doentes com FAV (129).

### **Stress oxidativo e paraoxonase 1.**

Nos doentes em hemodiálise, os níveis de inflamação e de *stress* oxidativo encontram-se frequentemente elevados, fatores que podem concorrer para o favorecimento do processo aterosclerótico e, possivelmente, para o risco cardiovascular aumentado. Como comentário geral relativo à questão do *stress*

oxidativo nos doentes em hemodiálise, há a referir alguns estudos, com destaque para dois ensaios clínicos:

No primeiro, Boaz e col. investigaram os efeitos da suplementação com vitamina E (800 U.I./dia) nos desfechos cardiovasculares em 196 doentes em hemodiálise com doença cardiovascular prévia, tendo verificado uma redução num desfecho cardiovascular composto (enfarte do miocárdio, trombose cerebral, doença vascular periférica e angina instável) em associação à terapêutica, quando comparada com a administração de placebo (130).

No segundo, Tepel e col. investigaram os efeitos da acetil-cisteína (600 mg bid) sobre os desfechos cardiovasculares em 134 doentes em hemodiálise, em comparação com placebo (131). Os autores verificaram uma redução significativa de um desfecho composto (incluindo enfarte do miocárdio, mortalidade cardiovascular, trombose cerebral, revascularização miocárdica, doença arterial periférica grave) em associação ao uso de acetil-cisteína (131).

Estes dois estudos têm sido interpretados como tendo resultados não generalizáveis, em virtude, sobretudo, da dimensão relativamente pequena da amostra de doentes estudada (132), mas não deixam de mostrar resultados interessantes.

Bossola e Tazza publicaram um estudo de revisão sobre a associação entre “*stress*” oxidativo e doença cardiovascular nos doentes em hemodiálise (133). Estes autores concluíram, com base em estudos de tipo epidemiológico (“*cross-sectional*”), que os biomarcadores de “*stress*” oxidativo se associaram a prevalência de doença cardiovascular (oito estudos nesse sentido, num total de 10 estudos encontrados na literatura) (133). No entanto, o estudo da associação entre “*stress*” oxidativo e calcificação das artérias coronárias, aterosclerose e desfechos clínicos cardiovasculares e globais mostrou resultados inconclusivos (133).

É aceite que a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é importante no processo de iniciação e progressão da aterosclerose. Sendo a paraoxonase 1 humana (PON1) uma enzima anti-oxidante associada às HDL (134), a sua atividade nos doentes renais pode representar um fator de proteção, inibindo a oxidação das LDL, e por consequência, a formação de *foam cells* e a progressão da aterosclerose. A PON1 é uma enzima sintetizada primariamente no fígado (134), com propriedades anti-aterogénicas, anti-

oxidativas e anti-inflamatórias (134, 135). Estudos *in vitro* apontam no sentido de a PON1 se associar também às lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), embora em grau menor do que às HDL; as VLDL poderiam influenciar a secreção de PON 1 (136).

A enzima PON1 cataliza a hidrólise de numerosos substratos: lactonas, tio-lactonas, ésteres, e fosfo-triésteres, incluindo a paraoxona (137). A atividade desta enzima é influenciada por fatores genéticos e por fatores não genéticos. Têm sido estudados, em particular, dois polimorfismos genéticos envolvendo a região que codifica o gene *pon1*, que se associam a variações na atividade da enzima PON1: o polimorfismo Q192R e o polimorfismo L55M (leucina versus metionina na posição 55). O polimorfismo L55M associa-se a uma diminuição na expressão do RNA (ácido ribonucleico) mensageiro e a uma diminuição na atividade da PON1 (138). O polimorfismo Q192R associa-se a uma redução na atividade da enzima, uma vez que este polimorfismo afeta a cinética da hidrólise de alguns substratos da PON1.

Mackness e col. estudaram a atividade de paraoxonase em 1353 participantes no “*Caerphilly Prospective Study*” (139). A atividade da PON1 era mais baixa (20%) nos 163 homens que tiveram um evento coronário (139). A reduzida atividade de PON1 (sobre a paraoxona) mostrou-se ser um fator de risco independente para eventos coronários em homens em alto risco (139).

Bhattacharyya e col. publicaram em 2008 dados do GeneBank Study, relativos a 1399 doentes submetidos a angiografia coronária (140). O polimorfismo genético Q192R (glutamina [Q, “*wild type*”] versus arginina [R, variante] na posição 192), associou-se a uma variação na atividade da PON1 (QQ192 > QR192 > RR192), bem como a níveis mais elevados de *stress* oxidativo (140). A presença do genótipo QQ192 associou-se a uma maior mortalidade e uma maior incidência de eventos cardiovasculares major (140). A atividade mais elevada de PON1 associou-se a uma incidência menor de eventos cardiovasculares major (140).

Bouman e col. descreveram a PON1 como sendo uma enzima importante na bio-ativação do clopidogrel, com um papel importante do polimorfismo genético Q192R (141). Este achado foi contestado por Ancrenaz e col. (bem como por outros autores), que atribuíram o papel principal na bio-ativação do fármaco às enzimas CYP2C19, CYP2B6 e CYP3A (142). Dados do estudo “*Clopidogrel in*

*Unstable Angina to Prevent Recurrent Events*” (CURE; 5059 doentes) e do estudo “*Atrial Fibrillation Clopidogrel Trial With Irbesartan for Prevention of Vascular Events*” (ACTIVE A; 1156 doentes) não mostraram uma ligação entre o genótipo Q192R da PON 1, quer com a eficácia quer com a segurança do clopidogrel em doentes com síndrome coronário agudo (143). A PON 1 poderá ser a enzima responsável pela bio-ativação do olmesartan, um composto anti-hipertensor que, tal como o clopidogrel, é um pró-fármaco (144).

### **Anemia e eritropoietina**

A anemia é uma complicação frequente em doentes com DRCT em tratamento de hemodiálise, e poderá ter um impacto negativo na qualidade de vida dos doentes, sobretudo no contexto de valores muito baixos de hemoglobina. A introdução da terapêutica com eritropoietina humana recombinante (rhEPO), e de uma forma mais geral, com agentes estimuladores da eritropoiese (AEE) para o tratamento da anemia da DRCT levou a uma redução da anemia e a uma melhoria da qualidade de vida dos doentes, incluindo a vitalidade (145), a qualidade do sono (146) e as funções neuro-cognitivas (147).

Eschbach e col. publicaram em 1989 um trabalho no qual 333 doentes em hemodiálise foram tratados com rhEPO (148). Verificou-se uma eliminação da necessidade de transfusões sanguíneas, bem como uma redução da ferritina em pacientes com sobrecarga de ferro (148). Contudo, o mesmo estudo mostrou, entre outros efeitos adversos, a subida da pressão arterial em 35% dos doentes (148).

Em 2003, Ofsthun e col. publicaram um estudo retrospectivo no qual estudaram a mortalidade de doentes em hemodiálise, em correlação com os níveis de hemoglobina (149). Estes autores notaram que a mortalidade dos doentes com um valor de hemoglobina menor que 9 g/dL era 2,11 vezes maior do que a dos doentes com valores de hemoglobina compreendidos entre 11 e 12 g/dL (149). Neste estudo retrospectivo, valores de hemoglobina igual ou superior a 13 g/dL não se associaram a uma maior mortalidade. Esta questão foi subsequentemente analisada através de estudos prospetivos controlados (ensaios clínicos).

No estudo “*Correction of Hemoglobin and Outcomes in Renal Insufficiency*” (CHOIR), publicado em 2006, Singh e col. estudaram um grupo de 1432 doentes com DRCT, sendo que um grupo de doentes foi tratado com epoetina alfa, procurando atingir um valor de hemoglobina de 13,5 g/dL, enquanto que num outro grupo, o objetivo consistia em atingir um valor de 11,3 g/dL. No final de 16 meses, o “*endpoint*” primário (mortalidade, enfarte do miocárdio, hospitalização por insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral) teve maior incidência nos doentes com valor de hemoglobina mais elevada, não se verificando diferenças na qualidade de vida (150).

No estudo “*Cardiovascular Risk Reduction by Early Anemia Treatment with Epoetin Beta*” (CREATE), publicado, de igual forma, em 2006, um grupo de 603 doentes com taxa de filtração glomerular estimada como estando entre 15 e 35 ml/minuto/1,73 m<sup>2</sup> de superfície corporal, foi dividido em dois ramos, um dos quais com um alvo de hemoglobina de 13 a 15 g/dL, enquanto que o outro tinha um objetivo de 10,5 a 11,5 g/dL de hemoglobina (151). Ao longo de 3 anos, não se verificou qualquer diferença na incidência de um desfecho cardiovascular composto (151). Os doentes do grupo com hemoglobina mais elevada apresentaram uma maior incidência de início de hemodiálise e de hipertensão arterial, mas também um melhor desempenho na avaliação da saúde geral e estado físico (151).

Em 2009 foi publicado o estudo “*Trial to Reduce Cardiovascular Events with Aranesp Therapy*” (TREAT), por Pfeffer e col. (152). Neste estudo, que envolveu 4038 doentes com *Diabetes mellitus*, doença renal crónica e anemia, um grupo foi aleatorizado para ser tratado com darbepoietina alfa com um objetivo de hemoglobina de 13 g/dL, enquanto que no segundo grupo era utilizado placebo, sendo que a mesma darbepoietina alfa era utilizada quando a hemoglobina se encontrasse em valores abaixo de 9 g/dL. Os “*endpoints*” primários - mortalidade, enfarte do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral ou hospitalização por isquemia miocárdica; ou mortalidade e DRCT – não diferiram significativamente entre os dois grupos (152). Contudo, o acidente vascular cerebral foi marcadamente mais frequente nos doentes com hemoglobina mais elevada (152).

Estes e outros dados levaram a que as recomendações atuais sobre esta matéria preconizem que os agentes estimuladores da eritropoiese possam ser

iniciados sempre que a hemoglobina seja inferior a 9 g/dL, sendo que os mesmos agentes não deverão ser utilizados para manter a hemoglobina em valores superiores a 11,5 g/dL (153).

Curiosamente, numa outra situação clínica, a policitemia vera, Marchioli e col. descreveram uma menor incidência de mortalidade cardiovascular e de trombose clinicamente importante nos doentes com hematócrito inferior a 45%, quando comparados com doentes com hematócrito entre 45 e 50% (154). O hematócrito é um determinante fundamental da viscosidade sanguínea (155).

Uma parte dos doentes em hemodiálise apresenta uma marcada resistência aos efeitos dos AEE (156). Têm sido apresentadas diversas condições associadas à resistência aos AEE, incluindo a deficiência de ferro, absoluta ou funcional, o hiperparatireoidismo, a doença oncológica ou hemato-oncológica, as doenças da medula óssea (incluindo o mieloma múltiplo), a inflamação crónica, a toxicidade do alumínio, entre outras causas (157) (a “*pure red cell aplasia*” associada ao uso de rhEPO sendo um fenómeno relativamente raro).

### **Perfil lipídico e terapêutica com estatinas**

A DRCT determina com frequência diversos tipos de alterações no metabolismo lipídico (158). O aumento dos triglicédeos (159, 160) é considerado por alguns autores como o padrão de maior relevo (161). Foram ainda descritos nestes doentes níveis reduzidos de colesterol – HDL (162), níveis aumentados de partículas de LDL oxidadas (162) e níveis aumentados da lipoproteína (a) (163). Segundo Vaziri, existiria uma redução da atividade da lipase de lipoproteínas, contribuindo para uma redução da depuração das lipoproteínas ricas em triglicédeos (158). Segundo o mesmo autor, o colesterol total e o colesterol-LDL encontram-se com frequência dentro dos limites do normal, ou abaixo desses limites, nos doentes em hemodiálise (158). A presença de colesterol plasmático mais elevado associou-se, em diversos estudos, a uma maior sobrevida, em doentes em hemodiálise (164-166). Este fenómeno constitui um exemplo de “epidemiologia inversa” observada neste tipo de doentes.

Para além do tipo de acesso vascular, poderão existir outros fatores a influenciar a inflamação e a função endotelial nos doentes em hemodiálise.

Entre estes fatores poderá contar-se a terapêutica com estatinas (inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase). Para além dos efeitos sobre os lipídeos plasmáticos, têm sido atribuídos às estatinas outros tipos de efeitos, nomeadamente efeitos anti-inflamatórios (167-170). No estudo “*Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin*” (JUPITER), um conjunto de 17.802 pessoas com CRP (medida por técnica de alta sensibilidade)  $\geq 2$  mg/l foram tratados com rosuvastatina ou placebo, tendo-se verificado, no primeiro caso, uma menor incidência de doença cardiovascular (171).

Diversos estudos avaliaram os efeitos das estatinas sobre a CRP e sobre a albumina em doentes em hemodiálise, tendo-se verificado que o uso de estatinas se associou a uma redução da CRP, mas não a uma alteração da albumina (172).

Pisoni e col. estudaram um conjunto de 601 doentes em hemodiálise e verificaram que o uso de estatinas não se associou a uma incidência diferente de disfunção de FAV ou de prótese vascular, quando comparado com a situação de inexistência de terapêutica com estatina (173).

O estudo de Pisoni e col. não foi um ensaio clínico controlado, mas dois ensaios clínicos com dimensão apreciável permitiram esclarecer os efeitos das estatinas em doentes em hemodiálise.

No estudo “*German Diabetes and Dialysis Study Investigators*” (4D), um grupo de 1255 doentes com *Diabetes mellitus* em programa de hemodiálise foi tratado com 20 mg de atorvastatina em alternativa a placebo (174). Após um seguimento de 4 anos, e não obstante uma redução no LDL-colesterol (“*low-density lipoprotein-cholesterol*”), não se verificou uma diferença significativa na ocorrência do “*endpoint*” primário (mortalidade cardiovascular, enfarte do miocárdio e acidente vascular cerebral) (174). Observou-se, no entanto, uma associação entre o uso de atorvastatina e uma menor incidência de eventos cardíacos, bem como com uma maior incidência de acidente vascular cerebral fatal (174). Numa análise “*post-hoc*” (e, como tal, essencialmente geradora de hipóteses), verificou-se que a atorvastatina reduziu o risco de eventos cardíacos e da mortalidade geral se os níveis de LDL-C pré-tratamento fossem superiores a 145 mg/dl (3.76 mmol/L) (175).



No estudo “*A Study to Evaluate the Use of Rosuvastatin in Subjects on Regular Hemodialysis: An Assessment of Survival and Cardiovascular Events (AURORA)*”, um conjunto de 2776 doentes em hemodiálise participaram num ensaio clínico, comparando o efeito de 10 mg diários de rosuvastatina com o efeito placebo (176). Muito embora se verificasse uma redução do LDL-colesterol, após um seguimento de 3,8 anos, não se verificou uma diferença significativa na ocorrência do “*endpoint*” primário (mortalidade cardiovascular, enfarte do miocárdio e acidente vascular cerebral) entre os dois grupos (176).

No *Study of Heart and Renal Protection (SHARP)*, publicado em 2011, um conjunto de 9270 doentes com doença renal crónica (dos quais 3023 em diálise) foram tratados com 20 mg de simvastatina e 10 mg de ezetimibe, em comparação com placebo (177). Após um follow-up de 4,9 anos, os doentes tratados revelaram uma redução de 17% na incidência de eventos interpretados como sendo de causa aterosclerótica (enfarte do miocárdio não fatal e mortalidade coronária; acidente vascular cerebral não hemorrágico; revascularização arterial) (177).

Estes estudos concorreram para que, nas recomendações norte-americanas de 2013 para o tratamento das dislipidemias, os doentes em hemodiálise (tal como os doentes com insuficiência cardíaca) tenham sido considerados como não tendo uma indicação para o uso de estatinas (178).

No que respeita aos doentes em hemodiálise, Gupta e col., estudando a incidência de episódios de sepsis em 1041 doentes, verificaram que o uso de estatinas se associava a uma redução do risco de episódios de sepsis (179).

### **Estado nutricional, obesidade e adiponectina**

A obesidade é um problema importante na generalidade das populações humanas atuais (180). A obesidade associa-se à hipertensão arterial, à *Diabetes mellitus*, a alterações do metabolismo lipídico e à apneia do sono. Muzumdar e col. verificaram que a remoção experimental da gordura visceral no Rato se associava a um aumento da esperança de vida (181), dados em favor da hipótese segundo a qual a gordura visceral em excesso diminui a longevidade.

Em 1993, Hotamisligil e col. mostraram, em modelos experimentais de obesidade e diabetes, um aumento da expressão do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (182). O tecido adiposo liberta diversos tipos de moléculas diferentes, designadas por adipocinas (180). Na obesidade humana, tal como nos modelos experimentais, é frequente encontrar-se um estado de inflamação crónica de baixo grau, caracterizado pelo aumento da produção de adipocinas, nomeadamente a interleucina-6 (IL-6) e o TNF- $\alpha$ , as quais poderão associar-se a um estado de resistência aos efeitos da insulina bem como a alterações no metabolismo lipídico e na função endotelial (183). Os ácidos gordos livres estão frequentemente aumentados nos doentes obesos, e poderão desempenhar um papel na libertação de adipocinas (180). O tecido adiposo poderá ser também uma fonte de PAI-1 (184). Ouchi e col. mostraram a presença de CRP no tecido adiposo, bem como a existência de uma correlação negativa entre a adiponectina e a CRP (185).

Diversos estudos mostraram uma associação inversa “paradoxal” entre alguns fatores de risco “clássicos” para doença cardiovascular e mortalidade em doentes em hemodialise (186-189). Na verdade, tem sido demonstrado que um índice de massa corporal (BMI) elevado pode apresentar-se como “paradoxalmente” protetor e associado com uma sobrevida aumentada, enquanto um BMI baixo se associa a mortalidade mais elevada em doentes em hemodiálise. Estes achados têm sido descritos como “epidemiologia inversa” ou “paradoxo da obesidade” – um fenómeno observado, de resto, em diversos contextos (190, 191). A obesidade tem sido vista como um fator de risco para o aparecimento e a progressão da doença renal crónica (188). Contudo, parecem existir mecanismos nos doentes obesos em hemodiálise que os protegem, quando comparados com doentes com baixo peso. Têm sido propostas diferentes explicações, entre as quais um estado hemodinâmico mais estável, efeitos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), alterações neuro-hormonais e síndrome de malnutrição/ inflamação (189). No que respeita aos doentes com baixo peso, algumas explicações foram propostas para explicar o seu maior risco, incluindo a noção que apresentam uma reserva nutricional reduzida e uma ingestão reduzida de proteínas e de calorias, diminuindo a sua capacidade para ultrapassar a inflamação e a acidose crónicas; a hospitalização e a falência de acessos vasculares são também mais frequentes nestes doentes

(192). Estes achados poderão ser associados ao aumento do estado inflamatório, que é comum nos doentes em hemodiálise, podendo a inflamação ser um fator importante associado à anemia e à resistência aos AEE nos doentes em hemodiálise.

Beddhu e col. estudaram 70.028 doentes em hemodiálise, e verificaram que os doentes com BMI elevado registaram menor mortalidade; contudo, estes autores mostraram que o efeito protetor associado ao BMI elevado se confinava aos doentes com massa muscular normal ou elevada (193).

Kakiya e col., pelo seu lado, estudaram 808 doentes em hemodiálise, e mostraram que um “*lean mass index*” elevado se associava a um menor risco de morte cardiovascular, enquanto que um “*fat mass index*” elevado se associava a um risco menor de mortalidade não cardiovascular (194).

Nos doentes em hemodiálise, os níveis de CRP estão aumentados (195) e os níveis elevados associam-se a uma maior mortalidade (75). A IL-6 apresenta-se também como fator de prognóstico nos doentes em hemodiálise, tal como apuraram Bologna e col. num conjunto de 90 doentes (196). O estado inflamatório observado nos doentes em hemodiálise poderá associar-se a alterações no funcionamento do endotélio vascular, à semelhança do que poderá ocorrer na obesidade.

A adiponectina foi descoberta em 1996 por Maeda e col. (197). Em 1999, Arita e col. mostraram que a adiponectina se apresentava em concentrações diminuídas nos plasmas de doentes obesos, muito embora fosse uma substância produzida no tecido adiposo (198). A adiponectina circula sob a forma de trímeros, hexâmeros e uma forma de alto peso molecular (199). A forma de alto peso molecular da adiponectina correlaciona-se com os valores de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL), e negativamente com os triglicérides e com a CRP (199).

A adiponectina poderá desempenhar um papel anti-aterogénico e anti-inflamatório. A adiponectina poderá ser dotada de efeitos sobre o endotélio, modulando a sua função. Ouchi e col. mostraram que, em condições experimentais, a adiponectina inibe os efeitos do TNF-alfa sobre a adesão a células endoteliais e a expressão das moléculas de adesão VCAM-1, E-selectina, e ICAM-1 (200). Ainda em condições experimentais, Chen e col. mostraram que a adiponectina estimula a produção de NO em células

endoteliais (201). Motoshima e col. descreveram que a adiponectina, novamente em condições experimentais, impede alguns efeitos das LDL oxidadas, designadamente a estimulação da proliferação celular e a produção de superóxido (202). Mais ainda, Okui e col. verificaram que valores mais baixos de adiponectina se associavam a disfunção endotelial das artérias coronárias (203). Contudo, nos doentes em hemodiálise, os níveis de adiponectina estão frequentemente elevados, e poderão estar associados com a mortalidade destes doentes (204).

### **Disfunção endotelial, coagulação e fibrinólise**

O endotélio constitui a interface entre os vasos sanguíneos e o sangue, e apresenta um papel importante na regulação da contração vascular (através, nomeadamente, do papel vasodilatador do NO e da prostaciclina e do papel vasoconstritor da endotelina) e na aterosclerose. A disfunção endotelial pode ser estudada de forma direta através da medição do fluxo sanguíneo. Por exemplo, Heitzer e col. estudaram por pletismografia o fluxo sanguíneo no antebraço, após administração intra-arterial de acetilcolina, como medida de vasodilatação dependente do endotélio (205). Estes autores estudaram 281 doentes com doença das artérias coronárias, e verificaram, após um *follow-up* de 4,5 anos, que os doentes com novos eventos cardiovasculares apresentavam valores mais baixos para a vasodilatação induzida pela acetilcolina (205). Uma técnica indireta alternativa de avaliar a função endotelial consiste em medir biomarcadores produzidos no endotélio (206).

Comparando 159 doentes com doença renal crónica com um grupo de controlo, Yilmaz e col. descreveram uma redução na vasodilatação dependente do endotélio, a par de níveis aumentados da di-metil-arginina assimétrica (um inibidor endógeno da *synthase* [sintétase] do óxido nítrico) e de malon-dialdeído (um marcador de stress oxidativo), e de níveis reduzidos de outros marcadores de stress oxidativo, como a dismutase do superóxido eritrocitária (207).

Hand e col. estudaram doze doentes em hemodiálise, e verificaram que a dilatação venosa em resposta à acetilcolina se encontrava diminuída antes da hemodiálise, sendo corrigida pela mesma (208). Estes autores especularam, nestes doentes, se poderiam acumular inibidores da *synthase* do óxido nítrico,

os quais poderiam ser depurados pela diálise (208). Miyazaki e col., pelo contrário, descreveram uma deterioração da função endotelial em associação à hemodiálise (utilizando uma técnica diferente, a *flow-mediated vasodilation during reactive hyperemia*) (209). Migliacci e col. estudaram treze doentes em hemodiálise e verificaram que a função endotelial se encontrava comprometida (quando comparada com um grupo de controle), contudo não verificaram que a hemodiálise corrigisse essa alteração (210).

O sistema da coagulação conta-se entre os mecanismos do organismo humano cuja complexidade tem vindo a ser esclarecida. Sendo o sangue essencial à vida, o organismo é dotado de mecanismos capazes de, em múltiplas circunstâncias, estancar hemorragias, através da produção de coágulos (trombos), estruturas nas quais a fibrina desempenha um papel fundamental. No entanto, o organismo é também dotado de mecanismos capazes de desobstruir os vasos sanguíneos nos quais os coágulos se formaram, permitindo a adequada irrigação sanguínea do território em causa. Os coágulos de fibrina são frequentemente dissolvidos pela plasmina, uma serina-protease. Esta protease degrada a fibrina, levando ao aparecimento dos “produtos de degradação da fibrina”, frequentemente avaliados como fragmentos D da fibrina “*cross-linked*” (D-dímeros). A plasmina deriva do plasminogénio, por ação de enzimas, entre as quais se conta o ativador do plasminogénio tecidual (t-PA). O t-PA é considerado como um ativador fibrinolítico, uma vez que leva a que ocorra a fibrinólise. Enquanto medicamentos, os fibrinolíticos em geral, e o t-PA em particular, foram desenvolvidos para o tratamento do enfarte do miocárdio (211), mas mais tarde foram também utilizados no tratamento da embolia pulmonar (212) e do acidente vascular cerebral isquémico (213).

Uma vez que o t-PA é produzido primariamente e é efetuada a sua secreção para o sangue pelas células endoteliais vasculares, pode ser utilizado como marcador da função ou disfunção endotelial (214). A atividade do t-PA é regulada por inibidores do ativador do plasminogénio (PAIs), sendo que o PAI de origem endotelial (PAI-1) poderá ser o principal inibidor do t-PA, sendo que o PAI-1 é produzido por células endoteliais e possivelmente por outras células. Os valores elevados de PAI-1 associaram-se à doença cardiovascular no estudo *Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction* (PRIME) (215).

O t-PA tem sido utilizado no contexto da hemodiálise, designadamente para estabelecer um fluxo sanguíneo adequado em cateteres com trombose ou com fluxos diminuídos (216, 217). Hemmelgarn e col. mostraram que o uso de t-PA uma vez por semana, em substituição da heparina, nos cateteres de doentes em hemodiálise, levava a uma redução da incidência da disfunção de cateter e de bacteremia (218).

Speiser e col. estudaram os níveis de t-PA no decurso da hemodiálise e verificaram que ocorria uma elevação desse marcador (219). Os mesmos autores verificaram que o fenómeno em causa não se devia à administração de heparina (219). Tomura e col. encontraram valores elevados de t-PA em doentes em hemodiálise (220). Segarra e col. estudaram 200 doentes em hemodiálise, que compararam com 100 voluntários, tendo concluído que os níveis de t-PA, PAI-1, CRP e trombomodulina (um modulador da ação da trombina com ação anti-coagulante e de ativação da proteína C (221)) se encontravam elevados (222).

# OBJETIVOS

---





## Objetivos

Portugal enfrenta uma tendência de crescimento anual de DRCT superior à média dos países da OCDE. Por outro lado, apesar dos avanços técnicos no procedimento de hemodiálise e do apoio médico dado aos doentes nos últimos anos, a morbilidade e a mortalidade dos doentes em hemodiálise mantém-se elevada, sendo várias vezes superior à observada na população em geral. A doença renal crónica está associada ao desenvolvimento de anemia e de risco de doença cardiovascular. Como principal causa de morte nestes doentes, referem-se os eventos cardiovasculares. A idade avançada, um perfil de risco para doenças cardiovasculares e a *Diabetes mellitus*, frequentes nestes doentes, por si só, não explicam a frequência e a severidade dos eventos cardiovasculares observados. Para além disso, fatores diretamente associados à uremia podem ter um papel de relevo. É reconhecida a importância da associação de *stress* oxidativo e inflamação na origem do risco de eventos cardiovasculares nestes doentes.

No que respeita aos doentes portugueses com DRCT, existe relativamente pouca informação sobre os mecanismos que levam à morte destes doentes, sobre a sua associação com fatores de risco de eventos cardiovasculares, sobre as alterações induzidas pelo tipo de acesso vascular usado no tratamento de hemodiálise, e ainda sobre o grau da resposta à terapêutica com AEE. Dada a elevada prevalência desta doença em Portugal, pareceu pertinente realizar um trabalho nas condições epidemiológicas específicas deste país, no início do século XXI.

O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a mortalidade global de doentes Portugueses com DRCT sob terapêutica de hemodiálise e de AEE, relacionando-a com: i) o tipo de acesso vascular; ii) a dislipidemia; iii) a resposta inflamatória; iv) a anemia; v) o *stress* oxidativo; vi) a disfunção endotelial; vii) a resistência à terapêutica com AEE (este estudo é apresentado no *Artigo 1*).

Sendo este o objetivo principal, o presente trabalho inclui, ainda, um conjunto de dados adicionais, obtidos no mesmo tipo de contexto, que pretendem desenvolver o trabalho, tentando esclarecer alguns tópicos conexos, e que são apresentados em seguida.

O desenvolvimento de *stress* oxidativo está descrito para estes doentes, no entanto, a origem e o valor da resposta inflamatória é controverso, pois se pode resultar da ativação de células inflamatórias por contacto direto com as membranas de diálise, pode também ser determinado pelo tipo de acesso vascular escolhido – fístula arteriovenosa ou CVC – ou, ainda, pelo processo subjacente à resistência à terapêutica com AEE. O acesso vascular por CVC, por vezes utilizado como acesso permanente, tem sido associado, em alguns estudos, a risco trombótico, exacerbação do processo inflamatório e perturbações na função endotelial e no processo hemostático. As estatinas são fármacos amplamente utilizados na prática clínica. Para além do seu efeito na correção das dislipidemias, as estatinas possuem importantes efeitos pleiotrópicos. Considerando o elevado risco cardiovascular que os doentes em hemodiálise apresentam, seria importante avaliar os potenciais efeitos do uso destes fármacos nestes doentes, para além do seu impacto no perfil lipídico. Nesse sentido, estudou-se a associação entre o uso de estatinas e parâmetros inflamatórios, fibrinolíticos e de disfunção endotelial em doentes em hemodiálise, de acordo com o tipo de acesso vascular utilizado (este estudo é apresentado no *Artigo 2*).

Tendo em conta a atual importância dos AEE no tratamento dos doentes em hemodiálise, o objetivo do trabalho pretendeu contribuir para um melhor entendimento de um aspeto ainda incompletamente esclarecido, a relação entre resistência aos AEE e o índice de massa corporal (BMI). Vários estudos têm demonstrado uma associação paradoxalmente inversa entre o índice de massa corporal e a sobrevivência nos pacientes em HD (*“reverse epidemiology”*). Pretendeu-se estudar as alterações sistémicas associadas à resistência aos AEE e ao BMI, com particular atenção ao metabolismo do ferro e aos marcadores inflamatórios (este estudo é apresentado no *Artigo 3*).

Por outro lado, no presente trabalho incluem-se dados sobre a associação, em doentes em hemodiálise, dos valores de t-PA com variáveis clínicas e analíticas que têm sido relacionadas com a função endotelial, nomeadamente o perfil lipídico, incluindo a LDL oxidada, parâmetros inflamatórios tais como a IL-6, a CRP e a adiponectina, e ainda parâmetros hemostáticos, designadamente o PAI-1 e os D-dímeros, tendo como objetivo a elucidação da fisiopatologia da

inter-relação entre estes parâmetros nos doentes em hemodiálise (este estudo é apresentado no *Artigo 4*).

Alguns estudos têm indicado que os pacientes em HD apresentam uma atividade reduzida da PON1, uma enzima ligada ao colesterol HDL, o que poderia contribuir para a alta taxa de doença cardiovascular observada nestes pacientes. A forma como fatores genéticos e não genéticos influenciam a atividade da PON1 em doentes em hemodiálise não se encontra ainda totalmente elucidada. Tivemos como objetivo avaliar a influência de fatores genéticos (polimorfismos L55M e Q192R) e não genéticos sobre a atividade da PON1 num grupo de doentes em hemodiálise (este estudo é apresentado no *Artigo 5*).



# RESULTADOS

---



Artigo 1:

**“Risk Factors for Mortality in Hemodialysis Patients: Two-Year Follow-Up Study”**

*Autores:* Maria do Sameiro Faria, Sandra Ribeiro, Elísio Costa, Denisa Mendonça, Laetitia Teixeira, Petronila Rocha-Pereira, João Fernandes, Henrique Nascimento, Michaela Kohlova, Flávio Reis, Leonilde Amado, Elsa Bronze-da-Rocha, Vasco Miranda, Alexandre Quintanilha, Luís Belo, Alice Santos-Silva

*Revista:* Disease Markers 2013; 35: 791–798.





## Research Article

# Risk Factors for Mortality in Hemodialysis Patients: Two-Year Follow-Up Study

**Maria do Sameiro-Faria,<sup>1,2</sup> Sandra Ribeiro,<sup>3,4</sup> Elísio Costa,<sup>3,4</sup> Denisa Mendonça,<sup>1,5</sup> Laetitia Teixeira,<sup>1</sup> Petronila Rocha-Pereira,<sup>4,6</sup> João Fernandes,<sup>4,7</sup> Henrique Nascimento,<sup>3,4</sup> Michaela Kohlova,<sup>6</sup> Flávio Reis,<sup>6</sup> Leonilde Amado,<sup>2</sup> Elsa Bronze-da-Rocha,<sup>3,4</sup> Vasco Miranda,<sup>2</sup> Alexandre Quintanilha,<sup>1,4</sup> Luís Belo,<sup>3,4</sup> and Alice Santos-Silva<sup>3,4,8</sup>**

<sup>1</sup> Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>2</sup> Nephrocare Portugal, SA-Nephrocare Maia, Maia, Portugal

<sup>3</sup> Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>4</sup> Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>5</sup> Instituto de Saúde Pública, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>6</sup> Centro Investigação Ciências Saúde, Universidade Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>7</sup> IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>8</sup> Serviço de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal

Correspondence should be addressed to Alice Santos-Silva; [assilva@ff.up.pt](mailto:assilva@ff.up.pt)

Received 24 January 2013; Accepted 2 May 2013

Academic Editor: Sudhir Srivastava

Copyright © 2013 Maria do Sameiro-Faria et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background.** End-stage renal disease (ESRD) patients under hemodialysis (HD) have high mortality rate. Inflammation, dyslipidemia, disturbances in erythropoiesis, iron metabolism, endothelial function, and nutritional status have been reported in these patients. Our aim was to identify any significant association of death with these disturbances, by performing a two-year follow-up study. **Methods and Results.** A large set of data was obtained from 189 HD patients (55.0% male;  $66.4 \pm 13.9$  years old), including hematological data, lipid profile, iron metabolism, nutritional, inflammatory, and endothelial (dys)function markers, and dialysis adequacy. **Results.** 35 patients (18.5%) died along the follow-up period. Our data showed that the type of vascular access, C-reactive protein (CRP), and triglycerides (TG) are significant predictors of death. The risk of death was higher in patients using central venous catheter (CVC) (Hazard ratio [HR] = 3.03, 95% CI = 1.49–6.13), with higher CRP levels (fourth quartile), compared with those with lower levels (first quartile) (HR = 17.3, 95% CI = 2.40–124.9). Patients with higher TG levels (fourth quartile) presented a lower risk of death, compared with those with the lower TG levels (first quartile) (HR = 0.18, 95% CI = 0.05–0.58). **Conclusions.** The use of CVC, high CRP, and low TG values seem to be independent risk factors for mortality in HD patients.

## 1. Introduction

Patients with end-stage renal disease (ESRD) have a high mortality rate [1, 2] that far exceeds the mortality rate for the non-ESRD population [3]. In the past half-century, the widespread use of hemodialysis (HD) to prolong life of ESRD patients has been a remarkable achievement, preventing death from uremia in these patients. Nowadays this therapy has expanded widely and is being used by an increasing

elderly patient population, leading to significant economic consequences to patients and to healthcare systems.

Our present knowledge of the mechanisms leading to increased death in this context is incomplete. In the last years, this medical field has known significant technological and pharmacological improvements. Although some evidence may suggest that mortality rate among dialysis patients has decreased over the last few years, actually, patient's survival is still low. Cardiovascular disease (CVD) has been considered

the most common cause of death in these patients [4]. Cardiac arrest and congestive heart failure are more prominent causes of cardiovascular death than acute myocardial infarction in patients with uremia. A higher mortality rate within the first year after initiation of HD has been described (the period of highest risk for death extends to approximately 120 days after starting dialysis).

The high risk of cardiovascular morbidity and mortality in ESRD patients is associated with a high prevalence of classic cardiovascular risk factors (hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia, smoking, and advanced age). In addition, several uremia-related factors may also play an important role, namely, the presence of multiple comorbid conditions, fluid overload, hyperphosphoruria, high calcium-phosphorous product, anemia, left ventricular hypertrophy, inflammation, oxidative stress, endothelial dysfunction, insulin resistance, excess sympathetic tone, hyper-homocysteinemia, high levels of lipoprotein(a), and increased asymmetrical dimethylarginine [5–8]. Recent reports have highlighted the importance of noncardiovascular mortality in HD patients and that it has been underestimated [3].

Systemic inflammation is frequently present in ESRD patients, and the use of central venous catheter (CVC) has been associated with an enhanced inflammatory state [9].

The aim of the present study was to evaluate the global mortality in Portuguese ESRD patients under HD, by performing a follow-up study of two years, in order to identify any significant association of death with systemic parameters, including dialysis adequacy, nutritional status, hematological data, lipid profile, iron metabolism, and inflammatory and endothelial (dys)function markers, as well as the type of vascular access, presence of comorbidities, and with associated therapies. The parameters associated with mortality in this context may provide biomarkers to be used in the clinical setting.

## 2. Methods

**2.1. Patients.** This research protocol was approved by the Ethics Committee of Fresenius Medical Care, Portugal. All participants gave their written informed consent to participate in this study.

In this two-year follow-up study, starting from April 2009, 189 HD patients, from 3 dialysis clinics in the Northern region of Portugal, were included in the study. These patients were under HD for at least 90 days. At the start of the study, the patients were clinically evaluated and blood was collected for the analytical studies; afterwards, a clinical followup was performed during two years, in order to identify the cases of death, transplant, and transfer to peritoneal dialysis. Data regarding demographic characteristics, chronic kidney disease and medical history, dialysis, and medical prescriptions, as well as laboratory data, was also collected at the start of the study.

Diabetes was defined by the current guidelines [10] or by the use of insulin or oral hypoglycemic agents. Hypertension was defined by the current guidelines (blood

pressure > 130/85 mm Hg) [11] or by the use of antihypertensive medication. Therapy with recombinant human erythropoietin (rhEPO) and with intravenous iron was based on the current guidelines. The classification of ESRD patients as responders or nonresponders to rhEPO therapy was performed in accordance with the European Best Practice Guidelines [12]. Patients with autoimmune disease, malignancy, and acute or chronic infection were excluded.

A group of 25 healthy volunteers was selected as control, based on normal hematological and biochemical values, and no history of kidney or inflammatory diseases, in order to better define the changes occurring in HD patients. This group was matched, as far as possible, for age and gender with HD patients.

**2.2. Assays.** Blood samples were obtained immediately before the HD procedure, in the midweek dialysis day, and processed within 2 hours after collection. Blood was collected to tubes with (EDTA) and without anticoagulant, in order to obtain whole blood, plasma, buffy-coat, and serum. Aliquots were immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , whenever necessary, until assayed.

Erythrocyte count, hematocrit, hemoglobin concentration, and hematimetric indices (mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), and mean cell hemoglobin concentration (MCHC)) were measured by using an automatic blood cell counter (Sysmex K1000; Sysmex, Hamburg, Germany). Leukocyte differential counts were evaluated in Wright-stained blood films. Reticulocyte count was made by microscopic counting on blood smears after vital staining with new methylene blue (reticulocyte stain; Sigma, St. Louis, MO, USA). The reticulocyte production index (RPI) was calculated, as an appropriate way to measure the effective erythrocyte production, by correcting for both changes in hematocrit (degree of anemia) and for premature reticulocyte release from the bone marrow.

Serum albumin levels were measured using a colorimetric assay end-point method (Albumin Plus; Roche GmbH, Mannheim, Germany). Serum iron concentration was determined using a colorimetric method (Iron, Randox Laboratories Ltd., North Ireland, UK), whereas serum ferritin and serum transferrin were measured by immunoturbidimetry (Ferritin, Laboratories Ltd., North Ireland, UK; Transferrin, Laboratories Ltd., North Ireland, UK). Enzyme-linked immunosorbent assays were used for measurement of plasma soluble transferrin receptors (s-TfR) (Human sTfR immunoassay, R&D systems, MN, USA); transferrin saturation (TS) was calculated by the formula:  $\text{TS (\%)} = 70.9 \times \text{serum iron concentration (mg/dL)} / \text{serum transferrin concentration (mg/dL)}$ .

Plasma concentration of adiponectin, interleukin (IL)-6, tissue plasminogen activator (tPA), and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were evaluated by using standard commercial enzyme-linked immunoassays (adiponectin, IL-6 ELISA High-Sensitivity, tPA, and PAI-1, all from eBioscience). D-dimer and C-reactive protein (CRP) were evaluated by immunoturbidimetry, using commercially available kits (BCS XP system, Siemens, Germany; CRP (latex) High-Sensitivity, Roche Diagnostics, resp.).

The activity of paraoxonase 1 (PON1) was assessed spectrophotometrically and expressed in nmol of p-nitrophenol/mL/min. Briefly, PON1 activity was measured by adding serum to 1 mL Tris/HCl buffer (100 mmol/L, pH 8.0) containing 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub> and 5.5 mmol/L paraoxon (O,O-diethyl-O-p-nitrophenylphosphate, Sigma Chemical Co.). The rate of generation of p-nitrophenol was determined by reading the absorbance at 412 nm, 37°C, with the use of a continuously recording spectrophotometer (Beckman DU-68).

The evaluation of serum hepcidin concentration was performed by using an enzymatic immunoassay (Hepcidin-25, EIA Kit Extraction-Free, Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA, USA).

Serum lipids, lipoproteins, and apolipoprotein analysis were performed in an autoanalyser (Cobas Mira S, Roche, Basel, Switzerland) using commercially available kits.

Serum total cholesterol and triglycerides concentrations were performed by enzymatic colorimetric tests (cholesterol oxidase-phenol aminophenazone and glycerol-3-phosphate oxidase-phenol aminophenazone methods, Roche, resp.). High-density lipoprotein cholesterol (HDLc) and low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) levels were measured using enzymatic colorimetric tests, after selective separation of HDL and LDL fractions (Direct HDLCholesterol and Direct LDLCholesterol, Roche). Serum levels of apolipoprotein (Apo) A-I and Apo B were evaluated by immunoturbidimetric assays (uni-kit apolipoprotein A-I and B specific antisera, Roche). Serum Lp(a) was quantified by using an immunoturbidimetric method (Lp(a), Roche Diagnostics). Oxidized LDL (ox-LDL) was measured directly in plasma by using a two-site enzyme immunoassay (oxidized LDL ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden).

**2.3. Statistical Analysis.** Kolmogorov-Smirnov test was used to test for normality of the variable distributions. Patients were categorized according to their status at the end of the 2 years of followup: alive (group 1) or dead (group 2). Differences between groups were analyzed by using Student's *t*-test or Mann-Whitney test, according to the results obtained in the Kolmogorov-Smirnov test. Normally distributed variables are presented as mean  $\pm$  SD and those nonnormally distributed are presented as median (interquartile range). Proportions were compared between groups using chi-square tests.

Survival analysis taking competing risks into account was performed to analyze patient's survival. The event of interest was death and the competing risk event was renal transplantation. Patients transferred to peritoneal dialysis were excluded (given the small number involved ( $n = 2$ )). Estimates of cumulative incidence function were calculated. Regression models taking competing risks into account (Fine and Gray model based on subdistribution hazard model) were carried out, to analyze the effect of covariates in patient's survival. To decide which variables should be included in the final multivariable model, an exploratory analysis was performed by fitting models for each variable in turn, adjusting for age and previous time in HD. The final multivariable model included all of these candidate variables with *P* values <0.05. All analyses were performed with SPSS and R software

using the packages *cmprsk*, and significance level ( $\alpha$ ) was set at 0.05.

### 3. Results

**3.1. Patient's Demographic and Clinical Data.** We studied 189 ESRD patients under HD (104 male, 85 female; mean age: 66.4 years, SD 13.9 years, range 27.6–92.0 years). The patients were under therapeutic HD three times per week, for 3–5 hours, and were under HD for 2.13 (0.82–5.28) years, when they were included in this study. All patients used the high-flux polysulfone FX-class dialyzers (1.4–2.2 m<sup>2</sup>) of Fresenius (Bad Hamburg, Germany). Arteriovenous fistula (AVF) was used by 146 patients (77.2%), whereas 43 patients (22.8%) had a CVC. The main causes of renal failure in these patients were diabetes mellitus ( $n = 68$ ), followed by arterial hypertension ( $n = 25$ ), glomerulonephritis ( $n = 16$ ), polycystic renal disease ( $n = 12$ ), reflux nephropathy ( $n = 8$ ), obstructive uropathy ( $n = 4$ ), hereditary nephropathy ( $n = 3$ ), chronic interstitial nephritis ( $n = 2$ ), nephrolithiasis ( $n = 3$ ), other diseases ( $n = 7$ ), and uncertain etiology ( $n = 40$ ). Sixteen (8.5%) patients were classified as resistant to rhEPO therapy. A total number of 108 patients (63.9%) had arterial hypertension, 103 patients (54.5%) were under antihypertensive treatment, 75 (39.7%) were using statins, 127 (67.2%) were under intravenous iron therapy, 71 (39.0%) were under anti platelet therapy, and 8 (4.6%) were under oral hypocoagulation.

**3.2. Analytical Data.** The analytical results for the patients at starting of the follow-up study, and for the control group, are presented in Table 1. The hematological study showed that the HD patients experience a significant decrease in hemoglobin concentration, hematocrit, erythrocyte, platelets and lymphocyte counts, and a significant increase in MCV, as compared with the control; several significant changes were also observed in iron metabolism (an increase in transferrin saturation, sTfR, ferritin and hepcidin, and a decrease in iron and transferrin), in inflammatory markers (increase in adiponectin, IL-6, and CRP and a decrease in PON1), in the lipid profile (increase in oxLDL/LDL ratio and a decrease in total cholesterol, HDLc, LDLc, Apo A, Apo B and ox-LDL), in endothelial (dys)function markers (an increase in tPA, tPA/PAI-1 ratio and D-dimers, and a decrease in PAI-1); a significant increase in BMI, was also observed in patients, when compared with the control group.

**3.3. Outcome.** During the follow-up period (24 months), 35 patients died (18.5%) and 18 patients received a kidney transplant. Table 2 shows the values of the parameters that presented significant differences, when considering dead and alive patients at the end of the 2-year follow-up period. Statistically significant differences were found, concerning dialysis markers, nutritional status, hematological data, iron metabolism, inflammation, lipid profile, and endothelial function. The patients that died during the study period showed significantly lower values for calcium, calcium phosphorus product, creatinine, ultrafiltration volume, transferrin, transferrin saturation, triglycerides, VLDL, Apo A, BMI,

TABLE 1: Baseline values of the 189 ESRD patients under HD therapy.

	Controls ( <i>n</i> = 25)	HD patients ( <i>n</i> = 189)
Biochemical and dialysis markers		
URR, %	—	75.9 ± 6.56
KT/Ve	—	1.48 ± 0.31
Ultrafiltration volume, L	—	2.43 ± 0.94
Creatinine, mg/dL	—	8.14 ± 2.81
Potassium, mmol/L	—	5.40 (4.80–5.88)
Sodium, mmol/L	—	137 (135–139)
Phosphorus, mmol/L	—	4.48 (3.60–5.40)
Calcium, mg/dL	—	8.60 (8.10–9.10)
Calcium phosphorus product	—	37.58 (31.15–44.86)
Darbopoeitin, µg/kg/week	—	0.42 (0.20–0.75)
Hematological data		
Erythrocytes, ×10 <sup>12</sup> /L	4.9 ± 0.45	3.8 ± 0.53*
Hemoglobin, g/dL	14.9 ± 0.86	11.7 ± 1.44*
Hematocrit, %	44.3 ± 2.80	36.5 ± 4.59*
MCV, fL	88.1 ± 11.72	95.8 ± 6.01*
MCHC, g/dL	33.8 ± 0.46	32.3 ± 1.19
RDW, %	15.1 ± 0.54	15.1 ± 1.91
Platelets, ×10 <sup>9</sup> /L	257.1 ± 58.85	184.1 ± 55.4*
Leukocytes, ×10 <sup>9</sup> /L	6.7 ± 1.66	6.4 ± 2.0
Neutrophils, ×10 <sup>9</sup> /L	4.3 ± 1.48	4.0 ± 1.49
Lymphocytes, ×10 <sup>9</sup> /L	2.0 ± 0.37	1.7 ± 0.70*
Neutrophil/lymphocyte ratio	2.2 ± 0.78	2.7 ± 1.51
Iron metabolism markers		
Transferrin, mg/dL	310.8 ± 44.04	184.4 ± 35.8*
Transferrin saturation, %	12.7 ± 4.73	15.1 (11.8–19.3)*
Iron, µg/dL	55.0 ± 17.97	38.0 (30.0–53.5)*
sTfR, nmol/L	13.6 ± 3.72	23.3 ± 11.9*
Ferritin, ng/mL	102.5 ± 60.61	400.8 ± 152.9*
Hepcidin-25, ng/mL	218.4 (124.5–318.6)	1599.1 (863.6–2409.0)*
Inflammatory markers		
IL-6, pg/mL	0.43 (0.28–0.61)	2.29 (1.40–4.26)*
CRP, mg/dL	0.75 (0.44–1.91)	5.13 (2.33–13.05)*
PON1, nmol p-nitrofenol/mL/min	466.8 (383.8–535.8)	361.1 (323.3–463.7)*
Adiponectin, mg/L	4.93 ± 2.30	9.27 ± 4.71*
Lipid profile		
Total cholesterol, mg/dL	202.2 ± 26.25	154.2 ± 43.5*
Triglycerides, mg/dL	103.0 (86.5–154.0)	117.0 (90.5–176.5)
HDLc, mg/dL	48.7 ± 12.94	42.2 ± 13.5*
LDLc, mg/dL	105.9 ± 25.29	73.4 ± 29.3*
VLDL, mg/dL	20.6 (17.3–30.8)	23.4 (18.0–35.4)
Lp(a), mg/dL	27.7 (17.3–69.9)	45.4 (25.6–89.0)
Apo A1, mg/dL	145.2 ± 26.91	122.7 ± 30.4*
Apo B, mg/dL	91.4 ± 14.49	72.4 ± 21.7*
Ox-LDL, U/L	40.8 ± 10.97	33.7 (27.7–40.5)*
OxLDL/LDL ratio, U/mg	0.040 ± 0.013	0.052 ± 0.018*

TABLE 1: Continued.

	Controls ( <i>n</i> = 25)	HD patients ( <i>n</i> = 189)
Endotelial (dys) function markers		
tPA, ng/mL	3.93 (2.95–5.93)	5.35 (3.72–8.18)*
PAI-1, ng/mL	31.0 (15.3–59.2)	18.7 (12.1–32.4)*
tPA/PAI-1 ratio	0.16 (0.09–0.20)	0.29 (0.18–0.39)*
D-dimers, ng/mL	0.25 (0.18–0.34)	0.71 (0.38–1.56)*
Nutritional markers		
BMI, Kg/m <sup>2</sup>	22.2 ± 2.26	25.9 ± 4.63*
Albumin, g/dL	—	3.9 ± 0.38

\**P* < 0.05 versus controls. Data are presented as median and interquartile range (parameters with nonnormal distribution), mean and standard deviation (parameters with normal distribution), or number and respective percentage. URR: urea reduction ratio; MCV: mean cell volume; MCHC: mean cell hemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width; sTfR: soluble transferrin receptor; IL-6: interleukin-6; CRP: C-reactive protein; PON 1: paraoxonase 1; HDLc: high-density lipoprotein cholesterol; LDLc: low-density lipoprotein cholesterol; VLDL: very low-density lipoprotein; Lp(a): lipoprotein (a); Apo A: apolipoprotein A; Apo B: apolipoprotein B; Ox-LDL: oxidized LDL; PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1; tPA: tissue plasminogen activator.

TABLE 2: Baseline values in ESRD patients under HD therapy for variables in which significant differences were found when the patients were divided in two groups (alive or dead 2 years later).

	Alive at followup (135 patients)	Dead during followup (35 patients)	<i>P</i>
Biochemical and dialysis markers			
Calcium, mg/dL	8.70 (8.20–9.10)	8.40 (8.00–8.90)	0.046
Calcium phosphorus product	38.6 (31.4–46.5)	35.8 (29.2–39.2)	0.025
Creatinine, mg/dL	8.63 ± 2.86	6.45 ± 2.10	<0.001
Ultrafiltration volume, L	2.47 ± 0.85	2.29 ± 1.22	0.037
Darbopoeitin- $\alpha$ , $\mu$ g/kg/week	0.40 (0.77–0.66)	0.87 (0.36–1.47)	<0.001
Hematological data			
RDW, %	14.5 ± 1.43	16.9 ± 2.32	<0.001
Iron metabolism markers			
Transferrin, mg/dL	187.6 ± 34.1	172.5 ± 41.6	0.050
Transferrin saturation, %	15.8 (12.3–19.7)	13.5 (9.67–19.1)	0.032
Inflammatory markers			
IL-6, pg/mL	2.21 (1.37–3.60)	4.27 (2.10–6.57)	<0.001
CRP, mg/dL	3.93 (2.09–9.73)	14.9 (5.15–30.4)	<0.001
Lipid profile			
Triglyceride, mg/dL	120.0 (95.0–180.0)	103.0 (82.0–125.0)	0.015
VLDL, mg/dL	24.0 (18.8–36.0)	20.6 (16.4–25.0)	0.021
Apo A1, mg/dL	124.3 ± 29.7	109.4 ± 26.2	0.014
Endotelial (dys) function markers			
PAI-1, ng/mL	17.9 (12.3–30.4)	27.4 (14.2–46.9)	0.034
D-dimers, ng/mL	0.70 (0.40–1.29)	1.47 (0.63–2.28)	0.005
Nutritional markers			
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	25.4 (23.0–28.5)	23.3 (20.5–27.3)	0.008
Albumin, g/dL	4.00 (3.78–4.20)	3.70 (3.37–3.94)	<0.001

Data are presented as means and standard deviation or median (interquartile range). RDW: red blood cells distribution width; IL-6: interleukin-6; CRP: C-reactive protein; VLDL: very low-density lipoprotein; Apo A: apolipoprotein A; PAI-1: plasminogen activator inhibitor 1.

and albumin; significantly higher values were found for RDW, IL-6, CRP, PAI-1, and tPA. Moreover, dead patients required significantly higher rhEPO doses to achieve the target hemoglobin levels and presented a significantly higher percentage of patients using CVC (38% versus 15%, *P* < 0.001) as the vascular access for the HD procedure.

Figure 1 summarizes the cumulative incidence curves estimating all possible outcomes, taking competing risks into

account. The probability of death by 6, 12, 18, and 24 months after starting the study was 0.053, 0.106, 0.154, and 0.176, respectively.

Survival regression models, all adjusted for age and previous time in HD, are presented in Table 3. This analysis showed that the type of vascular access (the use of CVC), CRP, and tryglicerides are significant predictors of the event of interest, death. Indeed, the risk of death was higher for

TABLE 3: Survival regression models for ESRD patient's mortality.

	Model 1*			Final model**		
	Adjusted hazard ratio	95% CI	P	Adjusted hazard ratio	95% CI	P
Type of vascular access						
CVC versus AVF	2.65	1.33–5.30	0.006	3.03	1.49–6.13	0.002
C-reactive protein						
Q2 versus Q1	6.01	0.79–46.7	0.083	4.91	0.62–38.6	0.130
Q3 versus Q1	8.04	1.04–62.2	0.046	8.31	1.09–63.1	0.041
Q4 versus Q1	18.1	2.51–130.0	0.004	17.3	2.40–124.9	0.005
Triglycerides						
Q2 versus Q1	0.46	0.20–1.02	0.057	0.48	0.19–1.21	0.120
Q3 versus Q1	0.48	0.20–1.13	0.093	0.48	0.17–1.34	0.160
Q4 versus Q1	0.22	0.07–0.75	0.015	0.18	0.05–0.58	0.004

\*Model 1: hazard ratio adjusted for age and previous time on HD; \*\*Final model: hazard ratio adjusted for all variable in the model. CVC: central venous catheter; AVF: arteriovenous fistula; Q: quartile; CI: confidence interval.

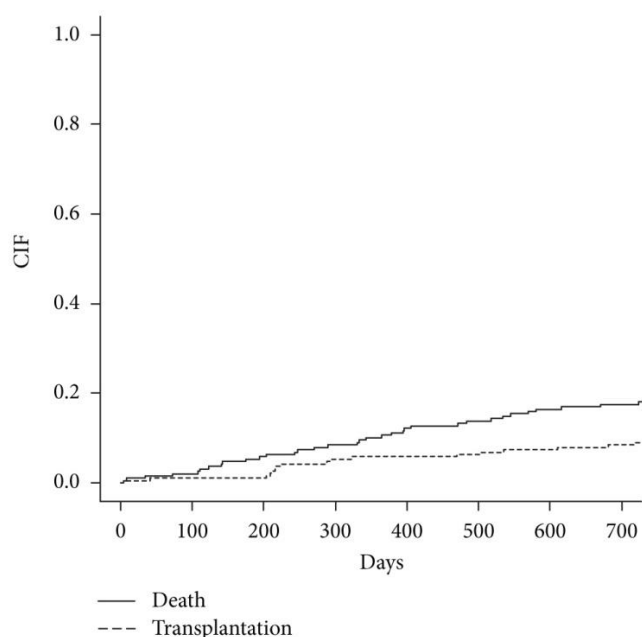


FIGURE 1: Cumulative incidence curves for all possible events (death as event of interest and transplantation as competing risk) for ESRD patients.

CVC (hazard ratio (HR) = 3.03, 95% CI = 1.49–6.13) and for patients with higher levels of CRP (4th quartile), as compared with the patients with lower level (1st quartile) (HR = 17.3, 95% CI = 2.40–124.9) (Table 3). Patients with tryglicerides levels in the 4th quartile had a lower risk of death, as compared with those patients in the 1st quartile (HR = 0.18, 95% CI = 0.05–0.58).

#### 4. Discussion

In the present study, 189 ESRD patients under HD therapy were studied at the start of the study and followed for 2 years, in order to identify parameters that could be associated with mortality and, therefore, to provide biomarkers of risk.

The mortality rate in HD remains high [3, 13], in spite of the considerable improvements in medical and technical

support to these patients in the last years. CVD events are the main causes of mortality in ESRD patients [4]. However, it has been argued that noncardiovascular causes of death seem to be increasing to the same extent as cardiovascular mortality in ESRD patients [3]. Shastri et al. studied the patterns of death in a large cohort of HD patients and showed that sudden cardiac death accounted for 22% of the fatal events, whereas nonsudden cardiac death and noncardiac death accounted for 17% and 61%, respectively [14].

In our study, during the follow-up period, 35 patients died (18.5%) and 18 patients received a kidney transplant. Considering dead and living patients at the end of the 2-year follow-up period, we found that several variables were significantly different for the two groups of patients. We found that the patients who died during the follow period of the study, as compared to living patients, had lower HD efficacy, as showed by lower values of calcium, calcium phosphorus product, creatinine, and ultrafiltration volume; higher disturbances in iron metabolism and erythropoiesis, as shown by lower values of transferrin and transferrin saturation and higher values of RDW; a poor nutritional status, as reflected by the lower values of triglycerides, VLDL, Apo A, BMI, and albumin; a higher inflammatory condition, as shown by the higher values of IL-6 and CRP; endothelial and hemostatic disturbances, as suggested by the higher values of PAI-1 and D-dimers; and the development of resistance to rhEPO therapy, as they needed higher rhEPO doses to achieve hemoglobin concentrations within the target range; a higher percentage of them used CVC for vascular access. After performing a multivariate analysis, we observed that the use of CVC as the vascular access for the HD procedure, high CRP levels, and low triglycerides levels were independently associated with mortality.

The present work, showing an association between mortality in ESRD patients under HD treatment and both the type of vascular access (CVC) and CRP, shows that inflammation plays an important role in the mortality of these patients [15] and that their values can be used as predictors of death. Whether inflammation has any significant role in the physiopathology of ESRD, leading to death, or is merely a risk marker remains to be established. Zimmermann et al.,

studying 280 HD patients, showed CRP as an independent predictor of both overall death and cardiovascular death [15], which is in agreement with our findings.

In a previous report [9], we showed that ESRD patients with a CVC had lower levels of hemoglobin and albumin and higher levels of CRP, IL-6, D-dimers, and tPA, when compared to ESRD patients using AVF [5]. This association between CVC use and the enhancement of the inflammatory process and endothelial dysfunction could justify the high mortality rate found in ESRD patients using CVC. Several other reports [16, 17] have shown an association between the type of vascular access and mortality in HD patients.

Low values for plasma triglycerides were also associated with mortality in this study. This finding must be seen in the context of a significant importance of malnutrition in this type of patients [18]. Owen et al. showed serum albumin concentration as a powerful predictor of death in a cohort of 13, 473 HD patients [18]. In our study, albumin presented lower values in patients that died during followup; however, the survival regression models did not show albumin as an independent risk factor. The low levels of triglycerides might reflect a “malnutrition-inflammation complex syndrome” [19] or, more probably, a hemodialysis-catabolic state, associated with increased mortality.

Most of the changes (Table 1) observed in the characterization of HD patients are in accordance with the literature. HD patients presented with anemia, as shown by a decreased hemoglobin concentration, hematocrit, and erythrocyte count. They also presented a decrease in platelet and lymphocyte counts. The lymphocytopenia seems to result, at least in part, from a decrease in total circulating CD3+ T-lymphocytes and affects both the CD4+ and the CD8+ T-cell subsets [20]. The presence of inflammatory features (increased levels of IL-6 and CRP and decreased PON1 activity) were consistent with findings reported in HD patients [21–23]; however, the causes for the inflammatory response are not well clarified. Indeed, there are several potential sources, including bacterial contamination of the dialyser, incompatibility with the dialyser membrane, and the vascular access. It is known that some inflammatory players, for example, hepcidin, have an important impact in iron metabolism, reducing the mobilization and absorption of iron for erythropoiesis [24], leading, therefore, to an iron depleted erythropoiesis. In accordance with this, we found an increase in sTfR, ferritin, and transferrin saturation and a decrease in transferrin and in iron serum levels. IL-6, which is significantly increased in HD patients (Table 1), is known to strongly induce hepcidin mRNA expression [25, 26]. Thus, the high levels of hepcidin found in HD patient are explained by the underlying chronic inflammation. Recent studies have reported that higher body mass index (BMI) plays a protective role in HD patients [27–29]. Actually, the increased BMI in our HD patients was associated with higher adiponectin serum levels. Adiponectin is an adipokine that exerts a variety of anti-inflammatory activities, interfering with macrophage function by inhibiting phagocytosis, the production of IL-6 and TNF $\alpha$ , T-cell function, and by promoting the release of IL-10 and IL-1 receptor antagonists [30, 31]. The increase in adiponectin suggests that the adipose

tissue in HD patients may influence or modulate the inflammatory response. Several changes in the lipid profile were also found, namely, a decrease in total cholesterol, HDLc, LDLc, ApoA, ApoB, and Ox-LDL. In spite of the decrease in Ox-LDL, a higher ox-LDL/LDL ratio was found, showing a higher proportion of oxidized LDL particles in HD patients. It is known that ox-LDLs present important proinflammatory and procoagulant properties [32], and, therefore, it may further contribute to inflammatory changes. Endothelial function was also disturbed, as shown by the increase in D-dimers and tPA/PAI-1 ratio. It is uncertain if the higher values of fibrin fragment D-dimers in HD patients result from a higher activation of coagulation and/or of fibrinolysis, though the higher tPA values and tPA/PAI-1 ratio suggest an increase in fibrinolysis and a disturbance in endothelial function.

This study presented some limitations, namely, the number of patients included in this study and the follow-up period that were relatively limited.

In conclusion, our study showed that the type of vascular access for HD procedure, inflammation, and the nutritional status of the patients are important factors for the survival of these patients and that the use of CVC, CRP, and TG values may provide good biomarkers of risk in ESRD patients under HD.

## Acknowledgments

This study was supported by “Fundação para a Ciência e Tecnologia” (FCT: PIC/IC/83221/2007) and cofinanced by FEDER (FCOMP-01-0124-FEDER-008468).

## References

- [1] W. M. Vollmer, P. W. Wahl, and C. R. Blagg, “Survival with dialysis and transplantation in patients with end-stage renal disease,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 308, no. 26, pp. 1553–1558, 1983.
- [2] J. P. Held, F. Brunner, M. Odaka, J. R. Garcia, F. K. Port, and D. S. Gaylin, “Five-year survival for end-stage renal disease patients in the United States, Europe, and Japan, 1982 to 1987,” *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 15, no. 5, pp. 451–457, 1990.
- [3] K. J. Jager, B. Lindholm, D. Goldsmith et al., “Cardiovascular and non-cardiovascular mortality in dialysis patients: where is the link?” *Kidney International Supplements*, vol. 1, pp. 21–23, 2011.
- [4] R. N. Foley, P. S. Parfrey, and M. J. Sarnak, “Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease,” *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 32, no. 5, supplement 3, pp. S112–S119, 1998.
- [5] M. J. Sarnak, A. S. Levey, A. C. Schoolwerth et al., “Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention,” *Circulation*, vol. 108, no. 17, pp. 2154–2169, 2003.
- [6] A. J. Collins, “Cardiovascular mortality in end-stage renal disease,” *American Journal of the Medical Sciences*, vol. 325, no. 4, pp. 163–167, 2003.

- [7] P. Stenvinkel, J. J. Carrero, J. Axelsson, B. Lindholm, O. Heimbürger, and Z. Massy, "Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle?" *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3, no. 2, pp. 505–521, 2008.
- [8] J. Kendrick and M. B. Chonchol, "Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease," *Nature Clinical Practice Nephrology*, vol. 4, no. 12, pp. 672–681, 2008.
- [9] E. Costa, S. Rocha, P. Rocha-Pereira et al., "Cross-talk between inflammation, coagulation/fibrinolysis and vascular access in hemodialysis patients," *Journal of Vascular Access*, vol. 9, no. 4, pp. 248–253, 2008.
- [10] American Diabetes Association, "Standards of medical care in diabetes-2009," *Diabetes Care*, vol. 32, pp. S13–S61, 2009.
- [11] JNC 6. National High Blood Pressure Education Program, "The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure," *Archives of Internal Medicine*, vol. 157, no. 21, pp. 2413–2446, 1997.
- [12] F. Locatelli, P. Aljama, P. Bárány et al., "Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 19, supplement 2, pp. 1–47, 2004.
- [13] B. A. Cooper, P. Branley, L. Bulfone et al., "A randomized, controlled trial of early versus late initiation of dialysis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 7, pp. 609–619, 2010.
- [14] S. Shastri, N. Tangri, H. Tighiouart et al., "Predictors of sudden cardiac death: a competing risk approach in the hemodialysis study," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 7, no. 1, pp. 123–130, 2012.
- [15] J. Zimmermann, S. Herrlinger, A. Pruy, T. Metzger, and C. Wanner, "Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients," *Kidney International*, vol. 55, no. 2, pp. 648–658, 1999.
- [16] R. K. Dhingra, E. W. Young, T. E. Hulbert-Shearon, S. F. Leavey, and F. K. Port, "Type of vascular access and mortality in U.S. hemodialysis patients," *Kidney International*, vol. 60, no. 4, pp. 1443–1451, 2001.
- [17] S. Pastan, J. M. Soucie, and W. M. McClellan, "Vascular access and increased risk of death among hemodialysis patients," *Kidney International*, vol. 62, no. 2, pp. 620–626, 2002.
- [18] W. F. Owen Jr., N. L. Lew, Y. Liu, E. G. Lowrie, and J. M. Lazarus, "The urea reduction ratio and serum albumin concentration as predictors of mortality in patients undergoing hemodialysis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 329, no. 14, pp. 1001–1006, 1993.
- [19] K. Kalantar-Zadeh, R. D. Kilpatrick, N. Kuwae et al., "Revisiting mortality predictability of serum albumin in the dialysis population: time dependency, longitudinal changes and population-attributable fraction," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 20, no. 9, pp. 1880–1888, 2005.
- [20] E. Costa, M. Lima, J. M. Alves et al., "Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 28, no. 3, pp. 268–275, 2008.
- [21] E. Costa, B. J. G. Pereira, P. Rocha-Pereira et al., "Role of prohepcidin, inflammatory markers and iron status in resistance to rhEPO therapy in hemodialysis patients," *American Journal of Nephrology*, vol. 28, no. 4, pp. 677–683, 2008.
- [22] J. Bazeley, B. Bieber, Y. Li et al., "C-reactive protein and prediction of 1-year mortality in prevalent hemodialysis patients," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 6, no. 10, pp. 2452–2461, 2011.
- [23] C. Libetta, V. Sepe, P. Esposito, F. Galli, and A. Dal Canton, "Oxidative stress and inflammation: implications in uremia and hemodialysis," *Clinical Biochemistry*, vol. 44, no. 14–15, pp. 1189–1198, 2011.
- [24] M. L. V. Jacober, R. L. Mamoni, C. S. P. Lima, B. L. Dos Anjos, and H. Z. W. Grotto, "Anaemia in patients with cancer: role of inflammatory activity on iron metabolism and severity of anaemia," *Medical Oncology*, vol. 24, no. 3, pp. 323–329, 2007.
- [25] R. E. Fleming and W. S. Sly, "Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 15, pp. 8160–8162, 2001.
- [26] D. M. Wrighting and N. C. Andrews, "Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3," *Blood*, vol. 108, no. 9, pp. 3204–3209, 2006.
- [27] R. M. - Tanner, T. M. Brown, and P. Muntner, "Epidemiology of obesity, the metabolic syndrome, and chronic kidney disease," *Current Hypertension Reports*, vol. 14, pp. 152–159, 2012.
- [28] K. Kalantar-Zadeh, K. C. Abbott, A. K. Salahudeen, R. D. Kilpatrick, and T. B. Horwich, "Survival advantages of obesity in dialysis patients," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, no. 3, pp. 543–554, 2005.
- [29] R. G. Kalaitzidis and K. C. Siamopoulos, "The role of obesity in kidney disease: recent findings and potential mechanisms," *International Urology and Nephrology*, vol. 43, no. 3, pp. 771–784, 2011.
- [30] G. Fantuzzi, "Adipose tissue, adipokines, and inflammation," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 115, no. 5, pp. 911–920, 2005.
- [31] G. Fantuzzi, "Adiponectin and inflammation: consensus and controversy," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 121, no. 2, pp. 326–330, 2008.
- [32] A. N. N. Mertens and P. Holvoet, "Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis," *FASEB Journal*, vol. 15, no. 12, pp. 2073–2084, 2001.



**Artigo 2:**

**“Vascular access versus the effect of statins on inflammation and fibrinolysis in renal dialysis patients”**

*Autores:* Maria do Sameiro Faria, Sandra Ribeiro, Petronila Rocha-Pereira, Vasco Miranda, Alexandre Quintanilha, Flávio Reis, Elísio Costa, Luís Belo, Alice Santos-Silva

*Revista:* Journal of Vascular Access 2013;14 (4): 335-341.



# Vascular access versus the effect of statins on inflammation and fibrinolysis in renal dialysis patients

Maria do Sameiro Faria<sup>1,2</sup>, Sandra Ribeiro<sup>3,4</sup>, Petronila Rocha-Pereira<sup>4,5</sup>, Vasco Miranda<sup>1</sup>, Alexandre Quintanilha<sup>2,4</sup>, Flávio Reis<sup>6</sup>, Elísio Costa<sup>3,4</sup>, Luís Belo<sup>3,4</sup>, Alice Santos-Silva<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> FMC, Dinefro – Diálises e Nefrologia, SA – Portugal

<sup>2</sup> Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Porto - Portugal

<sup>3</sup> Faculdade Farmácia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Porto, Porto - Portugal

<sup>4</sup> Instituto Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto, Porto - Portugal

<sup>5</sup> Centro Investigação Ciências Saúde (CICS), Universidade Beira Interior, Covilhã - Portugal

<sup>6</sup> Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra - Portugal

## ABSTRACT

**Purpose:** The aim of this work was to assess the effect of statin therapy on inflammatory and fibrinolytic/endothelial (dys)function markers in end-stage renal disease (ESRD) patients under hemodialysis (HD), according to the type of vascular access.

**Methods:** This transversal study includes 191 ESRD patients under regular HD, divided into four groups according to vascular access and statin therapy: 87 patients with arteriovenous fistula (AVF) and no statins (AVF-NS), 61 with AVF and statins (AVF-S), 27 with central venous dialysis catheter (CVC) and no statins (CVC-NS) and 16 with CVC and statins (CVC-S). The basic lipid profile and fibrinolytic/endothelial cell function markers were assessed.

**Results:** Patients with CVC presented significantly higher levels of D-dimers compared with AVF groups. CVC-NS patients also presented the highest IL-6 values, which were significantly higher than those presented by CVC-S patients. AVF-S patients presented significantly higher t-PA and PAI-1 values and lower adiponectin levels compared with AVF-NS.

**Conclusions:** Our results demonstrate that patients with CVC, particularly those not under statin therapy, present a higher production and turnover of fibrin. We also found that statin therapy decreases inflammation in CVC patients but is associated with a reduction of adiponectin and increased endothelial function marker levels in AVF patients.

**Key words:** Chronic renal failure, Fibrinolytic activity, Statin therapy, Vascular access

Accepted: November 21, 2012

## INTRODUCTION

Chronic inflammation is a common feature among dialysis patients (1-4) and is associated with atherosclerotic cardiovascular disease (CVD). The inflammatory process in chronic kidney disease (CKD) patients may favor cardiovascular events, justifying at least in part the high morbidity and mortality observed in hemodialysis (HD) patients (5, 6). In a previous work from our group, we found an interesting cross-talk between hemostasis and increased inflammatory markers in HD patients (7), which corroborates the close relationship between inflammation, endothelial dysfunction and hemostatic disturbances (8).

A functional vascular access is required for a successful HD procedure. The lack of major advances in the field of HD vascular access accounts for the fact that vascular

access dysfunction is still one of the most important causes of morbidity in the HD population (9). Access-related problems are responsible for 50% of the hospitalizations of HD patients (10).

There are three main forms of HD vascular access: arteriovenous fistula (AVF), polytetrafluoroethylene (PTFE) graft, and central venous catheter (CVC). Each of these forms has its own specific problems. AVF is the first choice for vascular access in patients under chronic HD, because of its relative low risk of infection and thrombosis. However, this type of vascular access has two major complications: initial failure to mature (primary non-functional) and subsequent venous stenosis, followed by thrombosis (11). PTFE graft is relatively easy to place and ready to use; however, extremely high rates of stenosis, thrombosis, and infection are reported for this vascular access (12). CVC is the least desirable method of HD

access. The type of insertion and the management of CVC may lead to several complications, namely, infections and thrombosis (13).

HD patients appear to present a disturbance in fibrinolysis and/or endothelial function. However, the studies of different fibrinolysis markers in HD patients have yielded conflicting results (14). The type of vascular access may be of particular importance on analyzing inflammatory and fibrinolytic parameters (7, 15, 16). A previous work from our group found increased levels of D-dimer, tissue plasminogen activator (tPA) and inflammatory markers in HD patients using CVC, which led us to propose a relationship between the type of vascular access used in the HD procedure, and the risk of thrombogenesis (7).

The type of vascular access and other factors, namely statin therapy, might influence inflammation and endothelial function in HD patients. Besides the lipid lowering effect, some pleiotropic effects have been attributed to statins, namely anti-inflammatory properties (17-19). Several studies have assessed the effect of statins on chronic inflammation in these patients, showing that statins can improve the chronic inflammatory status in HD patients (20). However, other studies revealed that statins failed to reduce cardiovascular events and are not associated with prolonged vascular access survival, despite their beneficial effects on endothelial function and inflammation (17, 21). More high-quality randomized clinical trials are required to confirm this finding.

This work aims to assess the effect of statin therapy on inflammatory and fibrinolytic/endothelial (dys)function markers in HD patients, according to the type of vascular access.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

This transversal study includes 191 Portuguese CKD patients under HD and rhEPO (median: 0.42 IQ: 0.20 - 0.75 microg/Kg/week) therapies. The intravenous iron supplementation used in patients was based on the "European Best Practice Guidelines for the management of anemia in patients under hemodialysis and rhEPO therapies" (22). Moreover, 77 patients (40.7%) are under statin therapy, where 41 patients (53.3%) receive simvastatin. Other medications: antihypertensive agents - 99 patients (56.6%), antiplatelet agents - 72 patients (39.1%), oral hypocoagulants - eight patients (4.5%). All participants gave their informed consent to participate in this study that was previously approved by the Hemodialysis Clinics Ethics Committee.

Patients with autoimmune disease, malignancy, and acute or chronic infection were excluded. Moreover, only patients who were under HD therapy more than

six months, and under statin therapy more than three months, were included in this study.

CKD patients were under therapeutic HD three times per week, for 3-5 h, for a median of 2.11 (0.85-5.19) years. All patients used the Fresenius high-flux polysulfone FX-class dialyzers. Dialysis urea clearance was expressed as KT/Ve. The main causes of renal failure in this population were as follows: diabetic nephropathy (n=69), hypertensive nephrosclerosis (n=22), nephritic syndrome (n=10), polycystic kidney disease (n=8), obstructive diseases (n=7), hereditary nephropathy (n=3), chronic interstitial nephritis (n=2), benign prostate hypertrophy (n=1), systemic lupus erythematosus (n=1), other diseases (n=7) and of uncertain etiology (n=61).

### Assays

Blood samples were obtained immediately before HD procedure and processed within 2 h of collection. Blood was collected to EDTA containing tubes and to tubes without anticoagulant, in order to obtain plasma and serum, respectively. Aliquots were immediately stored at -80°C until assayed.

Serum lipids and lipoprotein analysis were performed in an auto-analyzer (Cobas Mira S, Roche), using commercially available kits. Serum total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) concentrations were determined by enzymatic colorimetric tests (CHOD-PAP and GPO-PAP methods, Roche, respectively). High-density lipoprotein cholesterol (HDLc), low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) and very low-density lipoprotein levels were measured using enzymatic colorimetric tests, after selective separation of HDL and LDL fractions (Direct HDLCholesterol and Direct LDLCholesterol, Roche). Apolipoprotein (Apo) A-I and Apo B levels in serum were assessed by immunoturbidimetric assays (uni-kit apolipoprotein A-I and B specific antisera, Roche). Serum lipoprotein (a) (Lp[a]) was quantified by using an immunoturbidimetric method (Lp[a] Roche Diagnostics).

Plasma concentrations of oxidized LDL (Ox-LDL), adiponectin, interleukin-6 (IL-6), tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) were assessed by using standard commercial enzyme-linked immunoassays (Oxidised LDL ELISA, Mercodia; adiponectin, IL-6 ELISA High-Sensitivity, t-PA, PAI-1, all from eBioscience). D-dimer and C-reactive protein (CRP) were assessed by immunoturbidimetry using commercially available kits (BCS XP system, Siemens; CRP [latex] High-Sensitivity, Roche Diagnostics).

### Data analysis

For statistical analysis, we used the Statistical Package for Social Sciences (SPSS), version 19.0 (IBM, Armonk, NY, USA). The distributions of continuous variables were

analyzed using Kolmogorov-Smirnov tests to assess significant departures from normality. The variables that were normally distributed are presented as mean±SD and those non-normally distributed are presented as median (interquartile range).

Inter-group comparisons were performed using one-way ANOVA supplemented with Tukey's HSD post-hoc test (after log transformation, whenever necessary). Adjustment of statistical differences for confounding factors was performed using analysis of covariance (ANCOVA). The strength of the association between the variables was estimated by Pearson correlation coefficient, after log transformation of the variables (whenever necessary). Statistical significance was accepted at P less than 0.05.

## RESULTS

Our study population has 191 Portuguese CKD patients (105 men and 86 women; mean age 66.1 years, SD 14.0). In 43 patients (22.5%) the vascular access used for the HD procedure was CVC, and in 148 (77.5%) it was AVF. Patients were divided into four groups, according to vascular access for HD and statin therapy: 87 patients with AVF and no statins (AVF-NS); 61 with AVF and statins (AVF-S); 27 with CVC and no statins (CVC-NS), and 16 with CVC and statins (CVC-S).

Table I shows the clinical characteristics of CKD patients, according to the vascular access used in the HD procedure and statin therapy. Within AVF and CVC groups (with and without statins), patients were matched for age, sex, darbepoetin-alfa dose and time on dialysis. Patients in the AVF-S group presented a significantly higher body mass index (BMI) as compared with AVF-NS. CVC-S and CVC-NS groups presented similar BMI values.

The inflammatory and fibrinolytic markers, and lipid profile of the participants in the study, according to vascular access in HD and statin therapy, are presented in Table II, and in Figure 1 and Figure 2.

Patients with CVC-NS presented significantly higher levels of D-dimers, as compared with AVF groups (Fig. 1). A higher Ox-LDL/LDL ratio was also observed in CVC-NS and CVC-S patients (Tab. II), but statistically significant differences were only attained for groups without statin therapy (CVC-NS vs AVF-NS). CVC-NS patients also presented the highest IL-6 values, which were significantly higher than those presented by CVC-S patients (Fig. 2).

AVF-S patients presented significantly higher t-PA, PAI-1 and lipoprotein (a) values and lower adiponectin levels, as compared with AVF-NS (Tab. II); after adjustment for BMI, these results remained statistically significant between groups (Tab. II). Comparing the CVC-NS group with the CVC-S group, the latter also presented higher PAI-1 and lower adiponectin levels, although without statistical significance (Tab. II).

In the AVF-S group, tPA values correlated significantly and positively with the levels of D-dimers (n=61, r=0.298, P=0.022), but these variables did not correlate in a statistically significant manner within the other three groups.

## DISCUSSION

As far as we know, this is the first study to simultaneously assess the effect of vascular access and statin therapy on inflammatory and fibrinolytic/endothelial cell (dys) function markers, in renal disease patients under HD and rhEPO therapy.

PAI-1 and tPA are markers of the fibrinolytic system, but they are also markers of endothelial cell function, as

**TABLE I - CHARACTERISTICS OF PARTICIPANTS IN THE STUDY**

	Patients with arterio-venous-fistula (AVF)		P	Patients with central venous catheter (CVC)		P
	Without statins (AVF-NS)	With statins (AVF-S)		Without statins (CVC-NS)	With statins (CVC-S)	
	(n=87)	(n=61)		(n=27)	(n=16)	
Age (y)	64.86±16.30	66.84±10.77	0.834	67.07±13.70	68.75±12.63	0.982
Gender (male) n (%)	51 (58.70)	36 (59.00)	0.962	13 (48.10)	5 (31.30)	0.278
Darbepoetin-α dose (µg/kg/week)	0.43 (0.27–0.73)	0.28 (0.15–0.65)	0.071	0.53 (0.33–0.97)	0.58 (0.37–1.03)	0.671
Time on dialysis (y)	2.43 (0.97–6.82)	1.84 (0.80–3.63)	0.527	1.97 (0.81–7.61)	1.37 (0.30–4.59)	0.505
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.55±3.73	27.68±4.93	<0.001	25.26±4.81	27.47±5.08	0.387
KT/Ve	1.49±0.22	1.45±0.25	0.907	1.56±0.63	1.44±0.20	0.595
URR (%)	76.61±6.11	74.97±5.76	0.477	76.79±10.28	75.57±4.17	0.942

Values are given as mean±SD or median (inter quartile range), unless otherwise indicated. BMI, Body Mass Index; y, years.

**TABLE II** - INFLAMMATORY AND FIBRINOLYTIC MARKERS, AND LIPID PROFILE IN CKD PATIENTS, ACCORDING TO VASCULAR ACCESS AND STATIN THERAPY

	Patients with arterio-venous-fistula (AVF)		P	Patients with central venous catheter (CVC)		P
	Without statins (AVF-NS)	With statins (AVF-S)		Without statins (CVC-NS)	With statins (CVC-S)	
	(n=87)	(n=61)		(n=27)	(n=16)	
CRP (mg/L)	4.8 (2.1–12.7)	6.3 (2.3–13.3)	0.878	6.1 (3.2–17.5)	3.6 (2.4–9.1)	0.671
Adiponectin (mg/L)	10.10±4.21	7.36±3.99	0.002*	11.01±6.65	8.66±3.67	0.354
tPA (ng/mL)	4.73 (3.53–6.81)	6.30 (4.88–9.29)	0.007*	5.50 (2.74–8.08)	4.87 (4.12–7.95)	0.914
PAI-1 (ng/mL)	15.91 (12.10–25.81)	26.38 (12.97–43.40)	0.005*	15.63 (10.11–34.98)	25.60 (17.00–38.21)	0.316
tPA/PAI-1 ratio	0.30 (0.20–0.38)	0.26 (0.15–0.43)	0.703	0.30 (0.19–0.47)	0.19 (0.15–0.30)	0.937
TC (mg/dL)	155.46±49.95	151.75±35.43	0.957	159.93±38.90	149.56±42.41	0.875
TG (mg/dL)	123.00 (85.00–170.00)	116.00 (97.50–188.00)	0.884	115.00 (95.00–175.00)	121.00 (92.00–179.75)	0.963
HDLc (mg/dL)	42.11±13.30	40.37±12.63	0.867	44.10±15.23	47.58±14.42	0.845
LDLc (mg/dL)	73.90±28.90	71.94±28.46	0.979	77.06±15.00	71.04±31.95	0.918
VLDL (mg/dL)	24.60 (17.00–35.20)	23.20 (19.30–37.60)	0.945	23.00 (19.00–35.00)	24.20 (18.40–35.95)	0.982
Lp(a) (mg/dL)	38.60 (23.30–71.60)	64.00 (35.50–123.90)	0.017*	42.60 (22.80–82.90)	43.35 (25.23–91.50)	1.000
Apo A (mg/dL)	119.28±29.93	125.39±31.76	0.626	125.33±31.39	130.94±26.36	0.937
Apo B (mg/dL)	70.60±21.40	71.46±19.44	0.995	82.26±25.21	73.69±24.22	0.592
OxLDL (U/L)	34.68±12.47	35.33±11.23	0.994	42.42±28.97	34.28±7.34	0.916
OxLDL/LDL ratio (U/mg)	0.050±0.014	0.053±0.016	0.761	0.060±0.030**	0.056±0.022	0.869

Values are given as mean±SD or median (inter quartile range).

Apo, apolipoprotein; CRP, C-reactive protein; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol; Ox-LDL, oxidized low-density lipoprotein; PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; tPA, tissue plasminogen activator; VLDL, Very-low density lipoprotein.

\* P values adjusted for body mass index (BMI): Adiponectin, P=0.013; tPA, P=0.028; PAI-1, P=0.020; Lp(a), P=0.001.

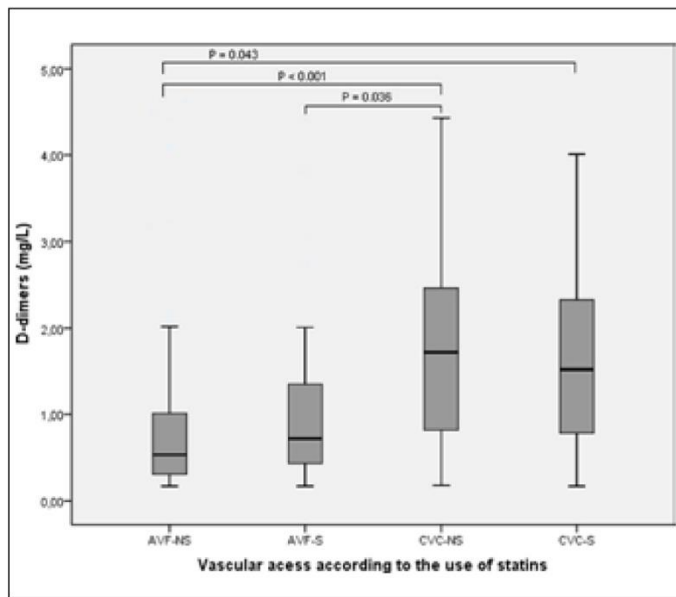
\*\* P=0.048 versus AVF-NS.

both are secreted by endothelial cells. tPA plays an important role in endogenous fibrinolysis, by promoting the conversion of plasminogen to plasmin, which in turn cleaves fibrin to produce fibrin degradation products, usually assayed as cross-linked fibrin fragments (D-dimer). Therefore, the assessment of D-dimers is used as a measure of the formation (via thrombin) and lysis (via plasmin) of fibrin.

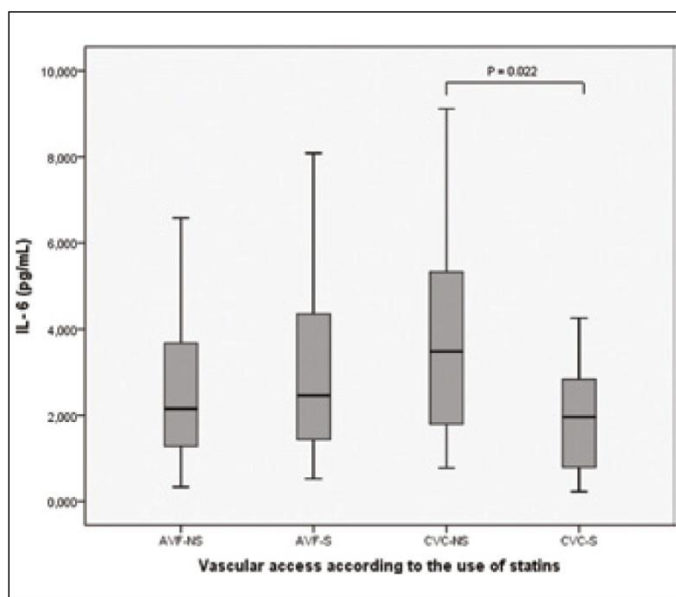
The activity of plasminogen activators is controlled by plasminogen activator inhibitors, PAI-1 being a major plasma inhibitor of tPA. A previous study from our group revealed that CKD patients under HD present higher D-dimers and a higher tPA/PAI-1 ratio, when compared with healthy controls (7). In this study, when analyzing data according to the type of vascular access used in HD patients, we found that patients with CVC-NS showed higher D-dimers than both AVF-NS and AVF-S patients (Fig. 1), suggesting that there is a hypercoagulation and fibrinolytic state. The CVC-S group also presented a median value higher than both AVF groups (with and without statins), although only with statistical significance compared with AVF-NS, further suggesting a higher thrombotic risk in patients using CVC. Moreover, the CVC-NS

group presented the highest values of both D-dimer and IL-6 and an interesting cross-talk has been proposed to exist between inflammation and coagulation (18, 23). The higher inflammatory status observed in this group may, actually, underlie an activation of the coagulation process. The highest ox-LDL/LDL ratio, also found in the CVC-NS group, revealing a higher proportion of oxidized LDL particles, may also corroborate this hypothesis, as ox-LDL present important pro-inflammatory and pro-coagulant properties (24).

When analyzing our data according to statin therapy, we observed that this treatment resulted in different effects within the AVF and CVC groups. The CVC-S group presented significantly lower IL-6 levels than CVC-NS (Fig. 2); CRP levels were also lower in the CVC-S group, although without statistical significance (Tab. II). Even thus, D-dimer levels did not differ between the CVC groups (Fig. 1), demonstrating that factors other than just inflammation, are likely to account for the formation and turnover of fibrin. The results obtained with IL-6 in the CVC groups show that statins can improve the chronic inflammatory status in renal dialysis patients, as has been proposed (20).



**Fig. 1** - D-Dimers levels in hemodialysis (HD) patients according to the vascular access and use of statins. The boxes represent the interquartile range (IQR), with the upper and lower edges of the boxes representing the 75th and 25th percentiles, respectively. The central horizontal lines within the boxes represent median levels for each group. The vertical whiskers above and below the boxes represent the range of outlying data points up to 1.5 times the IQR. AVF-NS - Patients with arterio-venous-fistula without statins; AVF-S, Patients with arterio-venous-fistula with statins; CVC-NS, Patients with central venous catheter without statins; CVC-S, Patients with central venous catheter without statins.



**Fig. 2** - Interleukin (IL)-6 levels in hemodialysis (HD) patients according to the vascular access and use of statins. The boxes represent the interquartile range (IQR), with the upper and lower edges of the boxes representing the 75th and 25th percentiles, respectively. The central horizontal lines within the boxes represent median levels for each group. The vertical whiskers above and below the boxes represent the range of outlying data points up to 1.5 times the IQR. AVF-NS, Patients with arterio-venous-fistula without statins; AVF-S, Patients with arterio-venous-fistula with statins; CVC-NS, Patients with central venous catheter without statins; CVC-S, Patients with central venous catheter without statins.

Concerning AVF groups, patients under statin therapy (AVF-S) presented significantly higher levels of t-PA and PAI-1, and lower adiponectin levels (Tab. II), as compared with patients not under statin therapy (AVF-NS). In the AVF-S group, the higher tPA and PAI-1 values were not accompanied by increased D-dimers levels, and the correlation between tPA values and D-dimers (although significant) was not strong ( $r=0.298$ ), suggesting that endothelial cell release of tPA is not only to accomplish fibrinolysis, and that endothelial dysfunction is likely to exist. As AVF-NS and AVF-S groups presented significantly different BMI values, which could be a major confounding factor for this analysis, we adjusted the analysis for BMI. Indeed, BMI can be used as a measure of adiposity and raised values are often associated with type 2 diabetes and endothelial dysfunction (25). Furthermore, adiponectin, which is known to be anti-inflammatory, anti-atherosclerotic and vasoprotective (26), is decreased in obese patients (27). After adjustment for BMI, we observed a slight reduction in statistical significance, but the adiponectin, tPA and PAI-1 levels between AVF-NS and AVF-S groups were still statistically significant (Tab. II). This suggests that only part of these values are because of differences in BMI between AVF groups but also that statins appear to influence adiponectin, tPA and PAI-1 values in these patients. It is worth emphasizing that similar results were found between CVC-S and CVC-NS, with the former group presenting higher PAI-1 and lower adiponectin levels, although without statistical significance (Tab. II). The lower number of subjects included in CVC groups can partially account for this result.

Recent research has demonstrated a pleiotropic effects of statins, in addition to its lipid lowering activity. Particularly important may be the effect of statins on adiponectin levels. However, clinical studies including large scale randomized controlled trials demonstrated potential differences for the several types of statins (18). Pravastatin increases plasma levels of adiponectin, and enhances insulin sensitivity in humans, promoting risk reduction for new onset of diabetes (12). Conversely, it was reported that simvastatin reduces adiponectin levels and insulin sensitivity (28, 29). Taking these observations together, and considering a high prevalence of diabetic patients in our study, it can be postulated that the effect of statins on endothelial function may be mediated by means of interference in adiponectin expression and secretion. Indeed, adiponectin has important anti-diabetic properties and appears to protect endothelial cells from the damages induced by the intermittent high levels of glucose (30). In our study, patients under statin therapy appear to lose the protective effect of adiponectin, with potential harmful effects on endothelial function. We analyzed data according to the type of statins treatment and no statistically significant differences were found (data not shown).

In contrast to CVC groups, no major differences in IL-6 or CRP values were observed between AVF groups.

It is possible that the anti-inflammatory effects of statins are only observed in CVC patients, who present the highest inflammatory status. On the other hand, AVF-S patients presented significantly lower values of adiponectin, which has anti-inflammatory properties. Even so, it should be highlighted that statin therapy was efficient in controlling the lipid profile. Indeed, no major differences in lipids and lipoproteins were observed with or without statin therapy, except for lipoprotein (a), which was higher in AVF-S patients. The effect of statins on lipoprotein (a) is controversial, with some previous studies claiming that simvastatin may increase its levels (31, 32), while others reported that the effect is minimal (33). Current data suggest that these drugs may decrease Lp(a) modestly, especially in hypercholesterolemic patients (34).

This study presented some limitations, namely the number of HD patients using CVC as vascular access is quite limited, which may hinder some statistical assessments. The inclusion of catheter performance parameters could also be important because of the higher thrombotic risk in CVC patients. Moreover, the follow-up of these patients, in order to assess the impact of statins therapy on morbidity and mortality, and the inclusion of more patients with different types of statins may be important in a future work.

In summary, this study demonstrates that HD patients with CVC, particularly those not under statin therapy, present a higher production and turnover of fibrin and a higher proportion of oxidized LDL particles, compared

with AVF patients also without statin therapy; therefore, they are at a higher cardiovascular risk. Furthermore, statin therapy appears to decrease inflammation in CVC patients; in AVF patients, statin therapy is associated with a reduction of adiponectin and increased endothelial function markers, and lipoprotein (a) levels. Thus, both vascular access and statin therapy appear to influence inflammation and fibrinolysis/endothelial function in renal dialysis patients.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to FMC, Dinefro – Diálises e Nefrologia, SA and Uninefro – Sociedade Prestadora de Cuidados Médicos e de Diálise, SA, and to their nurses for the technical support. This study was funded by FCT (PIC/IC/83221/2007) and by a PhD grant (SFRH/BD/79875/2011) attributed to S. Ribeiro by FCT.

**Financial support:** Project funding from Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) and COMPETE.

**Conflict of interest:** There are no potential conflicts of interest.

Address for correspondence:

Luís Belo

Serviço de Bioquímica - Departamento de Ciências Biológicas  
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228

4050-313 Porto - Portugal

luisbelo@ff.up.pt

## REFERENCES

- Schindler R, Senf R, Frei U. Influencing the inflammatory response of haemodialysis patients by cytokine elimination using large-pore membranes. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(1):17-19.
- Caglar K, Peng Y, Pupim LB, et al. Inflammatory signals associated with hemodialysis. *Kidney Int*. 2002;62(4):1408-1416.
- S. F. Hyporesponsiveness to recombinant human erythropoietin in dialysis patients. *Dial Transplant*. 2000; 29: 545-548.
- Costa E, Lima M, Alves JM, et al. Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy. *J Clin Immunol*. 2008;28(3):268-275.
- Hung CY, Chen YA, Chou CC, Yang CS. Nutritional and inflammatory markers in the prediction of mortality in Chinese hemodialysis patients. *Nephron Clin Pract*. 2005;100(1): c20-c26.
- Wanner C, Zimmermann J, Schwedler S, Metzger T. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients. *Kidney Int Suppl*. 2002;61(80):99-102.
- Costa E, Rocha S, Rocha-Pereira P, et al. Cross-talk between inflammation, coagulation/fibrinolysis and vascular access in hemodialysis patients. *J Vasc Access*. 2008;9(4): 248-253.
- Schoenmakers SH, Reitsma PH, Spek CA. Blood coagulation factors as inflammatory mediators. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;34(1):30-37.
- Santoro A. Confounding factors in the assessment of delivered hemodialysis dose. *Kidney Int Suppl*. 2000; 76:(Suppl. 76): S19-S27.
- Ifudu O, Mayers JD, Cohen LS, et al. Correlates of vascular access and nonvascular access-related hospitalizations in hemodialysis patients. *Am J Nephrol*. 1996;16(2):118-123.
- Schwab SJ, Harrington JT, Singh A, et al. Vascular access for hemodialysis. *Kidney Int*. 1999;55(5):2078-2090.
- Miller PE, Carlton D, Deierhoi MH, Redden DT, Allon M. Natural history of arteriovenous grafts in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2000;36(1):68-74.



13. Mandolfo S, Piazza W, Galli F. Central venous catheter and the hemodialysis patient: a difficult symbiosis. *J Vasc Access*. 2002;3(2):64-730.
14. Agras PI, Baskin E, Cengiz N, Kirazli S, Saatci U, Ozbek N. Global fibrinolytic capacity in children on dialysis. *Thromb Res*. 2005;115(3):185-189.
15. Yu A, Egberg N, Jacobson SH. Haemostatic complications in haemodialysis patients: effect of type of vascular access and dialysis filter. *Scand J Clin Lab Invest*. 2003;63(2): 127-133.
16. Kanno Y, Kobayashi K, Takane H, et al. Elevation of plasma D-dimer is closely associated with venous thrombosis produced by double-lumen catheter in pre-dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(4):1224-1227.
17. Epstein M, Vaziri ND. Statins in the management of dyslipidemia associated with chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(4):214-223.
18. Koh KK, Sakuma I, Quon MJ. Differential metabolic effects of distinct statins. *Atherosclerosis*. 2011;215(1):1-8.
19. Perelas A, Tsoulkani A, Perrea D. Effects of lipid-lowering drugs on adiponectin. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010;8(6): 836-848.
20. Deng J, Wu Q, Liao Y, et al. Effect of Statins on Chronic Inflammation and Nutrition status in Renal Dialysis Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nephrology (Carlton)* 2012.
21. Pisoni R, Barker-Finkel J, Allo M. Statin therapy is not associated with improved vascular access outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(8):1447-1450.
22. Locatelli F, Aljama P, Bárány P, et al; European Best Practice Guidelines Working Group. Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19 (Suppl 2):ii1-ii47.
23. Carter AM. Inflammation, thrombosis and acute coronary syndromes. *Diab Vasc Dis Res*. 2005;2(3):113-121.
24. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J*. 2001;15(12):2073-2084.
25. Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2004;291(16):1978-1986.
26. Siasos G, Tousoulis D, Kollia C, et al. Adiponectin and cardiovascular disease: mechanisms and new therapeutic approaches. *Curr Med Chem*. 2012;19(8):1193-1209.
27. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257(1):79-83.
28. Koh KK, Quon MJ, Han SH, et al. Simvastatin improves flow-mediated dilation but reduces adiponectin levels and insulin sensitivity in hypercholesterolemic patients. *Diabetes Care*. 2008;31(4):776-782.
29. Forst T, Pfützner A, Lübben G, et al. Effect of simvastatin and/or pioglitazone on insulin resistance, insulin secretion, adiponectin, and proinsulin levels in nondiabetic patients at cardiovascular risk—the PIOSTAT Study. *Metabolism*. 2007;56(4):491-496.
30. Xiao X, Dong Y, Zhong J, et al. Adiponectin protects endothelial cells from the damages induced by the intermittent high level of glucose. *Endocrine*. 2011;40(3):386-393.
31. Slunga L, Johnson O, Dahlén GH. Changes in Lp(a) lipoprotein levels during the treatment of hypercholesterolaemia with simvastatin. *Eur J Clin Pharmacol*. 1992;43(4): 369-373.
32. Sampietro T, Galetta F, Bionda A. Behavior of Lp(a) and apoproteins (A1, B, C2, C3, E) during and after therapy with simvastatin. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1995;9(6):785-789.
33. Dobs AS, Prasad M, Goldberg A, Guccione M, Hoover DR. Changes in serum lipoprotein(a) in hyperlipidemic subjects undergoing long-term treatment with lipid-lowering drugs. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1995;9(5):677-684.
34. Lippi G, Targher G. Optimal therapy for reduction of lipoprotein(a). *J Clin Pharm Ther*. 2012;37(1):1-3.



### Artigo 3:

#### **“Body mass index and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in maintenance hemodialysis patients”**

*Autores:* Maria do Sameiro Faria, Sandra Ribeiro, Petronila Rocha-Pereira, João Fernandes, Flávio Reis, Elsa Bronze-da-Rocha, Vasco Miranda, Alexandre Quintanilha, Elísio Costa, Luís Belo, Alice Santos-Silva.

*Revista:* *Renal Failure* 2013; 35 (10): 1392-1398.



## LABORATORY STUDY

**Body mass index and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in maintenance hemodialysis patients**

Maria do Sameiro-Faria<sup>1,2</sup>, Sandra Ribeiro<sup>3,4</sup>, Petronila Rocha-Pereira<sup>4,5</sup>, João Fernandes<sup>4,6</sup>, Flávio Reis<sup>6</sup>, Elsa Bronze-da-Rocha<sup>3,4</sup>, Vasco Miranda<sup>2</sup>, Alexandre Quintanilha<sup>1,4</sup>, Elísio Costa<sup>3,4</sup>, Luís Belo<sup>3,4</sup>, and Alice Santos-Silva<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal, <sup>2</sup>Fresenius Medical Center, Dinefro – Diálises e Nefrologia SA, Porto, Portugal, <sup>3</sup>Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal, <sup>4</sup>Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto, Porto, Portugal, <sup>5</sup>Centro Investigação Ciências Saúde, Universidade Beira Interior, Covilhã, Portugal, and <sup>6</sup>Faculdade de Medicina, IBILI, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

**Abstract**

The aim of this work was to contribute to a better understanding of the relationship between resistance to recombinant human erythropoietin (rhEPO) therapy and body mass index (BMI) in hemodialysis (HD) patients. We evaluated 191 HD patients and 25 healthy individuals. Complete blood count, reticulocyte count, and circulating levels of ferritin, transferrin, iron, soluble transferrin receptor (sTfR), transferrin saturation, hepcidin, C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6), albumin, and adiponectin were measured in all patients and controls. Non-responder patients ( $n = 16$ ), as compared with responder patients ( $n = 175$ ), showed statistically significant lower BMI values, an enhanced inflammatory and higher adiponectin levels, associated with disturbances in iron metabolism. Analyzing the results according to BMI, we found that underweight patients required higher rhEPO doses than normal, overweight, and obese patients, and a higher percentage of non-responders patients were found within the underweight group of HD patients. Moreover, underweight patients presented lower levels of transferrin and higher levels of adiponectin compared to overweight and obese patients, and lower levels of iron compared with normal weight patients. Multiple regression analysis identified the sTfR, hemoglobin, BMI, and albumin as independent variables associated with rhEPO doses. In conclusion, our work showed that HD patients resistant to rhEPO therapy present a functional iron deficiency and a higher degree of inflammation, despite their lower BMI values and higher levels of adiponectin. Actually, BMI is poorly related with markers of systemic inflammation, such as IL-6 and CRP, while adiponectin works a fairly good indirect marker of adiposity within HD patients.

**Introduction**

Anemia is a common complication in chronic kidney disease (CKD) patients under hemodialysis (HD), which has a negative impact on cardiovascular system, cognitive function, exercise capacity and quality of life, resulting in a significant morbidity and mortality in these patients. The introduction of recombinant human erythropoietin (rhEPO) therapy for the treatment of anemia of CKD has led to a significant reduction in anemia and to an improvement in patients' quality of life.<sup>1–4</sup> However, 5–10% of the HD patients show a marked resistance to rhEPO therapy.<sup>3–5</sup> There are a lot of conditions reported as associated with rhEPO resistance, namely, inflammation, oxidative stress, and functional iron deficiency, as major causes, and blood loss, hyperparathyroidism,

aluminium toxicity and vitamin B12 or folate deficiency, as minor causes.<sup>4,6–10</sup>

Several studies showed a paradoxically inverse association between the classical risk factors for cardiovascular disease (CVD) and mortality in HD patients.<sup>11–14</sup> Actually, it has been demonstrated that high body mass index (BMI) is paradoxically protective and associated with improved survival, while low BMI has been associated with increased mortality in HD patients. These findings have been referred to as “reverse epidemiology”.

Obesity is a risk factor for the development and progression of CKD;<sup>13</sup> however, it seems that there are some mechanisms in obese patients under HD that protect them when compared to underweight patients. Some mechanisms have been proposed, such as a more stable hemodynamic status, cardioprotection by tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) receptors, neurohormonal changes, malnutrition-inflammation complex syndrome, among others.<sup>14</sup> Regarding the underweight patients, some explanations have been

Address correspondence to Alice Santos-Silva, Departamento de Ciências Biológicas – Serviço de Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal. E-mail: assilva@ff.up.pt

**Keywords**

Anemia, BMI, body mass index, EPO, erythropoietin, hemodialysis, inflammation, resistance to rhEPO

**History**

Received 16 May 2013  
Revised 17 July 2013  
Accepted 19 July 2013  
Published online 23 August 2013

proposed to explain why they have an increased risk, namely, that they present a decreased nutritional reserve and a reduced protein-calorie intake, and reducing its capacity to overcome inflammation and chronic acidosis; hospitalization and failure of vascular access are also more frequent in these patients.<sup>15</sup> These findings are usually related with the enhancement of the inflammatory state, which are hallmark of HD patients, and one of the most important factors associated with anemia and with resistance to rhEPO therapy, in HD patients.

Given the implications of rhEPO resistance in morbidity and mortality of HD patients, the aim of this work was to contribute to a better understanding of the relationship between resistance to rhEPO therapy and BMI. We studied systemic changes associated with resistance to rhEPO and with BMI, with particular interest on iron metabolism and inflammatory markers.

## Patients and methods

### Patients

In this transversal study, we evaluated 191 Portuguese HD patients (105 males and 86 females; mean age  $66.1 \pm 14.0$  years) under HD and rhEPO – darbepoetin alfa [0.42 (0.20–0.75) micro/kg/week] therapies. The classification of CKD patients as responders or non-responders to rhEPO therapy was performed in accordance with the European Best Practice Guidelines, which defines resistance to rhEPO as a failure to achieve target hemoglobin levels (11–12 g/dL) with doses of 1.5 µg/kg/week of darbepoetin- $\alpha$ . The intravenous iron supplementation used was based on the European Best Practice Guidelines for the management of anemia in patients under HD and rhEPO therapies. All participants gave their informed consent to participate in this study that was previously approved by the Ethics Committee of the Clinics of Hemodialysis. Patients with autoimmune disease, malignancy, and acute or chronic infection were excluded.

CKD patients were under therapeutic hemodialysis three times per week, for 3–5 h, for a median of 2.11 (0.85–5.19) years. All patients used the high-flux polysulfone FX-class dialyzers of Fresenius. Dialysis clearance of urea was expressed as KT/V. The main causes of renal failure in this population were as follows: diabetic nephropathy ( $n=69$ ), hypertensive nephrosclerosis ( $n=22$ ), nephritic syndrome ( $n=10$ ), polycystic kidney disease ( $n=8$ ), obstructive diseases ( $n=7$ ), hereditary nephropathy ( $n=3$ ), chronic interstitial nephritis ( $n=2$ ), benign prostate hypertrophy ( $n=1$ ), systemic lupus erythematosus ( $n=1$ ), other diseases ( $n=7$ ) and uncertain etiology ( $n=61$ ). A group of 25 healthy individuals were selected as controls based on normal hematological and biochemical values, and no history of kidney or inflammatory disease. This group was matched, as far as possible, for age and gender with HD patients.

### Assays

Blood samples were obtained immediately before HD procedure and processed within 2 h of collection. Blood was collected to tubes with and without anticoagulant EDTA, in order to obtain plasma, buffy-coat, and the serum. Aliquots were immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed.

Red blood cell (RBC) count, hematocrit, hemoglobin concentration, hematological indices [mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), and mean cell hemoglobin concentration (MCHC)] and red cell distribution width (RDW) were measured using an automatic blood cell counter (Sysmex K1000; Sysmex, Hamburg, Germany). Reticulocyte count was measured by microscopic counting on blood smears after vital staining with new methylene blue (reticulocyte stain; sigma, St Louis, MO). The reticulocyte production index (RPI) was calculated to measure the effective reticulocyte production.<sup>16</sup>

Concentration of adiponectin, interleukin (IL)-6, soluble transferrin receptor (sTfR), and hepcidin-25 were evaluated by using standard commercial enzyme-linked immunoassays (adiponectin and IL-6 – from Bender Med Systems; sTfR – R&D Systems; hepcidin-25 – Bachem, UK). Ferritin, transferrin, iron, and C-reactive protein (CRP) were measured using latex-enhanced immunoturbidimetry (Ferritin and transferrin, Randox; iron and CRP, Tina-quant, Roche). Transferrin saturation (TS) was calculated by the formula:  $\text{TS (\%)} = 70.9 \times \text{serum iron concentration in } (\mu\text{g/dL}) / \text{serum transferrin concentration in } (\text{mg/dL})$ . Serum albumin levels were measured using a colorimetric assay end-point method (Albumin Plus; Roche GmbH, Mannheim, Germany).

### Statistical analysis

For statistical analysis, we used the Statistical Package for Social Sciences (SPSS), version 19.0. The distribution of continuous variables was analyzed using the Kolmogorov–Smirnov test, in order to assess significant departures from Normality. Normally distributed variables are presented as mean  $\pm$  SD and those non-normally distributed are presented as median (interquartile range). Multiple comparisons between groups were performed by one-way ANOVA supplemented with Turkey's HSD *post-hoc* test. The association between categorical variables was analyzed using the chi-squared test or Fisher's exact test. For single comparisons, we used the Students *t*-test whenever the parameters presented a Gaussian distribution and the Mann–Whitney *U*-test in the case of a non-Gaussian distribution. Adjustment of statistical differences for confounding factors was performed using ANCOVA. Multiple regression analysis using the stepwise method was used to determine independent factors affecting rhEPO doses. Significance was accepted at *p* less than 0.05.

### Results

The results were analyzed in order to evaluate the differences between healthy controls and HD patients, between responder and non-responder patients, and according to the BMI of the patients. Compared to controls (Table 1), HD patients presented a significantly decreased erythrocyte count, hemoglobin concentration, and hematocrit, associated with an increased MCV and a decreased MCHC. We also found a significant decrease in platelet and lymphocytes counts. Moreover, HD patients presented significant changes in iron metabolism – lower serum transferrin and iron, and higher ferritin, sTfR, hepcidin, and TS; a significant increase in inflammatory markers, IL-6 and CRP, in adiponectin level, and in BMI values were also observed.

Table 1. Demographic and dialysis-related data, hematological parameters, iron metabolism, and inflammatory and nutritional status in all HD patients, and in responders and non-responders patients.

	Controls (n = 25)	All patients (n = 191)	Responders (n = 175)	Non-responders (n = 16)
<b>Demographic and dialysis-related data</b>				
Darbopoetin- $\alpha$ dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$ )	–	0.42 (0.20–0.75)	0.40 (0.18–0.65)	2.05 (1.76–2.34)**
Time on dialysis (years)	–	2.11 (0.81–5.19)	2.10 (0.81–4.80)	4.34 (0.89–7.19)
KT/V	–	1.52 $\pm$ 0.33	1.49 (1.37–1.70)	1.48 (1.23–1.78)
Vascular access (AVF) n (%)	–	148 (77.48)	136 (77.71)	12 (75.00)
Diabetic patients n (%)	–	69 (36.13)	63 (36.00)	6 (37.50)
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	22.23 $\pm$ 2.26	25.89 $\pm$ 4.61*	26.25 $\pm$ 4.56	21.97 $\pm$ 3.19**
<b>Hematological data</b>				
Erythrocytes ( $\times 10^{12}/\text{L}$ )	4.91 $\pm$ 0.45	3.81 $\pm$ 0.52*	3.82 $\pm$ 0.52	3.72 $\pm$ 0.56
Hemoglobin (g/dL)	14.93 $\pm$ 0.86	11.72 $\pm$ 1.44*	11.82 $\pm$ 1.39	10.63 $\pm$ 1.51**
Hematocrit (%)	44.28 $\pm$ 2.80	36.43 $\pm$ 4.57*	36.61 $\pm$ 4.51	34.41 $\pm$ 4.93**
MCV (fL)	88.12 $\pm$ 11.72	95.84 $\pm$ 6.00*	96.12 $\pm$ 5.88	92.68 $\pm$ 6.65**
MCH (pg)	30.55 $\pm$ 1.61	30.97 $\pm$ 2.36	31.12 $\pm$ 2.30	28.97 $\pm$ 2.25**
MCHC (g/dL)	33.76 $\pm$ 0.46	32.26 $\pm$ 1.19*	32.37 $\pm$ 1.14	31.05 $\pm$ 1.04**
RDW (%)	15.06 $\pm$ 0.54	15.06 $\pm$ 1.90	14.88 $\pm$ 1.80	17.20 $\pm$ 1.72**
Reticulocytes ( $\times 10^9/\text{L}$ )	57.00 (33.82–80.20)	49.34 (27.44–72.82)	50.34 (26.69–72.47)	48.44 (28.54–86.16)
RPI	1.20 (0.65–1.55)	0.90 (0.50–1.40)	0.90 (0.50–1.40)	0.80 (0.40–1.43)
Platelets ( $\times 10^9/\text{L}$ )	257.12 $\pm$ 58.85	183.65 $\pm$ 55.08*	182.35 $\pm$ 53.87	198.67 $\pm$ 69.52
White blood cells ( $\times 10^9/\text{L}$ )	6.72 $\pm$ 1.66	6.40 $\pm$ 1.99	6.36 $\pm$ 1.89	6.85 $\pm$ 3.00
Neutrophils ( $\times 10^9/\text{L}$ )	4.29 $\pm$ 1.48	3.96 $\pm$ 1.48	3.90 $\pm$ 1.39	4.63 $\pm$ 2.23
Lymphocytes ( $\times 10^9/\text{L}$ )	1.96 $\pm$ 0.37	1.69 $\pm$ 0.69*	1.71 $\pm$ 0.67	1.44 $\pm$ 0.87**
Neutrophil/lymphocyte ratio	1.96 (1.68–2.88)	2.33 (1.77–3.26)	2.62 $\pm$ 1.49	3.65 $\pm$ 1.39**
<b>Iron metabolism</b>				
Transferrin (mg/dL)	310.84 $\pm$ 44.04	184.25 $\pm$ 35.64*	185.72 $\pm$ 35.09	168.19 $\pm$ 38.76
Iron (mg/dL)	53.00 (41.00–69.50)	38.00 (30.00–54.00)*	39.00 (32.00–55.00)	25.00 (17.00–34.50) **
sTfR (nmol/L)	13.62 $\pm$ 3.72	23.30 $\pm$ 11.88*	22.49 $\pm$ 11.15	32.24 $\pm$ 15.88**
Ferritin (ng/mL)	102.54 $\pm$ 60.61	401.96 $\pm$ 152.61*	404.32 $\pm$ 149.20	376.13 $\pm$ 189.71
Transferrin saturation (%)	12.09 (9.70–15.39)	15.11 (11.71–19.29)*	15.67 (11.96–20.41)	10.63 (7.45–13.74)**
Hepcidin-25 (ng/mL)	218.40	1599.11	1738.50	1042.55
	(124.46–318.63)	(863.56–2409.00)*	(935.10–2496.46)	(372.09–1551.28)**
<b>Inflammatory and nutritional status</b>				
Albumin (g/dL)	NM	3.97 $\pm$ 0.37	4.00 $\pm$ 0.34	3.59 $\pm$ 0.53**
Adiponectin (mg/L)	4.93 $\pm$ 2.30	9.23 $\pm$ 4.70*	8.93 $\pm$ 4.47	12.48 $\pm$ 6.01**
IL-6 (pg/mL)	0.43 (0.28–0.61)	2.29 (1.39–4.27)*	2.23 (1.37–3.92)	4.21 (2.18–5.50)**
CRP (mg/dL)	0.08 (0.04–0.19)	0.52 (0.23–1.33)*	0.49 (0.22–1.26)	1.34 (0.51–2.97)**

Notes: BMI: body mass index; MCV: mean cell volume; MCH: mean cell hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width; RPI: reticulocyte production index; sTfR: soluble transferrin receptor; IL-6: interleukin 6; CRP: C-reactive protein; AVF: arteriovenous fistula.

\* $p < 0.05$  versus controls; \*\* $p < 0.05$  versus responders patients.

When comparing the two groups of HD patients (responders and non-responders), we found that non-responders presented a significantly lower BMI (Table 1). These patients were more anaemic, as showed by the significant decrease in hemoglobin and hematocrit, and that erythrocytes were more hypochromic, as reflected by significantly lower values of MCH and MCHC; a lower value of MCV and a significantly higher RDW, reflecting the presence of more anisocytic erythrocytes in non-responders patients (Table 1). Even with the significant worsening of the anaemia in non-responders, we did not find a statistically significant increase for reticulocyte count and RPI in this group of HD patients. Non-responder patients also presented a decrease in lymphocyte counts, iron, and hepcidin, and an increase in sTfR and in adiponectin. Moreover, non-responders patients presented an enhanced inflammatory process, with higher levels of CRP, IL-6, and neutrophil/Lymphocyte ratio, and lower level of albumin serum were also observed.

In order to analyze our data according to BMI of the patients (Table 2), we divided HD participants in four different groups: underweight (BMI  $< 20 \text{ kg}/\text{m}^2$ ;  $n = 12$ ), normal weight ( $20 \leq \text{BMI} < 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ ;  $n = 80$ ), overweight ( $25 \leq \text{BMI} < 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ ;  $n = 65$ ) and obese (BMI  $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ ;

$n = 34$ ) patients. Groups were matched for age, time on dialysis, and in the number of diabetic and hypertensive patients. No differences were found for the hematological parameters, except for the lymphocyte count between underweight and obese patients. We also found that underweight patients required significantly higher rhEPO doses, as compared with the other three groups, and that a higher number of non-responders patients were also found in the underweight group of HD patients. Regarding the parameters related to iron metabolism, the patients with BMI  $< 20 \text{ kg}/\text{m}^2$  presented lower levels of transferrin compared to overweight and obese patients, and also lower levels of iron comparing with normal weight patients. Underweight patients presented the highest CRP and IL-6 levels, though without statistical significance. Adiponectin serum levels presented significant differences, decreasing significantly from underweight to overweight patients. Moreover, BMI correlated inversely and significantly with adiponectin ( $r = -0.397$ ,  $p < 0.001$ ; Figure 1), rhEPO doses ( $r = -0.271$ ,  $p < 0.001$ ) and KT/V ( $r = -0.252$ ,  $p = 0.003$ ); BMI correlated positively and significantly with transferrin ( $r = 0.352$ ,  $p < 0.001$ ) and with lymphocyte counts ( $r = 0.214$ ,  $p = 0.003$ ).

Table 2. Demographic and dialysis-related data, hematological parameters, iron metabolism, and inflammatory and nutritional status in HD patients, according to body mass index.

	BMI < 20 kg/m <sup>2</sup> (n = 12)	20 kg/m <sup>2</sup> ≤ BMI < 25 kg/m <sup>2</sup> (n = 80)	25 kg/m <sup>2</sup> ≤ BMI < 30 kg/m <sup>2</sup> (n = 65)	BMI ≥ 30 kg/m <sup>2</sup> (n = 34)
Age (years)	70.59 ± 20.45	63.18 ± 15.26	66.79 ± 11.95	70.17 ± 10.57
Gender (male) n (%)	7 (58.30)	45 (56.30)	42 (64.60)	11 (32.40)*
Darbopoeitin-α dose (μg/kg/week)	0.75 (0.25–1.96)	0.49 (0.19–0.87) a	0.36 (0.19–0.58) b	0.40 (0.20–0.66) c
Darbopoeitin-α resistance n (%)	5 (41.70)	9 (11.30)	1 (1.50)	1 (2.90)*
Time on dialysis (years)	5.51 (1.36–7.50)	2.36 (0.92–5.16)	2.09 (0.80–6.66)	1.40 (0.48–3.52)
KT/V	1.68 ± 0.17	1.54 ± 0.25	1.55 ± 0.44	1.37 ± 0.26 c
Vascular access (AVF) n (%)	10 (83.30)	59 (73.80)	54 (84.40)	22 (68.80)
Diabetic patients n (%)	2 (16.70)	23 (28.80)	27 (41.50)	17 (50.00)
Hematological data				
Erythrocytes (× 10 <sup>12</sup> /L)	3.73 ± 0.37	3.82 ± 0.50	3.82 ± 0.59	3.81 ± 0.51
Hemoglobin (g/dL)	11.56 ± 1.34	11.79 ± 1.49	11.69 ± 1.44	11.69 ± 1.38
Hematocrit (%)	35.54 ± 4.05	36.77 ± 4.68	36.28 ± 4.79	36.25 ± 4.20
MCV (fL)	95.28 ± 5.94	96.40 ± 6.43	95.46 ± 5.50	95.47 ± 6.05
MCH (pg)	30.77 ± 2.02	31.09 ± 2.48	30.88 ± 2.02	30.97 ± 2.86
MCHC (g/dL)	32.54 ± 1.23	32.15 ± 1.22	32.37 ± 1.12	32.25 ± 1.26
RDW (%)	15.62 ± 1.61	15.42 ± 2.24	14.91 ± 1.80	14.44 ± 1.28
Reticulocytes (× 10 <sup>9</sup> /L)	34.93 (24.66–59.46)	46.97 (26.21–69.80)	48.76 (28.40–72.14)	62.08 (32.68–84.72)
RPI	0.65 (0.43–1.30)	0.90 (0.40–1.38)	0.90 (0.50–1.40)	1.10 (0.60–1.60)
Platelets (× 10 <sup>9</sup> /L)	170.00 ± 56.47	182.16 ± 61.56	174.71 ± 51.19	204.16 ± 44.52
White blood cells (× 10 <sup>9</sup> /L)	5.85 ± 1.75	6.26 ± 2.17	6.42 ± 1.69	6.88 ± 2.14
Neutrophils (× 10 <sup>9</sup> /L)	3.86 ± 1.23	3.95 ± 1.72	3.85 ± 1.10	4.23 ± 1.62
Lymphocytes (× 10 <sup>9</sup> /L)	1.35 ± 0.55	1.59 ± 0.70	1.73 ± 0.62	1.95 ± 0.78 c
Neutrophil/lymphocyte ratio	3.28 (1.94–4.12)	2.46 (1.78–3.37)	2.21 (1.76–3.02)	2.22 (1.53–3.28)
Iron metabolism				
Transferrin (mg/dL)	151.67 ± 30.80	177.90 ± 33.26	189.46 ± 33.82 b	200.74 ± 36.23 c, e
Iron (mg/dL)	28.00 (17.25–48.00)	37.00 (30.00–50.25)	42.00 (32.50–55.50) b	36.50 (31.00–51.50)
sTfR (nmol/L)	22.49 ± 10.12	24.54 ± 12.14	22.36 ± 11.71	22.47 ± 12.37
Ferritin (ng/mL)	436.63 ± 156.73	399.27 ± 150.76	409.54 ± 152.13	381.55 ± 160.02
Transferrin saturation (%)	14.87 (8.11–22.45)	15.81 (12.00–19.26)	15.67 (12.64–19.78)	13.71 (11.06–18.46)
Hepcidin-25 (ng/mL)	1175.80 (668.19–2526.19)	1482.35 (818.56–2375.04)	1897.75 (957.23–2696.90)	1599.11 (841.26–1875.90)
Inflammatory and nutritional status				
Albumin (g/dL)	3.72 ± 0.54	4.00 ± 0.43	4.00 ± 0.30	3.95 ± 0.28
Adiponectin (mg/L)	13.57 ± 5.18	10.46 ± 4.62	7.83 ± 3.96 b,d	7.48 ± 4.40 c,e
IL-6 (pg/mL)	3.26 (1.30–5.45)	2.26 (1.25–4.22)	2.09 (1.37–3.50)	3.08 (2.04–5.18)
CRP (mg/dL)	1.15 (0.54–3.86)	0.42 (0.20–1.44)	0.44 (0.27–1.03)	0.70 (0.32–1.46)

Notes: MCV: mean cell volume; MCH: mean cell hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width; RPI: reticulocyte production index; s-TfR: soluble transferrin receptor; IL-6: interleukin 6; CRP: C-reactive protein.

\* $p < 0.05$  (Chi-Square test); (a)  $p < 0.05$ , BMI < 20 kg/m<sup>2</sup> versus 20 kg/m<sup>2</sup> ≤ BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>; (b)  $p < 0.05$ , BMI < 20 kg/m<sup>2</sup> versus 25 kg/m<sup>2</sup> ≤ BMI < 30 kg/m<sup>2</sup>; (c)  $p < 0.05$ , BMI < 20 kg/m<sup>2</sup> versus BMI ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>; (d)  $p < 0.05$ , 20 kg/m<sup>2</sup> ≤ BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> versus 25 kg/m<sup>2</sup> ≤ BMI < 30 kg/m<sup>2</sup>; (e)  $p < 0.05$ , 20 kg/m<sup>2</sup> ≤ BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> versus BMI ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>.

Multiple regression analysis identified the sTfR ( $b = 0.451$ ;  $p < 0.001$ ), hemoglobin concentration ( $b = -0.377$ ;  $p < 0.001$ ), BMI ( $b = -0.276$ ;  $p < 0.001$ ) and albumin ( $b = -0.215$ ;  $p = 0.006$ ) as independent variables significantly associated with rhEPO doses required to achieved the target of hemoglobin levels.

## Discussion

Anemia is a common complication in CKD patients under HD. To compensate the anemia of these patients, mainly due to renal failure in EPO production, therapeutic administration of rhEPO is nowadays included in the therapeutic protocols for these patients. However, the dose chosen to be used should only target to partially correct the anemia. In fact, pre-dialysis levels of hemoglobin higher than 11–12 g/dL are not desirable, due to the risk associated with the effects arising from post-dialysis hemoconcentration and its related complications.<sup>17</sup>

Our HD patients under rhEPO therapy presented a decrease in hemoglobin concentration, hematocrit and erythrocyte counts, associated with a decreased in erythrocyte hemoglobinization (lower MCHC) and with an increased in erythrocyte size (higher MCV). Furthermore, HD patients also presented lymphopenia (Table 1). Previous work from our group demonstrated that this lymphopenia results, at least in part, from a decrease in total circulating CD3<sup>+</sup> T-lymphocytes and affect both the CD4<sup>+</sup> and the CD8<sup>+</sup> T-cell subsets.<sup>18</sup> The presence of an inflammatory process (higher levels of IL-6 and CRP; Table 1) is a consistent finding in HD patients<sup>3–5,19–21</sup> and the causes for this inflammatory response are not well clarified. There are several potential sources, including bacterial contamination of the dialyzer, incompatibility with the dialyzer membrane, and the type of the vascular access. Another possible source is increased adiposity. Obesity is a low-grade inflammatory disease and the adipocyte is an important source of bioactive molecules, known collectively as adipokine. Some of these, such as the



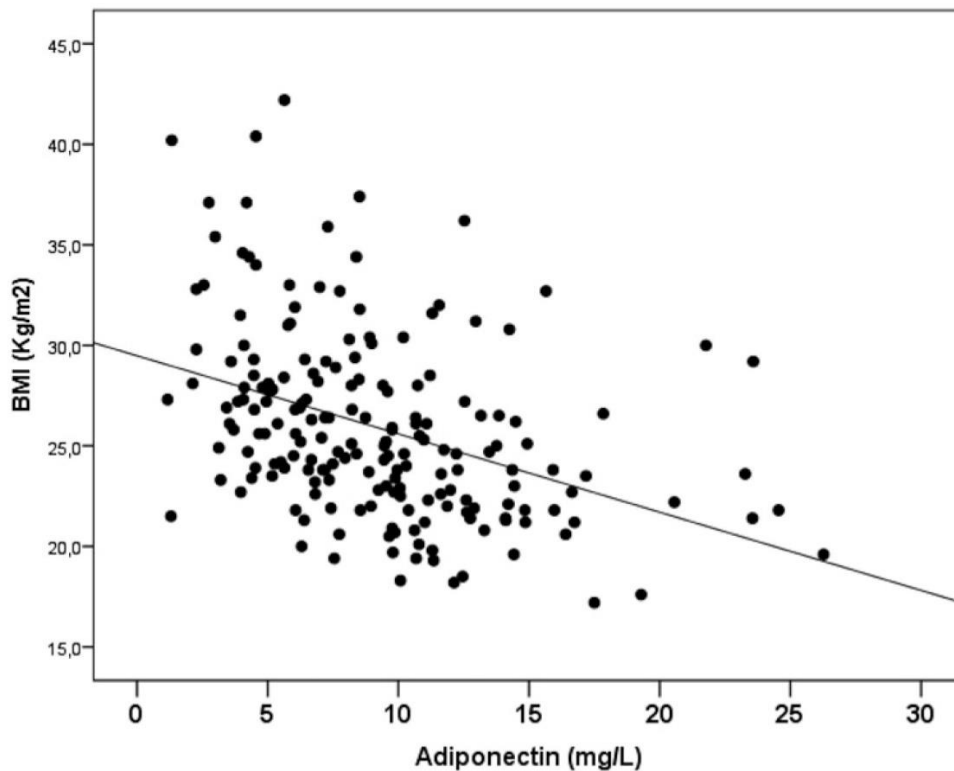


Figure 1. Significant correlation between adiponectin and BMI ( $r = -0.397$ ,  $p < 0.001$ ).

pro-inflammatory cytokine IL-6, are known to present a positive relation with increasing markers of obesity. On the contrary, adiponectin, which is a protective anti-inflammatory adipokine almost exclusively synthesized in the adipocyte, presents an inverse relation with BMI values.<sup>31,32</sup> In the present study, our HD patients also presented higher BMI values compared to controls, which could justify part of the inflammatory response. However, all results remained statistically significant after adjustment for BMI, suggesting a poor contribution of adiposity to inflammation in HD patients. Furthermore, raised levels of adiponectin (usually inversely related to BMI) in HD patients are the result of its accumulation in the circulation due to CKD, as this polypeptide is eliminated from the circulation mostly by the kidneys.<sup>33</sup> Higher adiponectin levels in HD patients may represent a protective mechanism to these patients. Indeed, adiponectin is an adipokine that exerts a variety of anti-inflammatory activities, interfering with macrophage function by inhibiting phagocytosis, IL-6, or TNF $\alpha$  production, reducing T-cell function, and promoting the release of IL-10 and IL-1 receptor antagonist.<sup>28,29</sup>

This increased inflammatory stimulus has an important impact in iron metabolism, by mobilizing iron from erythropoiesis traffic to storage sites within the reticuloendothelial system.<sup>22</sup> It is known that some inflammatory players, namely, hepcidin, has an important impact in iron metabolism, reducing the mobilization and absorption of iron for erythropoiesis,<sup>34</sup> leading, therefore, to an iron depleted erythropoiesis. In our HD patients, we found an increase in ferritin serum levels and a decrease in transferrin. These results suggest an increase of iron storage and a reduction in iron mobilization for erythropoiesis. An increased level of

hepcidin was also found in our HD patients. IL-6 strongly induces hepcidin mRNA expression,<sup>23,24</sup> indicating that the high levels of hepcidin found in HD patients could be related to the underlying chronic inflammation. The increased hepcidin expression during inflammation and infection explains sequestration of iron in the macrophages and inhibition of intestinal iron absorption, the two hallmarks of the anemia of inflammation, which is normocytic or microcytic and hypochromic.<sup>25-27</sup>

HD patient's non-responders to rhEPO therapy presented a mild anemia, even with the administration of higher rhEPO doses. This anemia is hypochromic (decreased MCH and MCHC), and is associated with a more accentuated anisocytosis than in responder patients. Considering that all patients were under iron and folate prophylactic therapies, and, that iron status and vitamin B12 serum levels were normal, these changes cannot be attributable to a deficiency in these erythropoietic nutrients. Actually, the HD patient's non-responders to rhEPO therapy seem to present a "functional" iron deficiency, characterized by the presence of adequate iron stores as defined by conventional criteria, but apparently with an inability to sufficiently mobilize iron to adequately support erythropoiesis. This "functional" iron deficiency is reflected by a decreased MCH, MCHC, and transferrin saturation, and by a more accentuated anisocytosis (high RDW), with higher levels of ferritin, in non-responders patients. Additionally, HD patient's non-responders to rhEPO therapy presented lower hepcidin serum levels when compared with responders. Hepcidin is up-regulated by inflammation and down regulated by low iron and hypoxia/anemia; moreover, erythropoietin down regulates liver hepcidin expression.<sup>30,34</sup>

As non-responders patients were treated with much higher doses of rhEPO compared with responders, the lower hepcidin levels found in those patients could be explained by this mechanism.

Non-responders patients also presented an enhanced inflammatory process with higher neutrophil/lymphocyte ratio, IL-6 and CRP concentrations, and lower albumin level, as compared to responders. This enhanced inflammatory stimulus induces the release of cytokines, including pro-inflammatory cytokines that can have an erythropoiesis-suppressing effect. Moreover, the higher adiponectin levels found in non-responders is in agreement with lower BMI values presented by these patients. The rise in this protective adipokine may counterbalance the higher degree of inflammation presented by these patients.

To better understand the relationship between our studied variables and obesity in HD patients, we analyzed results by splitting participants in four different groups according to their BMI values: underweight, normal weight, overweight, and obese patients (Table 2). Groups were comparable as they were matched for age, time on dialysis, and in the number of diabetic and hypertensive patients. Even thus, it is important to emphasize that the group that presented the highest percentage of diabetic patients was the obese (50%; Table 2). This group presented statistically significant lower adiponectin (an anti-diabetic and anti-inflammatory adipokine) levels compared with the other three groups. Moreover, a significant negative correlation was observed between BMI and adiponectin (Figure 1) in agreement with previous reports with obese patients.<sup>31,32</sup> However, the group that presented the highest median IL-6 levels (and consequently of CRP, as IL-6 is a major stimulus for hepatic synthesis of this acute phase protein) was the underweight, and no statistically significant correlation was found between IL-6 and CRP with BMI, suggesting that adiposity is not a major determinant of these inflammatory variables in HD patients. Also, our underweight HD patients required higher rhEPO doses to achieve the target of hemoglobin levels, and present high percentage of non-responders to rhEPO therapy. This group also presented with lower transferrin, iron serum levels, and lymphocyte counts. Moreover, multiple regression analysis identified BMI as an independent variable negatively associated with rhEPO doses. A recent study<sup>35</sup> showed a positive correlation between hepcidin serum levels and BMI; however, in our HD patients this correlation is not found, suggesting that the fat tissue does not have an important role in the circulating levels of hepcidin in these patients. These results are in line with those that we obtained for non-responder patients and enforce recent evidence from studies demonstrating that obesity in HD patients seems to play a protective role.<sup>13–15</sup>

In conclusion, our work demonstrated that patients resistant to rhEPO therapy present with a functional iron deficiency and a higher degree of inflammation, despite presenting lower BMI values and higher levels of adiponectin, compared with patients that are not resistant to therapy. We also found within HD patients that adiponectin presents a fairly good inverse correlation with the adiposity marker BMI. However, in contrast with general population, BMI is poorly related with IL-6 and CRP levels in HD patients.

## Acknowledgements

We are very grateful to FMC, Dinefro—Diálises e Nefrologia, SA, and Uninefro—Sociedade Prestadora de Cuidados Médicos e de Diálise, SA, and to their nurses for their technical support.

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

This study was supported by “Fundação para a Ciência e Tecnologia” (FCT: PIC/IC/83221/2007) and co-financed by FEDER (FCOMP-01-0124-FEDER-008468).

## References

- ▶ 1. Locatelli F, Conte F, Marcelli D. The impact of hematocrit levels and erythropoietin treatment on overall and cardiovascular mortality and morbidity – the experience of the Lombardy dialysis registry. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13:1642–1644.
- ▶ 2. Locatelli F, Pisoni RL, Combe C, et al. Anaemia in hemodialysis patients of five European countries: association with morbidity and mortality in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:121–132.
- ▶ 3. Bárány P. Inflammation, serum C-reactive protein, and erythropoietin resistance. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:224–227.
- ▶ 4. Smrzova J, Balla J, Bárány P. Inflammation and resistance to erythropoiesis-stimulating agents—what do we know and what needs to be clarified? *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(Suppl 8):viii2–viii7.
- ▶ 5. Macdougall IC, Cooper AC. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(Suppl 11):39–43.
- ▶ 6. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. The impact of anemia on cardiomyopathy morbidity and mortality in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis*. 1996;28:53–61.
- ▶ 7. Gunnell J, Yeun JY, Depner TA, Kaysen GA. Acute-phase response predicts erythropoietin resistance in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 1999;33:63–72.
- ▶ 8. Spittle MA, Hoenich NA, Handelman GJ, Adhikarla R, Homel P, Levin NW. Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2001;38:1408–1413.
- ▶ 9. Pupim LB, Himmelfarb J, McMonagle E, Shyr Y, Ikizler TA. Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. *Kidney Int*. 2004;65:2371–2379.
- ▶ 10. Himmelfarb J. Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial*. 2004;17:449–454.
- ▶ 11. Cuevas X, García F, Martín-Malo A, et al. Risk factors associated with cardiovascular morbidity and mortality in Spanish incident hemodialysis patients: two-year results from the ANSWER Study. *Blood Purif*. 2011;33:21–29.
- ▶ 12. Yen TH, Lin JL, Lin-Tan DT, Hsu CW. Association between body mass and mortality in maintenance hemodialysis patients. *Ther Apher Dial*. 2010;14:400–408.
- ▶ 13. Tanner RM, Brown TM, Muntner P. Epidemiology of obesity, the metabolic syndrome, and chronic kidney disease. *Curr Hypertens Rep*. 2012;14:152–159.
- ▶ 14. Kalantar-Zadeh K, Abbott KC, Salahudeen AK, Kilpatrick RD, Horwich TB. Survival advantages of obesity in dialysis patients. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:543–554.
- ▶ 15. Kalaitzidis RG, Siamopoulos KC. The role of obesity in kidney disease: recent findings and potential mechanisms. *Int Urol Nephrol*. 2011;43:771–784.
- ▶ 16. Hillman RS, Ault KA. Clinical approach to anemia. In: Hillman RS, Ault KA. eds. *Hematology in Clinical Practice*. 3rd edn. New York: McGraw-Hill; 2002:12–26.
- ▶ 17. Strippoli GF, Manno C, Schena FP, Craig JC. Hemoglobin and hematocrit targets for the anaemia of chronic renal disease

- (Cochrane review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;1: CD003967.
- ▶ 18. Costa E, Lima M, Alves JM, et al. Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy. *J Clin Immunol.* 2008;28:268–275.
  - ▶ 19. Costa E, Pereira BJ, Rocha-Pereira P, et al. Role of prohepcidin, inflammatory markers and iron status in resistance to rhEPO therapy in hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2008;28:677–683.
  - ▶ 20. Bazeley J, Bieber B, Li Y, et al. C-reactive protein and prediction of 1-year mortality in prevalent hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6:2452–2456.
  - ▶ 21. Libetta C, Sepe V, Esposito P, Galli F, Dal Canton A. Oxidative stress and inflammation: implications in uremia and hemodialysis. *Clin Biochem.* 2011;44:1189–1198.
  - ▶ 22. Jacober ML, Mamoni RL, Lima CS, Dos Anjos BL, Grotto HZ. Anaemia in patients with cancer: role of inflammatory activity on iron metabolism and severity of anaemia. *Med Oncol.* 2007;24: 323–329.
  - ▶ 23. Fleming RE, Sly WS. Heparin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:8160–8162.
  - ▶ 24. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* 2006;108:3204–3209.
  - ▶ 25. Dallalio G, Fleury T, Means RT. Serum hepcidin in clinical specimens. *Br J Hematol.* 2003;122:996–1000.
  - ▶ 26. Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, et al. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary hemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anemia. *Gut.* 2004;53:735–743.
  - ▶ 27. Hsu SP, Ching CK, Chien CT, Hung KY. Plasma prohepcidin positively correlates with hematocrit in chronic hemodialysis patients. *Blood Purif.* 2006;24:311–316.
  - ▶ 28. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:911–920.
  - ▶ 29. Fantuzzi G. Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:326–330.
  - ▶ 30. Vokurka M, Krijt J, Sulc K, Necas E. Heparin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res.* 2006;55:667–674.
  - ▶ 31. Nascimento H, Silva L, Lourenço P, et al. Lipid profile in Portuguese obese children and adolescents: interaction of apolipoprotein E polymorphism with adiponectin levels. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2009;163:1030–1036.
  - ▶ 32. Nascimento H, Costa E, Rocha-Pereira P, et al. Cardiovascular risk factors in portuguese obese children and adolescents: impact of small reductions in body mass index imposed by lifestyle modifications. *Open Biochem J.* 2012;6:43–50.
  - ▶ 33. Adamczak M, Chudek J, Wiecek A. Adiponectin in patients with chronic kidney disease. *Semin Dial.* 2009;22:391–395.
  - ▶ 34. Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Antoniadi G, Kartsios C, Stefanidis I. The role of hepcidin in iron homeostasis and anemia in hemodialysis patients. *Semin Dial.* 2009;22:70–77.
  - ▶ 35. Tussing-Humphreys LM, Nemeth E, Fantuzzi G, et al. Elevated systemic hepcidin and iron depletion in obese premenopausal females. *Obesity.* 2010;18:1449–1456.



Artigo 4:

**“Adiponectin is an independent predictor of tissue plasminogen activator levels in patients under haemodialysis”**

*Autores:* Maria do Sameiro Faria, Sandra Ribeiro, Henrique Nascimento, Petronila Rocha-Pereira, Vasco Miranda, Denisa Mendonça, Alexandre Quintanilha, Elísio Costa, Luís Belo, Alice Santos-Silva.

*Revista:* Scandinavian Journal of Urology and Nephrology 2012; 46: 461-465.



## ORIGINAL ARTICLE

**Adiponectin is an independent predictor of tissue plasminogen activator levels in patients under haemodialysis**

MARIA DO SAMEIRO FARIA<sup>1,2\*</sup>, SANDRA RIBEIRO<sup>3,4\*</sup>, HENRIQUE NASCIMENTO<sup>3,4</sup>,  
PETRONILA ROCHA-PEREIRA<sup>4,5</sup>, VASCO MIRANDA<sup>1</sup>, DENISA MENDONÇA<sup>2,6</sup>,  
ALEXANDRE QUINTANILHA<sup>2,4</sup>, ELÍSIO COSTA<sup>4,7</sup>, LUÍS BELO<sup>3,4</sup> &  
ALICE SANTOS-SILVA<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>FMC, Dinefro – Diálises e Nefrologia – SA, Portugal, <sup>2</sup>Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS),  
<sup>3</sup>Faculdade Farmácia, Serviço de Bioquímica, <sup>4</sup>Instituto Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto,  
Portugal, <sup>5</sup>Centro Investigação Ciências Saúde (CICS), Universidade Beira Interior, Covilhã, Portugal, <sup>6</sup>Instituto de  
Saúde Pública da Universidade do Porto (ISPUP), Porto, Portugal, and <sup>7</sup>Instituto de Ciências da Saúde da Universidade  
Católica Portuguesa, Porto, Portugal

**Abstract**

*Objective.* The aim of this study was to evaluate the association of tissue-type plasminogen activator (t-PA) levels with clinical data of patients under haemodialysis (HD) and with several variables potentially related to endothelial function and dysfunction. *Material and methods.* In a cross-sectional study involving 189 Portuguese HD patients, circulating levels of t-PA, lipids, oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL), interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), adiponectin, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and fibrin fragment D-dimer were measured. *Results.* Considering the entire population, t-PA correlated inversely and significantly with adiponectin and high-density lipoprotein-cholesterol, and positively and significantly with age, body mass index, PAI-1, IL-6, CRP, D-dimer, cholesterol and Ox-LDL. In multiple linear regression analysis PAI-1, age and adiponectin remained statistically associated with t-PA values ( $p < 0.01$  for all). The weakest significant association ( $p = 0.046$ ) was that found between t-PA and D-dimer. *Conclusion.* Adiponectin is a main determinant of t-PA level, which may be a good marker of endothelial dysfunction in HD patients.

**Key Words:** *adiponectin, haemodialysis, inflammation, tissue plasminogen activator*

**Introduction**

Recent investigations have paid particular attention to the study of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in haemodialysis (HD) patients. Hemmelgarn et al. [1] reported that the use of recombinant t-PA once weekly, compared with the use of heparin three times a week, significantly prevented dialysis catheter malfunction. Furthermore, the thrombolytic treatment of acute stroke in HD patients frequently involves the use of recombinant t-PA [2].

Since t-PA is primarily produced and secreted into the blood by vascular endothelial cells, it can be used as a marker of endothelial function and dysfunction [3]. It plays an important role in fibrinolysis, by promoting the conversion of plasminogen to plasmin. This protease cleaves fibrin to produce fibrin degradation products, usually assayed as cross-linked fibrin fragments (D-dimer). The activity of t-PA is mainly controlled by plasminogen activator inhibitors (PAIs), and the endothelial PAI type 1 (PAI-1) is believed to be the main inhibitor of t-PA, with both

Correspondence: A. Santos-Silva, Departamento de Ciências Biológicas, Serviço de Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 4050-047 Porto, Portugal. Tel: +35 1 222078907. Fax: +35 1 222003977. E-mail: assilva@ff.up.pt

\*These authors contributed equally to this work.

(Received 31 October 2011; revised 31 May 2012; accepted 26 June 2012)

ISSN 0036-5599 print/ISSN 1651-2065 online © 2012 Informa Healthcare

DOI: 10.3109/00365599.2012.708943

t-PA and PAI-1 being mainly produced by endothelial cells.

In obesity, a state of low-grade chronic inflammation develops, with the production of adipokines, namely, interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor- $\alpha$ , that may lead to insulin resistance, dyslipidaemia and endothelial dysfunction [4]. The adipose tissue is also a source of PAI-1 and C-reactive protein (CRP), although the major circulating CRP is of hepatic origin, where its synthesis is promoted by the proinflammatory cytokine IL-6 [5]. In contrast to other adipocytokines, adiponectin has been noted as an important antiatherogenic, an antidiabetic and an anti-inflammatory protein, and its plasma concentration is decreased in obese subjects [5]. In HD patients, significant rises in IL-6 and CRP have also been reported, as well as significant increases in D-dimers and the t-PA/PAI-1 ratio.

It is suggested that the elevated inflammatory state observed in HD patients could favour the same disturbances occurring in obesity, i.e. endothelial dysfunction. Therefore, this study evaluated, in HD patients, the association of t-PA levels with clinical data and with analytical variables that have been related to endothelial function, namely, the lipid profile (including Ox-LDL), and inflammatory (IL-6, CRP and adiponectin) and haemostatic (PAI-1 and D-dimer) variables.

## Material and methods

### Subjects

In total, 189 Portuguese chronic kidney disease (CKD) patients under HD and recombinant human erythropoietin (rhEPO) therapies were studied. The rhEPO maintenance dose was 0.42 (0.20–0.70)  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$  of darbepoietin- $\alpha$ . Intravenous iron supplementation was based on the European Best Practice Guidelines for the management of anaemia in patients under haemodialysis and rhEPO therapies [6]. All participants gave their informed consent to participate in this study, which was previously approved by the ethics committee of the Clinics of Hemodialysis. Patients with autoimmune disease, malignancy and acute or chronic infections were excluded. CKD patients were under therapeutic HD three times per week, for 3–5 h. All patients used high-flux Polysulfone FX-class dialysers (Fresenius).

### Blood samples

Blood samples were obtained immediately before the HD procedure and processed within 2 h of collection. Blood was collected to citrate-containing tubes and to

tubes without anticoagulant, to obtain plasma and serum, respectively. Aliquots were immediately stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until assayed.

Serum lipids and lipoproteins were analysed in an autoanalyser (Cobas Mira S, Roche) using commercially available kits. Plasma concentrations of Ox-LDL, adiponectin, IL-6, t-PA and PAI-1 were evaluated using standard commercial enzyme-linked immunoassays (Oxidized LDL ELISA, Mercodia; adiponectin, IL-6 ELISA High-Sensitivity, t-PA, PAI-1, all from eBioscience). D-dimer and CRP were evaluated by immunoturbidimetry, using commercially available kits [BCS XP system, Siemens; CRP (latex) High-Sensitivity, Roche Diagnostics].

### Statistical analysis

The distributions of continuous variables were analysed using Kolmogorov–Smirnov tests to assess significant departures from normality. Normally distributed variables are presented as mean  $\pm$  SD and non-normally distributed variables as median (interquartile range). Comparisons between two groups were performed using Student's unpaired *t* test or Mann–Whitney U test. The association between categorical variables was analysed using the chi-squared test and Fisher's exact test.

The strength of the association between the variables was estimated by Pearson's correlation coefficient, after log transformation of the variables (whenever necessary). To evaluate the contribution of the different variables to t-PA levels, multiple regression analysis was performed, using stepwise selection, with an entry criterion of  $p < 0.05$ .

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 16.0) for Windows. Statistical significance was accepted at  $p < 0.05$ .

## Results

Clinical and analytical data from patients are presented in Table I. The mean age of participants was 65.9 years old, and the majority were non-diabetic (64.6%) and used an arteriovenous fistula (77.3%) for vascular access.

The CKD patients were divided in two groups according to their t-PA levels, using a cut-off of 5.33 ng/ml, corresponding to the median t-PA value observed for the entire studied group. The group with higher t-PA ( $\geq 5.33$  ng/ml) presented with significantly higher age and body mass index (BMI) values, significantly higher levels of PAI-1, D-dimer, IL-6 and CRP, and significantly lower levels of adiponectin (Table I). The group with higher



Table I. Clinical and laboratory data for total haemodialysis (HD) patients, and according to tissue plasminogen activator (t-PA) levels (lower or higher than the median value observed for total patients, 5.33 ng/ml).

	All HD patients	t-PA < 5.33 ng/ml	t-PA ≥ 5.33 ng/ml	<i>p</i> <sup>a</sup>
	( <i>n</i> = 189)	( <i>n</i> = 94)	( <i>n</i> = 95)	
Age (years)	65.97 ± 14.02	62.60 ± 14.96	69.27 ± 12.23	0.001
Gender (males)	105 (55.60%)	50 (53.20%)	55 (57.90%)	0.515
Diabetes mellitus	67 (35.40%)	27 (28.70%)	40 (42.10%)	0.054
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.84 ± 4.58	24.84 ± 4.05	26.80 ± 4.87	0.003
Duration of treatment (years)	2.11 (0.82–4.80)	2.36 (0.81–5.37)	1.94 (0.89–4.08)	0.424
Vascular access				
Arteriovenous fistula	146 (77.30%)	72 (76.60%)	74 (77.90%)	0.831
Venous catheter	43 (22.70%)	22 (23.40%)	21 (22.10%)	
t-PA (ng/ml)	5.33 (3.72–8.10)	3.72 (2.72–4.68)	8.08 (6.17–9.66)	
PAI-1 (ng/ml)	18.69 (12.15–32.41)	13.52 (10.45–20.99)	27.50 (16.93–45.52)	< 0.001
D-dimer (mg/l)	0.70 (0.37–1.55)	0.59 (0.32–1.05)	0.88 (0.46–1.65)	0.005
IL-6 (pg/ml)	2.26 (1.38–4.21)	1.80 (1.14–2.84)	3.33 (1.95–5.04)	< 0.001
CRP (mg/l)	5.13 (2.32–13.0)	3.40 (1.80–8.62)	7.45 (3.47–16.2)	< 0.001
Triglycerides (mg/dl)	119.00 (90.50–176.50)	118.50 (90.00–176.25)	119.00 (95.00–177.00)	0.644
Cholesterol (mg/dl)	151.00 (125.50–176.00)	147.00 (123.75–176.00)	153.00 (129.00–176.00)	0.451
HDL-C (mg/dl)	38.00 (32.05–52.00)	40.00 (32.30–53.45)	37.00 (32.00–49.30)	0.452
LDL (mg/dl)	69.00 (51.20–92.00)	68.15 (50.08–93.08)	70.40 (52.00–91.00)	0.792
Ox-LDL (U/l)	33.80 (27.80–40.65)	33.85 (27.28–40.10)	33.70 (28.10–40.80)	0.418
Adiponectin (mg/l)	8.74 (5.93–11.70)	9.86 (7.47–12.48)	6.99 (4.80–10.74)	< 0.001

Data are shown as mean ± SD, *n* (%) or median (interquartile range).

<sup>a</sup>Lower t-PA group versus higher t-PA group.

BMI = body mass index; PAI-1 = plasminogen activator inhibitor type 1; IL-6 = interleukin-6; CRP = C-reactive protein; HDL-C = high-density lipoprotein-cholesterol; Ox-LDL = oxidized low-density lipoprotein.

t-PA also included a higher proportion of diabetic patients, and this result almost reached statistical significance ( $p = 0.054$ ). However, significant differences were found for t-PA levels between diabetic and non-diabetic CKD patients median (interquartile range): 5.97 (4.47–9.03) vs 5.03 (3.65–6.65),  $p = 0.010$ .

The type of vascular access (arteriovenous fistula vs venous catheter) was not associated with differences in t-PA levels median (interquartile range): 5.34 (3.68–8.15) vs 5.33 (4.08–8.08),  $p = 0.813$ .

Considering the entire population, t-PA levels correlated inversely and significantly with adiponectin ( $r = -0.340$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 1) and high-density lipoprotein-cholesterol ( $r = -0.170$ ,  $p = 0.019$ ); moreover, t-PA correlated positively and significantly with PAI-1 ( $r = 0.510$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 1), age ( $r = 0.288$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 1), BMI ( $r = 0.252$ ,  $p = 0.001$ ), D-dimer ( $r = 0.148$ ,  $p = 0.046$ ), IL-6 ( $r = 0.250$ ,  $p = 0.001$ ), CRP ( $r = 0.217$ ,  $p = 0.003$ ), cholesterol ( $r = 0.168$ ,  $p = 0.021$ ) and Ox-LDL ( $r = 0.171$ ,  $p = 0.018$ ). In multiple linear regression analysis, PAI-1, age and adiponectin remained statistically associated with t-PA values (Figure 1 and Table II).

BMI values were found to be inversely and significantly correlated with adiponectin concentration ( $r = -0.405$ ,  $p < 0.001$ ).

Within both subgroups of patients, t-PA levels were not significantly correlated with D-dimer levels ( $p > 0.9$  for both). BMI values remained inversely correlated with adiponectin within subgroups ( $p < 0.02$  for both).

## Discussion

Recent investigations focused particular attention on the potential use of recombinant t-PA in prothrombotic clinical situations associated with HD [1,2]. As t-PA is mainly produced by endothelial cells, it is also used as a marker of endothelial function and dysfunction. Considering the strong association of CKD with dyslipidaemia, inflammation and a high prevalence of cardiovascular events, this study evaluated the lipid profile, and some inflammatory and haemostatic variables, to determine whether they are major determinants of the t-PA levels in HD patients.

In the present study, patients with higher t-PA levels presented with higher D-dimer levels (Table I),

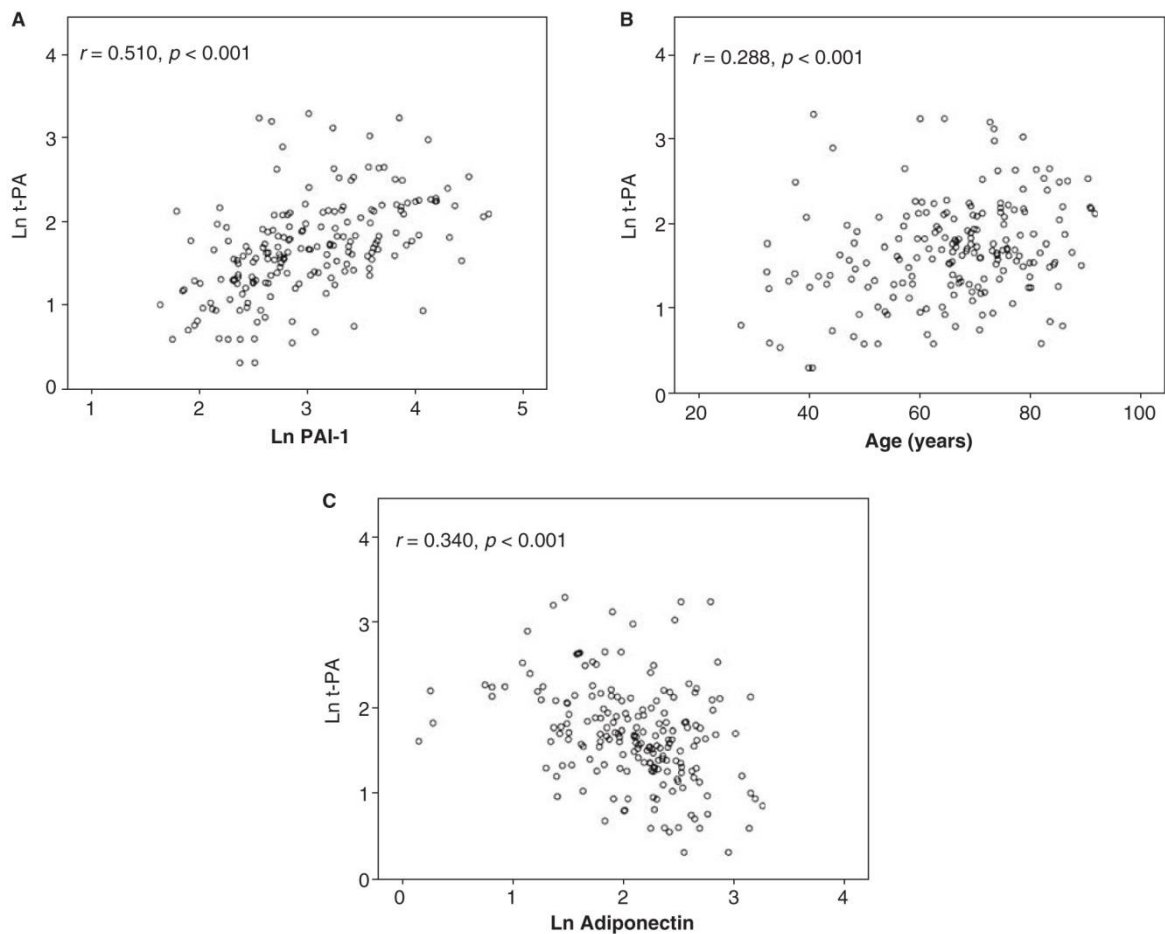


Figure 1. Associations between tissue plasminogen activator (t-PA) levels and (A) plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), (B) age of patients and (C) adiponectin levels in chronic kidney disease patients under haemodialysis. Pearson's correlation values are shown.

but when all patients were analysed together, t-PA levels were not strongly positively correlated with D-dimer levels ( $p = 0.046$ ). Furthermore, within both subgroups of patients, t-PA levels were far from being correlated with D-dimer levels ( $p > 0.91$  for both), suggesting that the release of t-PA is not accompanied

by a proportional degree of fibrinolysis. This suggests that HD patients, particularly patients with higher t-PA, present with endothelial dysfunction, which is a known risk factor for cardiovascular disease [4].

The patients with higher t-PA also presented with higher BMI, higher age and an enhanced

Table II. Main determinants of tissue plasminogen activator (t-PA) levels by multiple linear regression analysis.

Dependent variable	Model	Unstandardized coefficients		Standardized coefficients		
		B	SE	Beta	t	p
Ln t-PA	(Constant)	0.506	0.316		1.598	0.112
	Ln PAI-1	0.349	0.062	0.390	5.661	< 0.001
	Age (years)	0.009	0.003	0.200	3.110	0.002
	Ln Adiponectin	-0.202	0.074	-0.184	-2.733	0.007

PAI-1 = plasminogen activator inhibitor type 1; SE = standard error.

inflammatory state, as shown by the increased levels of IL-6, CRP and PAI-1, and the reduced adiponectin. This is in agreement with the fact that inflammation is closely related to both adiposity and endothelial dysfunction. Indeed, adipose tissue is a source of PAI-1 and IL-6 (two recognized proinflammatory adipokines), and increased levels of IL-6 and CRP are frequently associated with endothelial dysfunction [5]. These results are, therefore, in agreement with a positive relation between t-PA (a marker of endothelial function and dysfunction) and inflammatory markers. However, in multiple regression analysis only PAI-1, the age of the patients and adiponectin were independently associated with t-PA.

The strong positive correlation found between t-PA and PAI-1 may be explained by the fact that both substances are produced and released by endothelial cells into circulating blood. However, PAI-1 is an adipokine, whereas t-PA is not. When PAI-1 was removed from the model, adiponectin was the best predictor of t-PA levels. Adiponectin is an antidiabetic and anti-inflammatory protein and its circulating levels are inversely related to adiposity markers (in the present study BMI correlated with Ln adiponectin:  $r = -0.405$ ,  $p < 0.001$ ). Thus, overweight and obese patients seem to lose the protective properties of this important adipokine. It is important to highlight that adiponectin appears to have important effects on the endothelium, modulating its function. For example, adiponectin suppresses adhesion molecule expression in vascular endothelial cells [7], decreases endothelial oxidative stress and increases endothelial nitric oxide synthase activity [8,9]. Adiponectin may also have a vascular protective effect by inhibiting Ox-LDL-induced cell proliferation and suppressing cellular superoxide generation [9]. Furthermore, it has been demonstrated that decreased levels of circulating adiponectin correlate with endothelial dysfunction in arteries [10].

In summary, the present study demonstrated that adiponectin is a main determinant of t-PA levels in CKD patients under HD, together with PAI-1 and age of the patients. The results suggest that t-PA may work as a good marker of endothelial dysfunction in HD patients, and that adiponectin is likely to explain most of the obesity-induced cell dysfunction. Future work should address the potential value of t-PA in the assessment of CVD risk in HD patients and whether a reduction in adiposity (together with inflammation) may represent a substantial prognostic improvement in these patients.

## Acknowledgements

We are very grateful to FMC, Dinefro-Diálises e Nefrologia, SA, and Uninefro-Sociedade Prestadora de Cuidados Médicos e de Diálise, SA, and to their nurses for their technical support. This study was supported by “Fundação para a Ciência e Tecnologia” (FCT: PIC/IC/83221/2007) and co-financed by FEDER (FCOMP-01-0124-FEDER-008468).

**Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- [1] Hemmelgarn BR, Moist LM, Lok CE, Tonelli M, Manns BJ, Holden RM, et al. Prevention of Dialysis Catheter Lumen Occlusion with rt-PA versus Heparin Study Group: Prevention of dialysis catheter malfunction with recombinant tissue plasminogen activator. *N Engl J Med* 2011;364:303–12.
- [2] Palacio S, Gonzales NR, Sangha NS, Birnbaum LA, Hart RG. Thrombolysis for acute stroke in hemodialysis: international survey of expert opinion. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:1089–93.
- [3] Belo L, Santos-Silva A, Rumley A, Lowe G, Pereira-Leite L, Quintanilha A, et al. Elevated tissue plasminogen activator as a potential marker of endothelial dysfunction in pre-eclampsia: correlation with proteinuria. *Br J Obstet Gynaecol* 2002;109:1250–5.
- [4] Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006;444:875–80.
- [5] Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2010;802078.
- [6] Locatelli F, Aljama P, Barany P, Canaud B, Carrera F, Eckardt KU, et al. European Best Practice Guidelines Working Group: revised European best practice guidelines for the management of anemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(Suppl. 2):ii1–47.
- [7] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473–6.
- [8] Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:45021–6.
- [9] Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:264–71.
- [10] Okui H, Hamasaki S, Ishida S, Kataoka T, Orihara K, Fukudome T, et al. Adiponectin is a better predictor of endothelial function of the coronary artery than HOMA-R, body mass index, immunoreactive insulin, or triglycerides. *Int J Cardiol* 2008;126:53–61.



Artigo 5:

**“Main Determinants of PON1 Activity in Hemodialysis Patients”**

*Autores:* Sandra Ribeiro, Maria do Sameiro Faria, Filipa Mascarenhas-Melo, Isabel Freitas, Maria Isabel Mendonça, Henrique Nascimento, Petronila Rocha-Pereira, Vasco Miranda, Denisa Mendonça, Alexandre Quintanilha, Luís Belo, Elísio Costa, Flávio Reis, Alice Santos-Silva.

*Revista:* American Journal of Nephrology 2012; 36: 317-323.



# Main Determinants of PON1 Activity in Hemodialysis Patients

Sandra Ribeiro<sup>a,b</sup> Maria do Sameiro Faria<sup>c,d</sup> Filipa Mascarenhas-Melo<sup>e</sup> Isabel Freitas<sup>f,g</sup>  
Maria Isabel Mendonça<sup>f</sup> Henrique Nascimento<sup>a,b</sup> Petronila Rocha-Pereira<sup>b,h</sup>  
Vasco Miranda<sup>c</sup> Denisa Mendonça<sup>d,i</sup> Alexandre Quintanilha<sup>b,d</sup> Luís Belo<sup>a,b</sup>  
Elísio Costa<sup>b,j</sup> Flávio Reis<sup>e</sup> Alice Santos-Silva<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Farmácia, Serviço de Bioquímica, <sup>b</sup>Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Porto, <sup>c</sup>FMC, Dinefro – Diálises e Nefrologia, SA, Maia, <sup>d</sup>Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, <sup>e</sup>Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, <sup>f</sup>Unidade de Investigação, Hospital Central do Funchal, <sup>g</sup>Laboratório de Genética Humana, Campus Universitário da Penteadá, Funchal, <sup>h</sup>Centro Investigação Ciências Saúde, Universidade Beira Interior, Covilhã, <sup>i</sup>Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto, and <sup>j</sup>Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal

## Key Words

Hemodialysis · Genetic factors · Non-genetic factors · Paraoxonase 1

## Abstract

**Background/Aims:** Cardiovascular diseases are the major cause of morbidity and mortality in hemodialysis (HD) patients. These patients present reduced paraoxonase 1 (PON1) activity that depends on genetic and non-genetic factors; however, how these factors influence PON1 activity in HD patients is poorly clarified. Our aim was to evaluate the influence of two polymorphisms and non-genetic factors on PON1 activity in HD patients. **Methods:** We evaluated 183 HD patients under recombinant human erythropoietin (rhEPO) treatment and 22 healthy individuals. The lipid profile [total cholesterol, triglycerides, HDL-c, LDL-c, apolipoprotein (Apo) A-I, Apo B, lipoprotein(a) and oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL)], inflammatory markers [adiponectin, interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP)], PON1 activity and

*PON1* gene polymorphisms (L55M and Q192R) were evaluated. **Results:** HD patients presented higher levels of IL-6, CRP and Ox-LDL/LDL-c, and lower PON1 activity, total cholesterol, HDL-c, LDL-c, Apo A and Apo B; the most frequent genotype was heterozygosity for L55M polymorphism and homozygosity for the Q allele, the more frequent genotype of Q192R polymorphism. Multiple regression analysis identified heterozygosity and homozygosity for L55M and Q192R polymorphisms, very low-density lipoproteins, LDL-c, Apo A and CRP levels, time on dialysis and rhEPO dose, as the independent variables significantly associated with PON1 activity. The associations with CRP, rhEPO and time on dialysis were negative. **Conclusion:** Our results show that the reduced PON1 activity in HD patients who are not under statin therapy is strongly associated with inflammation, longer time on dialysis and high rhEPO doses, suggesting that the reduction in PON1 activity may worsen the prognosis of these patients.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

## KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel  
0250-8095/12/0364-0317\$38.00/0

Accessible online at:  
www.karger.com/ajn

Alice Santos-Silva  
Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas  
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto  
Rua de Jorge Viterbo Ferreira 228, PT-4050-313 Porto (Portugal)  
E-Mail assilva@ff.up.pt

## Introduction

Human serum paraoxonase 1 (PON1) is an enzyme primarily synthesized by the liver that has been associated with lipoproteins, mainly with high-density lipoproteins (HDL). PON1 seems to have antiatherogenic, anti-oxidative and anti-inflammatory properties as it protects HDL and low-density lipoproteins (LDL) from oxidation, and hydrolyzes oxidized lipids [1]. In vitro studies showed that PON1 is also associated with very low-density lipoproteins (VLDL) and still presents antiatherogenic properties; however, its activity is lower than that presented when associated with HDL [2].

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause for the high morbidity and mortality observed in hemodialysis (HD) patients [3]. Usually, these patients present with high levels of inflammation and oxidative stress that are known to favor the atherosclerotic processes and, therefore, may contribute to the increased cardiovascular risk in HD patients [3]. Recently, it has been reported that patients undergoing HD present a reduced PON1 activity, which could contribute to the high rate of CVD in these patients [4, 5].

The activity of this enzyme is influenced by genetic and non-genetic factors [5–7]. Two polymorphisms in the coding region of PON1 gene, namely L55M (leucine to methionine substitution at position 55) and Q192R (glutamine to arginine substitution at position 192), reduce the activity of this enzyme [6, 7]. The L55M polymorphism is associated with a decrease in mRNA expression and, therefore, with decreased PON1 activity [8]. Moreover, Q192R polymorphism is also associated with a decrease in PON1 activity, as this polymorphism affects the kinetics of hydrolysis of PON1 substrates [8].

How genetic and non-genetic factors influence PON1 activity in HD patients remains to be elucidated. The aim of our study was to evaluate the influence of genetic (L55M and Q192R polymorphisms) and non-genetic factors on PON1 activity in a group of HD patients.

## Subjects and Methods

### Patients

We studied a group of 183 HD patients (102 males, 81 females; mean age  $66.23 \pm 13.96$  years old) under recombinant human erythropoietin (rhEPO) treatment [ $0.43 (0.20 - 0.75) \mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$  of darbepoietin- $\alpha$ ]. The patients were also under intravenous iron supplementation according to the European Best Practice Guidelines for the management of anemia in patients under HD and rhEPO therapies [9]. All participants gave their informed consent

to participate in this study that was previously approved by the Ethics Committee of the Clinics of Hemodialysis. Patients with autoimmune disease, malignancy, and acute or chronic infection were excluded. Some patients (40.44%) were under statins therapy.

HD patients were under therapeutic HD three times per week for 3–5 h for a median of 2.13 (0.81–5.24) years. All patients used the high-flux polysulfone FX-class dialyzers of Fresenius. The main causes of renal failure in this population were as follows: diabetic nephropathy ( $n = 66$ ), hypertensive nephrosclerosis ( $n = 21$ ), nephritic syndrome ( $n = 9$ ), polycystic kidney disease ( $n = 8$ ), obstructive diseases ( $n = 7$ ), hereditary nephropathy ( $n = 3$ ), chronic interstitial nephritis ( $n = 2$ ), benign prostate hypertrophy ( $n = 1$ ), systemic lupus erythematosus ( $n = 1$ ), other diseases ( $n = 4$ ) and of uncertain etiology ( $n = 61$ ). A group of 22 apparently healthy individuals, matched as far as possible for age and gender (10 males, 14 females; mean age  $36.03 \pm 10.34$  years old), were selected as controls, based on no history of kidney, inflammatory or infectious diseases, no history of CVD and under no regular medications that could interfere with our results.

### Blood Samples

Blood samples were obtained immediately before HD procedure and processed within 2 h of collection. Blood was collected to EDTA-containing tubes and to tubes without anticoagulant in order to obtain plasma, buffy coat and serum. Aliquots were immediately stored at  $-80^\circ\text{C}$  until assayed.

### Lipid Profile

Serum lipids, lipoproteins and apolipoprotein (Apo) analysis were performed in an auto-analyzer (Cobas Mira S, Roche) using commercially available kits. Serum total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) concentrations were determined by enzymatic colorimetric tests (CHOD-PAP and GPO-PAP methods, Roche, respectively). HDL cholesterol (HDL-c) and LDL cholesterol (LDL-c) levels were measured by using enzymatic colorimetric tests after selective separation of HDL and LDL fractions (Direct HDLCholesterol and Direct LDLCholesterol, Roche). Serum Apo A-I and Apo B levels were evaluated by immunoturbidimetric assays (uni-kit apolipoprotein A-I- and B-specific antisera, Roche). Serum lipoprotein(a), Lp(a), was quantified by using an immunoturbidimetric method (Lp(a), Roche Diagnostics). Plasma concentration of oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) was evaluated by using a standard commercial enzyme-linked immunoassay (Oxidized LDL ELISA, Mercodia, eBioscience).

### Inflammatory Markers

Plasma concentrations of adiponectin and interleukin (IL)-6 were evaluated by using standard commercial enzyme-linked immunoassays (adiponectin, IL-6 ELISA High-Sensitivity, Mercodia, eBioscience). C-reactive protein (CRP) was evaluated by immunoturbidimetry, using commercially available kits [CRP (latex) High-Sensitivity, Roche Diagnostics].

### Activity and Screening for L55M and Q192R Polymorphisms on PON1 Gene

The activity of PON1 was assessed spectrophotometrically and expressed in nmol of p-nitrofenol/ml/min. Briefly, PON1 activity was measured by adding serum to 1 ml Tris/HCl buffer (100



**Table 1.** Biochemical data of HD patients and controls

Parameters	Controls (n = 22)	HD patients (n = 183)	p	HD patients with statins (n = 74)	HD patients without statins (n = 109)	p
Creatinine, mg/dl	–	8.50 (6.25–11.83)		8.54 (6.10–12.06)	8.47 (6.30–11.80)	0.716
Kt/Ve	–	1.48 (1.30–1.60)		1.40 (1.20–1.60)	1.50 (1.38–1.60)	0.138
Urea, mg/dl	–	140.20 ± 41.01		137.41 ± 41.05	142.11 ± 41.06	0.480
Albumin, g/dl	–	3.90 (3.53–4.16)		3.99 (3.50–4.19)	3.89 (3.54–4.11)	0.266
BMI	21.85 ± 2.05	25.87 ± 4.64	<0.001	27.66 ± 4.97	24.63 ± 3.96	<0.001
IL-6, pg/ml	0.39 (0.27–0.58)	2.24 (1.35–4.27)	<0.001	2.24 (1.36–3.93)	2.28 (1.33–4.30)	0.768
CRP, mg/dl	0.06 (0.04–0.14)	0.49 (0.22–1.33)	<0.001	0.61 (0.23–1.27)	0.46 (0.22–1.40)	0.796
PON1						
nmol p-nitrofenol/ml/min	466.76 (399.06–542.08)	362.56 (323.46–463.30)	<0.001	373.40 (320.51–462.43)	358.81 (325.65–464.05)	0.901
TC, mg/dl	202.27 ± 27.77	154.10 ± 43.72	<0.001	150.79 ± 36.00	156.40 ± 48.39	0.448
TG, mg/dl	98.50 (84.25–135.75)	119.00 (90.00–177.00)	0.043	120.00 (97.00–183.00)	116.50 (86.25–173.75)	0.286
HDL-c, mg/dl	46.00 (40.00–60.25)	42.60 ± 13.70	0.002	42.08 ± 13.34	42.95 ± 14.00	0.664
LDL-c, mg/dl	104.36 ± 25.82	73.23 ± 29.33	<0.001	71.16 ± 28.41	74.67 ± 30.00	0.369
HDL/LDL ratio	0.52 ± 0.20	0.68 ± 0.39	0.033	0.69 ± 0.36	0.68 ± 0.43	0.680
VLDL, mg/dl	19.70 (16.85–27.15)	23.80 (18.00–35.40)	0.048	24.00 (19.20–36.60)	23.30 (17.25–35.15)	0.378
Lp(a), mg/dl	25.10 (14.10–62.03)	45.40 (25.85–89.05)	0.021	58.40 (33.25–107.10)	39.85 (24.05–77.33)	0.008
Apo A, mg/dl	150.73 ± 23.57	121.95 ± 30.41	<0.001	125.19 ± 30.60	119.19 ± 30.10	0.105
Apo B, mg/dl	89.09 ± 13.48	72.33 ± 21.81	<0.001	71.59 ± 20.26	72.85 ± 22.91	0.821
PON1/HDL-c ratio	10.48 (7.42–12.33)	9.38 (7.70–12.03)	0.501	9.12 (6.78–12.88)	9.19 (7.72–11.26)	0.904
PON1/Apo A ratio	3.02 (2.56–3.67)	3.22 (2.64–3.99)	0.729	2.92 (2.33–3.84)	3.25 (2.73–4.05)	0.055
OxLDL, U/l	39.66 ± 11.10	35.95 ± 15.63	0.058	35.04 ± 10.55	36.59 ± 18.37	0.829
OxLDL/LDL ratio, U/mg	0.040 ± 0.013	0.053 ± 0.018	<0.001	0.054 ± 0.017	0.052 ± 0.019	0.405
Adiponectin, mg/l	5.24 ± 2.29	9.25 ± 4.73	<0.001	7.69 ± 3.97	10.33 ± 4.92	<0.001

Results are presented as mean ± SD or median (interquartile range) unless otherwise indicated. p values were obtained using Mann-Whitney U test or Pearson  $\chi^2$  test. BMI = Body mass index.

mmol/l, pH 8.0) containing 2 mmol/l CaCl<sub>2</sub> and 5.5 mmol/l paraoxon (O,O-diethyl-O-p-nitrophenylphosphate, Sigma Chemical, Co.). The rate of generation of p-nitrophenol was determined by reading the absorbance at 412 nm, 37°C, with the use of a continuously recording spectrophotometer (Beckman DU-68).

To screen for presence of *PON1* gene polymorphisms, genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using the standard salting-out extraction method, as previously described [10, 11]. The genotype screening was performed with allele-specific fluorogenic oligonucleotide probes in an assay combining the polymerase chain reaction and the 5' nuclease reaction.

#### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the IBM Statistical Package for Social Sciences for Windows, version 19.0. Statistical significance was accepted at  $p < 0.05$ . The distribution of continuous variables was analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test to assess significant deviations from normality. Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U test or the Kruskal-Wallis test. The association between categorical variables was analyzed using the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test. To evaluate the contribution of the different studied variables on *PON1* activity, multiple regression analysis was performed using stepwise selection with an entry criterion of  $p < 0.05$ .

## Results

Compared to controls (table 1), our HD patients presented significantly higher levels of the inflammatory markers IL-6 and CRP. The *PON1* activity was significantly lower in HD patients compared to control subjects. Some differences were found in the lipid profile of HD patients, namely significantly lower levels of TC, HDL-c, LDL-c, Apo A and Apo B; Ox-LDL was not different from controls; however, the Ox-LDL/LDL-c ratio was significantly higher; no significant differences were found for *PON1*/HDL-c and *PON1*/Apo A ratios. Significantly higher levels of adiponectin were also found in HD patients.

The most frequent genotype found in HD patients (table 2) was LM for L55M polymorphism, which was associated to a *PON1* activity higher than MM and lower than LL polymorphisms. QQ was the more frequent genotype for Q192R polymorphism, presenting the lowest *PON1* activity, as compared to QR and RR genotypes. Moreover, the most frequent association of these two polymorphisms is LM/QQ (27.9%), followed by the LM/QR (21.3%) and LL/QR genotypes (15.9%). Significantly higher *PON1*

**Table 2.** Genotype frequencies of PON1 polymorphisms and activity in hemodialysis patients

Genotype	HD patients (n = 183)		PON 1 activity nmol p-nitrofenol/ ml/min
	n	%	
PON 1 L55M			
LL	57	31.1	464.8 (386.6–539.6)
LM	89	48.6	359.7 (333.1–428.6)
MM	37	20.2	315.0 (302.5–326.6)
p			<0.001
PON1 Q192R			
QQ	103	56.3	326.9 (307.9–353.5)
QR	68	37.2	463.3 (418.6–514.6)
RR	12	6.6	576.9 (479.6–670.7)
p			<0.001
PON1 L55M/Q192R			
LL/QQ	15	8.2	357.4 (325.8–390.2)
LL/QR	29	15.9	483.6 (444.4–548.1)
LL/RR	11	6.0	554.2 (473.8–674.1)
LM/QQ	51	27.9	335.8 (315.3–356.8)
LM/QR	39	21.3	438.9 (402.0–489.7)
LM/RR	1	0.5	576.9
MM/QQ	37	20.2	315.0 (302.5–326.6)
MM/QR	0	0	–
MM/RR	0	0	–
p			<0.001

Results are presented as absolute number and percentage, and median (interquartile range). p values were obtained using Kruskal-Wallis test.

activity was associated with homozygosity for L and R alleles, and lower PON1 activity was associated with homozygosity for the M and Q alleles (table 2). Moreover, HD patients with the LL/RR genotype presented the highest PON1 activity, and patients with the MM/QQ genotype presented the lowest PON1 activity.

Statins are known for their capacity to lower cholesterol levels by inhibiting the enzyme HMG-CoA reductase, and for their anti-inflammatory properties. Considering that 40.44% of the patients were under statins therapy, we studied a possible interference in our analytical studies, and no statistically significant differences were found (table 1).

Multiple regression analysis identified for all HD patients the heterozygosity and homozygosity for the L55M and Q192R polymorphisms, and VLDL, LDL-c, Apo A and CRP serum levels, time on dialysis and rhEPO dose, as the independent variables significantly associated with

PON1 levels (table 3). These associations were negative for CRP, rhEPO dose and time on dialysis. Considering the patients according to statin therapy, those who were not under this therapy presented the heterozygosity and homozygosity for the L55M and Q192R polymorphisms, CRP, TG and sTfR serum levels, time on dialysis and rhEPO dose as the independent variables significantly associated with PON1 levels, while for patients under statin therapy, only the heterozygosity and homozygosity for the Q192R polymorphism, CRP and TG serum levels were identified as the independent variables significantly associated with PON1 levels.

## Discussion

PON1 presents antioxidant properties contributing to control the development of oxidative stress at blood level. It is known that the oxidation of LDL is a crucial starting step for the atherogenic process; therefore, by preventing oxidative stress, PON1 contributes to protect LDL from oxidative modifications and to reduce foam cell formation, inhibiting atherosclerosis [12].

The lipid profile of our HD patients showed some CVD risk changes, as compared to control, namely significantly lower HDL-c and Apo A levels and significantly higher Lp(a) concentration. Despite the lower values of LDL-c and the similar values of Ox-LDL in HD patients, the Ox-LDL/LDL-c ratio was significantly higher, suggesting a higher proportion of oxidized LDL particles and, therefore, a lower antioxidant protection within LDL that might be due to the significantly lower activity of PON1. The trend towards lower levels of oxLDL observed in HD patients might result from the formation of immune complexes formed by oxidized LDL and Ox-LDL antibodies, as suggested by some authors [13, 14]; proatherogenic and proinflammatory properties have been attributed to these immune complexes and their formation seems to be more prevalent in diabetic nephropathy [13]; considering the high percentage of diabetic patients (36.1%) in our studied patients, this could be a reasonable explanation for the values of Ox-LDL that we observed.

The mortality and morbidity of HD patients is 10–20 times higher than that found in the general population, and remains high in spite of the technological development of HD procedures and of the medical support in the last years. Cardiovascular events are considered as the major cause of death (more than 50%). Advanced age, a lipid risk profile and diabetes mellitus common in these

**Table 3.** Main determinants of PON1 activity by multiple linear regression analysis

Dependent variable/model	All HD patients			Patients without statins			Patients with statins		
	R <sup>2</sup>	β	p	R <sup>2</sup>	β	p	R <sup>2</sup>	β	p
Ln PON1 activity									
(Constant)	0.893		<0.001	0.910		<0.001	0.877		<0.001
Q192R polymorphism (QR)		0.666	<0.001		0.667	<0.001		0.657	<0.001
Q192R polymorphism (RR)		0.558	<0.001		0.332	<0.001		0.841	<0.001
Ln CRP		-0.146	<0.001		-0.237	<0.001		-0.191	0.029
L55M polymorphism (LL)		0.323	<0.001		0.427	<0.001			
Ln VLDL		0.127	<0.001						
RhEPO dose		-0.108	0.003		-0.131	0.006			
Apo A		0.109	0.002						
LDL-c		0.096	0.007						
L55M polymorphism (LM)		0.139	0.006		0.187	0.001			
Ln time on dialysis		-0.181	0.026		-0.106	0.013			
Ln TG					0.097	0.028		0.307	<0.001
Ln sTfR					0.142	0.001			

patients per se do not explain the high number and severity of the observed cardiovascular events. The association and the value of oxidative stress, inflammation and dyslipidemia in the evaluation of risk for cardiovascular events are well known. More recently, it was proposed that PON1 could play a role in the cardiovascular risk of these patients, considering its antioxidant and antiatherogenic properties. Indeed, some studies reported that the activity of PON1 was reduced in HD patients [4, 5]. In accordance with those studies, we found in our group of HD patients a significantly lower PON1 activity compared to controls (table 1).

The activity and concentration of this enzyme is affected by several factors, but more than 60% of its activity seems to be explained by genetic factors, including some polymorphisms in the coding region of the *PON1* gene [12], such as the Q192R and L55M polymorphisms. The Q192R polymorphism modulates PON1 activity through the R allele that has been associated with increasing activity. The L55M polymorphism seems to modulate enzyme's concentration. Thus, subjects with RR and LL genotypes present the highest PON1 activity [15]. In accordance, we found that the HD patients who were homozygous for L and R alleles presented higher PON1 activities compared to the other genotypes. Moreover, HD patients with LL/QR and LL/RR genotypes showed median values of PON1 activity that were similar to those found in the control group. The relative prevalence of the different studied polymorphisms observed in

our HD patients is similar to the prevalence reported by others in HD patient populations [5]. The most frequent genotypes in HD patients were LM and QQ, for L55M and Q192R polymorphisms, respectively. As we were not able to study a larger control group, it is not possible to know if there are differences in the genotype frequencies between HD patients and controls. Indeed, it was reported that the genotype frequency of the LM genotype is higher in HD patients than in controls [5], and this would support a reduction in PON1 activity.

Considering that PON1 is strongly linked to HDL-c, Apo A and LDL-c, and that their values are significantly lower in HD patients compared to controls, the decreased activity of PON1 seems to be related to Apo A, VLDL and LDL levels. The result observed for Apo A is of particular relevance, as this Apo seems to be important to stabilize the enzyme [16]; Apo A is directly related to the number of HDL particles, as it is the major protein component of HDL [17]; therefore, the lower levels of Apo A found in HD patients and, therefore, of HDL particles could explain the lower activity of PON1. Indeed, when calculating the ratios PON1/Apo A and PON1/HDL-c, we did not find significant differences for HD patients and controls, suggesting that the reduction in PON1 may be explained by lower HDL particles [7]. To further understand the importance of the genetic and non-genetic factors under study in PON1 activity, we performed a multiple regression analysis (table 3). We found that in HD patients, especially those that are not under statin

therapy, a low activity of PON1 is significantly associated with increasing inflammation, rhEPO dose and time on HD. As statins improve the lipid profile and exert anti-inflammatory activity, for patients under statin therapy only the heterozygosity and homozygosity for the Q192R polymorphism, CRP and TG serum levels were identified as the independent variables significantly associated with PON1 levels.

We must notice that inflammation, rhEPO dose and time on HD have been associated with a higher mortality rate in HD patients [18]. Due to its sensitivity to inflammatory conditions, PON1 has been considered as a negative acute-phase protein. Henning et al. [19] recently reported a reduction in plasma PON1 activity in HD patients who spent more time on dialysis, which is in accordance with our results. Treatment with rhEPO appears to reduce the oxidative stress in CKD patients and improve PON1 activity [20]. However, some patients do not respond properly to this treatment and need higher rhEPO doses. These patients resistant to rhEPO therapy present higher levels of oxidative stress and inflammatory markers [21] that can contribute to the reduction in PON1 activity.

As expected, increasing PON1 activity in HD patients was associated with the genotypes QR and RR for Q192R polymorphism, and with the LL and LM genotypes for the L55M polymorphism. Moreover, we found that the increase in PON1 activity is also associated with increas-

ing levels of LDL-c, Apo A and VLDL, reflecting the need for oxidative protection.

In conclusion, our results strengthen the hypothesis that several genetic and non-genetic factors are important determinants of PON1 activity. The reduction in PON1 activity in HD patients who are not under statin therapy is strongly associated with inflammation, longer time on dialysis and high rhEPO doses, known as poor prognostic factors in HD patients, suggesting that the reduction in PON1 activity may worsen the prognosis of these patients. Moreover, some polymorphisms may further contribute to increase the risk in these patients by lowering PON1 activity and its protective antiatherogenic role.

### Acknowledgments

We are very grateful to FMC, Dinefro – Diálises e Nefrologia, SA, and Uninefro – Sociedade Prestadora de Cuidados Médicos e de Diálise, SA, and to their nurses for their technical support. This study was supported by 'Fundação para a Ciência e Tecnologia' (FCT: PIC/IC/83221/2007) and co-financed by FEDER (FCOMP-01-0124-FEDER-008468).

### Disclosure Statement

There are no potential conflicts of interest.

### References

- Kimak E, Halabis M, Baranowicz-Gaszczyk I, Solski J, Ksiazek A: Association between moderately oxidized low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclass distribution in hemodialyzed and post-renal transplant patients. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011;12:365–371.
- Deakin S, Moren X, James RW: Very low density lipoproteins provide a vector for secretion of paraoxonase-1 from cells. *Atherosclerosis* 2005;179:17–25.
- Kundhal K, Lok CE: Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract* 2005;101:c47–c52.
- Biasioli S, Schiavon R, Petrosino L, De Fanti E, Cavalcanti G, Battaglia P, Fasolin A: Paraoxonase activity and paraoxonase 1 gene polymorphism in patients with uremia. *ASAIO J* 2003;49:295–299.
- Rajkovic MG, Barisic K, Juretic D, Grubisic TZ, Flegar-Mestric Z, Rumora L: Polymorphisms of PON1 and PON2 genes in hemodialyzed patients. *Clin Biochem* 2011;44:964–968.
- Rozek LS, Hatsukami TS, Richter RJ, Ranchalis J, Nakayama K, McKinstry LA, Gortner DA, Boyko E, Schellenberg GD, Furlong CE, Jarvik GP: The correlation of paraoxonase (PON1) activity with lipid and lipoprotein levels differs with vascular disease status. *J Lipid Res* 2005;46:1888–1895.
- Rajkovic MG, Rumora L, Juretic D, Grubisic TZ, Flegar-Mestric Z, Vrkic N, Sinjeri Z, Barisic K: Effect of non-genetic factors on paraoxonase 1 activity in patients undergoing hemodialysis. *Clin Biochem* 2010;43:1375–1380.
- Schrader C, Rimbach G: Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. *Curr Med Chem* 2011;18:5624–5643.
- Locatelli F, Aljama P, Barany P, Canaud B, Carrera F, Eckardt KU, Horl WH, Macdougall IC, Macleod A, Wiecek A, Cameron S: Revised European Best Practice Guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(suppl 2):ii1–ii47.
- Olerup O, Zetterquist H: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225–235.
- Gaffney D, Campbell RA: A PCR based method to determine the Kalow allele of the cholinesterase gene: the E1k allele frequency and its significance in the normal population. *J Med Genet* 1994;31:248–250.

- 12 Precourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E: The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis* 2011; 214:20–36.
- 13 Atchley DH, Lopes-Virella MF, Zheng D, Kenny D, Virella G: Oxidized LDL-anti-oxidized LDL immune complexes and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2002;45:1562–1571.
- 14 Lopes-Virella MF, Virella G: Clinical significance of the humoral immune response to modified LDL. *Clin Immunol* 2010;134:55–65.
- 15 Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, Vandeberg JL, Almasy L, Blangero J, Maccluer JW, Mahaney MC: Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity (Edinb)* 2009; 102:147–154.
- 16 James RW, Deakin SP: The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1986–1994.
- 17 Tian L, Fu M: The relationship between high density lipoprotein subclass profile and apolipoprotein concentrations. *J Endocrinol Invest* 2011;34:461–472.
- 18 Cuevas X, Garcia F, Martin-Malo A, Fort J, Llados F, Lozano J, Perez-Garcia R: Risk factors associated with cardiovascular morbidity and mortality in Spanish incident hemodialysis patients: two-year results from the ANSWER study. *Blood Purif* 2012;33:21–29.
- 19 Henning BF, Holzhausen H, Tepel M: Continuous reduction of plasma paraoxonase activity with increasing dialysis vintage in hemodialysis patients. *Ther Apher Dial* 2010; 14:572–576.
- 20 Marsillach J, Martinez-Vea A, Marcas L, Mackness B, Mackness M, Ferre N, Joven J, Camps J: Administration of exogenous erythropoietin beta affects lipid peroxidation and serum paraoxonase-1 activity and concentration in predialysis patients with chronic renal disease and anaemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:347–349.
- 21 Costa E, Lima M, Alves JM, Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Miranda V, do SF, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva A: Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy. *J Clin Immunol* 2008;28:268–275.



# DISCUSSÃO GERAL

---





## Discussão

Este estudo permitiu aprofundar o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos que podem promover um risco de mortalidade aumentada, em doentes Portugueses com DRCT, sob terapêutica de hemodiálise e de AEE.

No início do estudo, foi feita a avaliação clínica e laboratorial dos doentes, a que se seguiu um *follow-up* de dois anos, para registo da mortalidade dos doentes. O estudo incluiu 189 doentes com DRCT em programa de hemodiálise. Foram avaliados diferentes parâmetros, nomeadamente, a dose de diálise, o estado nutricional, dados hematológicos, perfil lipídico, metabolismo do ferro, marcadores de disfunção endotelial e inflamação, assim como o tipo de acesso vascular, presença de co-morbilidades e terapêuticas associadas.

Este estudo foi efetuado com a colaboração de várias clínicas de hemodiálise da região Norte de Portugal. Os doentes tinham uma idade média de  $66,4 \pm 13,9$  anos, 55% eram do sexo masculino, e encontravam-se a cumprir um programa tri-semanal de hemodiálise. A FAV foi utilizada em 146 doentes (77,2%), e o CVC em 43 doentes (22,8%). Todos os doentes tinham iniciado tratamento de hemodiálise mais de 90 dias antes de participarem no estudo.

As causas principais da DRCT nestes doentes foram a *Diabetes mellitus* (35,9%) e a hipertensão arterial (13,2%). Dezasseis doentes (8,5%) foram classificados como sendo resistentes à terapêutica com AEE.

Durante o período de *follow-up* (24 meses), faleceram 35 doentes (18,5%), 14 dos quais por causas cardiovasculares.

Foi também selecionado um grupo controlo de 25 indivíduos, equilibrado o mais possível com os doentes com DRCT, para idade e género, que apresentavam valores hematológicos e bioquímicos dentro dos limites do normal, sem história de doenças renais ou inflamatórias.

Os resultados foram analisados a fim de: avaliar as diferenças entre doentes e controlos, com o objetivo de caracterizar a doença; avaliar as diferenças entre os doentes vivos e os que faleceram no decorrer dos dois anos de *follow-up*, para identificação de potenciais marcadores de risco de mortalidade; proceder a uma análise estatística, considerando como evento principal a morte, e ajustando o modelo para o tempo prévio em hemodiálise e para a idade, com o objetivo de identificar marcadores independentes de risco de mortalidade.

### **Caracterização hematológica e bioquímica dos doentes em programa de hemodiálise.**

Como se referiu, iniciámos a análise dos resultados comparando os doentes em hemodiálise com o grupo de controlo, a fim de caracterizar o perfil hematológico e bioquímico destes doentes.

Os doentes apresentaram anemia, valores de plaquetas significativamente mais baixos e linfocitopenia, que neste contexto poderá resultar, pelo menos em parte, de uma redução dos linfócitos T CD4+ e CD8+ (72).

A presença de biomarcadores inflamatórios aumentados, nomeadamente, de IL-6 e de CRP, a par de valores diminuídos de atividade PON1, são consistentes com estudos anteriores (223-225). Contudo, as causas da resposta inflamatória não se encontram completamente clarificadas. Na verdade, poderemos indicar vários fatores contributivos potenciais, incluindo a contaminação bacteriana do dialisador, a incompatibilidade com a membrana de diálise, bem como, quando se encontre presente, o acesso vascular através de CVC.

É sabido que algumas substâncias com um papel na inflamação, como é o caso da hepcidina, apresentam um impacto importante no metabolismo do ferro, reduzindo a acessibilidade do ferro para a eritropoiese (226), por redução da sua absorção e mobilização, podendo levar a uma eritropoiese com deficiência de ferro. Em boa concordância com estes aspetos, no presente trabalho foram encontrados nos doentes em hemodiálise valores aumentados da hepcidina, da ferritina, da saturação da transferrina, e dos recetores solúveis da transferrina (sTfR), a par de valores diminuídos da transferrina e do ferro, quando comparados com os controlos. Ou seja, os doentes apresentam um défice funcional em ferro, associado ao processo inflamatório subjacente. A IL-6, elevada nos doentes, descrita como um marcador de mortalidade nos doentes em hemodiálise (227), aumenta a expressão de hepcidina (228). Desta forma, os níveis elevados de hepcidina podem ser explicados por um estado de inflamação crónica.

Estudos recentes têm referido a importância de um bom estado nutricional nestes doentes. O grupo de DRCT que estudámos apresentou um BMI de  $25.9 \pm 4.6$  Kg/m<sup>2</sup> e, ainda, valores mais elevados de adiponectina, quando comparados com os controlos. Tal como foi referido na introdução, a adiponectina, com propriedades anti-aterogénicas e anti-inflamatórias, é produzida no tecido adiposo, apresentando concentrações diminuídas no plasma de doentes obesos. Todavia, no contexto da DRCT, a adiponectina encontra-se elevada pela diminuição da depuração renal.

Foram também observadas alterações significativas no perfil lipídico, algumas com aumento potencial no risco cardiovascular (redução do colesterol -HDL, da Apo A, e aumento da Lp(a)) e outras de protecção (redução do colesterol- LDL, das Ox-LDL, e da ApoB), bem como redução do colesterol total. Apesar da redução nas Ox-LDL, observou-se um aumento na relação ox-LDL/LDL, evidenciando um aumento na proporção de partículas LDL oxidadas, nos doentes. É reconhecido o papel das LDL oxidadas na iniciação e progressão do processo aterogénico, pela sua ação pró-inflamatória.

A PON1 apresentando propriedades antioxidantes pode contribuir para controlar o *stress* oxidativo, nomeadamente, a oxidação das LDL e a formação de “*foam cells*” na parede dos vasos, inibindo o processo aterosclerótico (229). Nos doentes em hemodiálise observámos uma atividade reduzida da PON1, quando comparados com os controlos. O aumento da razão Ox-LDL/LDLc poderá resultar de uma menor protecção anti-oxidante para as LDL, devido a uma menor atividade da PON1.

Mais recentemente foi proposto que a PON1 possa ter um papel no risco cardiovascular destes doentes, tendo em conta as suas propriedades antioxidantes e anti-aterogénicas (230-232).

A atividade e a concentração desta enzima são afetados por diversos fatores, mas uma parte importante dessa variação é explicada por fatores genéticos (229), alguns dos quais foram estudados na presente investigação (polimorfismos Q192R e L55M). O polimorfismo Q192R afeta a cinética da hidrólise de alguns substratos da PON1, sendo que o alelo R se associa ao aumento da atividade. O polimorfismo L55M associa-se também a uma variação na atividade da PON1 (138), sendo que os génotipos RR e LL determinam uma atividade mais elevada da PON1 (233), que observámos nos

doentes com homozigotia para os alelos L e R do gene *pon1*. Os doentes em hemodiálise com genótipos LL/QR e LL/RR apresentaram valores semelhantes aos do grupo de controlo.

Tal como no presente estudo, também Rajkovic e col. encontraram como genótipos mais comuns nos doentes em hemodiálise os genótipos QQ e LM do gene *pon1* (231). A nossa amostra de controlos foi insuficiente para comparar a distribuição dos diferentes alelos entre os doentes em hemodiálise e o grupo de controlo.

Pela análise de regressão múltipla verificámos que a actividade da PON1 se associava também às concentrações de Apo A, VLDL e LDL. A Apo A, tal como a PON 1, está presente nas HDL e contribui para estabilizar a enzima (234). A redução de Apo A e de colesterol-HDL observada nos doentes em hemodiálise, pode justificar a menor actividade da PON1. A mesma análise mostrou, ainda, associação negativa entre a actividade da PON1 e o estado inflamatório, evidenciado pela CRP, e, ainda, com a dose de AEE.

Alguns autores têm proposto a PON1 como uma proteína de fase aguda “negativa” (235) estabelecendo uma ligação da PON1 à inflamação, aterosclerose (235), mortalidade cardiovascular e mortalidade total (236). De facto, diversos estudos têm evidenciado uma redução da atividade da PON1 em doentes em hemodiálise (137, 230, 232), mas não em doentes transplantados, (230). Gugliucci e col. mostraram que após a sessão de diálise a atividade da PON1 aumentava, (4 a 40%), sugerindo que as “toxinas urémicas” diminuem a sua atividade (237). Henning e col. (238) descreveram uma redução da atividade PON1 com o aumento da duração do tempo em diálise, em concordância com o presente estudo.

O tratamento com eritropoietina e com ferro tem sido associado a um aumento na atividade PON1 (239). Considerando que os doentes resistentes aos efeitos dos AEE são tratados com doses mais elevadas desses medicamentos e apresentam maiores graus de inflamação (72), poderá existir algum tipo de impacto sobre a atividade da PON 1 neste contexto.

Um estudo prévio, do nosso grupo, revelou que os doentes com DRCT em hemodiálise apresentavam níveis mais elevados de D-dímeros e uma relação tPA/PAI-1 mais elevada, quando comparados com controlos saudáveis (79). O PAI-1 e o t-PA são marcadores do sistema fibrinolítico, mas são também

marcadores da função endotelial, pois ambas as substâncias são produzidas pelas células endoteliais. Enquanto agente fibrinolítico, o t-PA, tem sido utilizado em doentes em hemodiálise, seja no contexto dos CVC (218), seja em indicações semelhantes aos outros grupos de doentes, incluindo o tratamento do acidente vascular cerebral isquémico (240). A libertação de t-PA pode ser interpretada como um certo grau de disfunção endotelial, a qual poderá, pelo seu lado, apresentar-se com um fator de risco para doença cardiovascular (205).

Neste estudo, verificou-se que os doentes apresentavam várias alterações sugestivas de um estado pró-coagulante e de disfunção endotelial, nomeadamente, t-PA e D-dímeros aumentados, PAI-1 reduzido, e razão tPA/PAI-1 aumentada. O aumento dos D-dímeros nos doentes pode resultar de um estado pró-coagulante e/ou fibrinolítico, embora o aumento do tPA e da relação tPA/PAI-1, sugira um aumento na fibrinólise e uma alteração na função endotelial. Para esclarecer estas alterações, e a sua relação com o processo inflamatório nos DRCT, dividimos os doentes em dois grupos, consoante o valor de t-PA.

Os doentes com valores mais elevados de t-PA apresentaram valores mais elevados de D-dímeros, contudo a correlação entre estes dois parâmetros era fraca, sugerindo que não existe uma mera relação linear entre a libertação de t-PA e a fibrinólise. Os doentes com valores mais elevados de t-PA apresentaram também valores mais elevados de BMI e PAI-1, idade superior, um estado inflamatório mais exacerbado (valores mais elevados de IL-6 e CRP) e valores mais baixos de adiponectina. Estes dados suportam o conceito segundo o qual a disfunção endotelial acompanha a inflamação e o excesso ponderal.

O estudo de regressão múltipla mostrou que o PAI-1, a idade e a adiponectina se associavam de forma independente com o t-PA, sendo, no entanto, a adiponectina o melhor parâmetro preditor dos valores de t-PA. A correlação marcada entre t-PA e PAI-1 poderá ser explicada por uma origem comum no endotélio, possivelmente com alguns estímulos para a sua libertação partilhados pelos dois marcadores.

Os valores superiores de adiponectina, observados nos doentes, podem dever-se (pelo menos em parte) à sua acumulação, uma vez que é eliminada da

circulação pelos rins (241). A adiponectina em teores elevados não é considerada uma toxina urémica, uma vez que não se identificaram consequências biológicas negativas definidas (241). Pode, aliás, especular-se que a adiponectina possa ter algum efeito protetor neste contexto, uma vez que se trata de uma molécula com potenciais propriedades anti-inflamatórias (242). Alguns estudos mostraram, no entanto, uma associação entre adiponectina elevada e mortalidade aumentada nos doentes em hemodiálise (243, 244) ou com doença renal crónica (245), fenómeno que poderá estar associado a um estado físico mais débil (“*wasting*”) (204).

### ***Factores exógenos moduladores do processo inflamatório***

O processo inflamatório na DRCT pode favorecer o aparecimento de eventos cardiovasculares, contribuindo para a alta morbidade e mortalidade observada nos doentes em hemodiálise (73, 74).

O estado inflamatório e a função endotelial dos doentes em hemodiálise podem ser influenciados, entre outros factores exógenos, pelo tipo de acesso vascular e pela terapêutica com estatinas e agentes estimuladores da eritropoiese.

Além do efeito de diminuição do colesterol LDL, têm sido atribuídos às estatinas alguns efeitos ditos “pleiotrópicos”, nomeadamente, propriedades anti-inflamatórias (167, 168). Vários estudos têm mostrado que as estatinas podem melhorar o estado inflamatório crónico dos pacientes em hemodiálise (172). No entanto, os ensaios clínicos de maior dimensão revelaram que as estatinas não conseguiram reduzir os eventos cardiovasculares nestes doentes (174, 176), parecendo não se associar tão pouco a uma sobrevivência mais prolongada do acesso vascular (173), apesar de eventuais efeitos benéficos sobre a função endotelial e sobre a inflamação, tal como foi já mencionado na introdução.

Na presente investigação, em que avaliámos marcadores da função inflamatória, fibrinolítica e de disfunção endotelial em doentes em tratamento por hemodiálise, com diferentes tipos de acesso vascular e em que alguns dos doentes estavam sob tratamento com estatinas, considerámos importante avaliar o efeito destes dois factores exógenos no quadro inflamatório dos

doentes. Este estudo é de natureza observacional, podendo integrar-se no grande contexto dos estudos epidemiológicos, e não é um estudo de intervenção. Em consequência, não poderemos atribuir às estatinas, no âmbito da presente análise, quaisquer tipos de efeitos, mas verificámos, isso sim, a presença de associações. A utilização de estatinas pode, eventualmente, servir de marcador da presença de uma outra condição, tal como a presença de dislipidemia ou de doença cardiovascular (“*indication bias*”).

Os doentes foram divididos em quatro grupos, de acordo com o tipo de acesso vascular que utilizavam (FAV ou CVC) e conforme faziam ou não terapêutica com estatina (S ou NS).

Verificámos que os portadores de CVC, particularmente os doentes sem terapêutica com estatinas, apresentavam uma maior produção e “turnover” de fibrina e uma proporção mais elevada de partículas de LDL oxidada, quando comparados com os doentes com FAV também sem terapêutica com estatinas; isto faz presumir um maior risco CV para os doentes portadores de CVC. A terapêutica com estatinas associou-se a uma diminuição da inflamação nos doentes com CVC. Nos doentes com FAV, a terapêutica com estatinas associou-se a valores menores de adiponectina e a valores aumentados dos marcadores de função endotelial.

Os resultados desta análise evidenciaram que, tanto o tipo de acesso vascular, como a terapêutica com estatinas, podem influenciar os marcadores da função inflamatória, fibrinolítica e de disfunção endotelial de doentes em hemodiálise.

A introdução dos agentes estimuladores da eritropoiese para o tratamento da anemia da DRC reduziu significativamente a anemia nos doentes em diálise e melhorou a sua qualidade de vida. Alguns dos doentes, contudo, são relativamente resistentes ao tratamento com AEE e requerem doses mais elevadas. A razão desta variabilidade na resposta ao tratamento com AEE não é perfeitamente clara. A inflamação, o stresse oxidativo e a deficiência funcional de ferro têm sido associadas a esta hipo-resposta. Neste sentido, avaliámos as alterações sistémicas associadas à resistência ao tratamento com AEE, com particular interesse no metabolismo do ferro e marcadores inflamatórios.

Os doentes não respondedores aos AEE, que estudámos, apresentavam uma anemia, apesar da administração de doses importantes de AEE e da ausência de deficiência de vitamina B12 e folatos. Apresentavam também um estado inflamatório superior e valores de BMI inferiores aos controlos. Observou-se, ainda, uma deficiência de ferro “funcional” mais acentuada que a dos doentes respondedores, e valores mais baixos para a hepcidina. Esta é, como se referiu, “*up-regulated*” pela inflamação e “*down regulated*” pela deficiência de ferro e pela anemia/ hipoxia e a sua expressão pode ser diminuída por ação da eritropoietina (246). Uma vez que os doentes não-respondedores foram tratados com doses maiores de AEE, os valores mais baixos de hepcidina podem ser explicados por este mecanismo. No entanto, dada a resposta inflamatória aumentada, com libertação de citocinas pró-inflamatórias, é de considerar também que estas poderão ter um efeito supressor da eritropoiese. Mais ainda, os valores mais elevados de adiponectina, encontrados nos doentes não-respondedores, estão em boa concordância com os valores mais baixos de BMI apresentados por estes doentes. A elevação dos valores desta adipocina “protetora” pode contrabalançar os maiores níveis de inflamação apresentados por estes doentes.

Para melhor compreensão das relações entre as variáveis em estudo e a obesidade nos doentes em hemodiálise, procedemos à análise separada dos doentes em quatro grupos, em função do BMI. Observou-se uma correlação negativa entre os valores de adiponectina e o BMI, em boa concordância com dados anteriores (247), e um aumento da percentagem de doentes diabéticos com o aumento do BMI (de 16,7 para 50% dos doentes). Contudo, os doentes com baixo peso apresentaram os valores mais elevados de IL-6 e de CRP, embora sem correlação entre eles e com o BMI, sugerindo que a obesidade não é um fator determinante principal dos valores destes marcadores. Os doentes com baixo peso careceram de maiores doses de AEE para atingirem os valores de hemoglobina pretendidos, e apresentaram uma maior percentagem de não-respondedores aos AEE.

A análise de regressão múltipla identificou o BMI como uma variável independente associada negativamente com as doses dos AEE. Estes resultados estão em boa concordância com o conceito segundo o qual o metabolismo dos doentes em hemodiálise poderá apresentar diferenças em



relação a outros grupos de doentes e a pessoas saudáveis, uma vez que neste tipo de doentes, como em outros, a obesidade pode apresentar-se como estando associada a um melhor prognóstico (189).

### **Factores de risco de mortalidade**

Em Portugal há pouca informação sobre as causas de mortalidade e sua associação com fatores de risco de eventos cardiovasculares e, ainda, com o tipo de alterações induzidas pelo tipo de acesso vascular usado nos processos de hemodiálise e com o desenvolvimento de resistência à terapêutica com os AEE. Como se referiu, com este projecto pretendeu-se avaliar a mortalidade em doentes renais crónicos Portugueses, sob terapêutica de hemodiálise e de AEE, relacionando-a com o tipo de acesso vascular, dose de diálise, dislipidemia, resposta inflamatória, anemia, stresse oxidativo, disfunção endotelial e resistência à terapêutica com AEE.

Findo o período de follow-up, durante o qual faleceram 35 doentes, comparámos os valores basais dos diferentes parâmetros, apresentados pelos doentes que tinham morrido com os dos doentes vivos. Esta avaliação evidenciou como preditivos de mortalidade, os valores associados ao estado nutricional (BMI, albumina), à creatinina plasmática, à dose de AEE, à uremia e ao processo de hemodiálise (concentração de cálcio, produto cálcio/fósforo, volume de ultrafiltração), a perturbações hematológicas e no metabolismo do ferro (RDW, transferrina, saturação da transferrina), à resposta inflamatória (IL-6, CRP), (dis)função endotelial e hemostase (PAI-1, D-dímeros), ao perfil lipídico (triglicédeos, VLDL e Apo A) e ao tipo de acesso vascular (cateter venoso central), nesta população de doentes Portugueses com insuficiência renal crónica. Destes potenciais marcadores foram identificados três parâmetros com uma ligação estatisticamente significativa e independente à mortalidade: a concentração de CRP e de triglicédeos, e o CVC como tipo de acesso vascular. A relação entre valores elevados de CRP e mortalidade, no contexto em causa, foi já descrita (75, 76), e mostra a associação entre um estado de inflamação sistémico e a mortalidade destes doentes. Desconhece-se, no entanto, se o estado inflamatório desempenha um papel significativo na

pato-fisiologia da DRCT, contribuindo para um aumento da mortalidade, ou se representa apenas um marcador de risco de mortalidade.

Quer Zimmermann e col.(76), quer Yeun e col. (75), estudando 280 e 91 doentes em programa de hemodiálise, respetivamente, mostraram que a CRP é um preditor independente de mortalidade, dados que se encontram em boa concordância com os achados agora apresentados. Yeun e col. mostraram que a albumina apenas se apresentava como parâmetro preditor da mortalidade se a CRP fosse excluída do modelo estatístico (75).

No que respeita à presença de CVC, Costa e col. descreveram, em 50 doentes em hemodiálise, a associação entre a presença desse tipo de acesso vascular e valores mais baixos de hemoglobina e de albumina, a par de valores mais elevados da CRP, da IL-6, de D-dímeros e de t-PA, quando comparados com os doentes com FAV (79). Poderá especular-se que esta associação entre a presença de CVC e o aumento da atividade inflamatória e da disfunção endotelial poderá contribuir para o aumento da mortalidade nos doentes com CVC, fenómeno também identificado no presente trabalho. Na verdade, tal associação encontrava-se já descrita na literatura médica (120, 121).

Foi ainda observada uma associação entre níveis baixos de triglicédeos plasmáticos e mortalidade no presente estudo. Este achado deve ser interpretado no contexto da importância considerável da malnutrição neste tipo de doentes (27). Owen e col. mostraram que a albumina sérica se comportou como um preditor de mortalidade numa coorte de 13473 doentes em hemodiálise (27). No presente estudo, os doentes que faleceram apresentaram valores mais baixos de albumina (comparados com os restantes); contudo, o estudo de sobrevivência multivariado não identificou a albumina como um fator independente de risco de mortalidade. Os níveis baixos de triglicédeos poderão refletir a presença de um síndrome de “complexo malnutrição-inflamação” (28) ou, se preferirmos, um estado catabólico da hemodiálise, associado a uma mortalidade aumentada. Contudo, não podemos excluir a eventual contribuição de outro tipo de mecanismos, tal como poderia ser o caso de fatores genéticos. O metabolismo dos triglicédeos é complexo e têm sido descritas diversas alterações de natureza genética que influenciam os teores dos triglicédeos (248).

A elevação dos triglicerídeos não é rara nos doentes com doença renal crónica (249), por vezes em associação a níveis baixos de colesterol HDL. Estes doentes têm frequentemente patologias, tais como a *Diabetes mellitus*, que se associam a distúrbios dos lipídeos plasmáticos (250). Bagdade e col. mostraram que os triglicerídeos se encontram elevados nos doentes em hemodiálise, a par de valores aumentados de insulina e de uma atividade lipolítica diminuída (249). O metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos poderá estar reduzido nestes doentes, em parte devido a alterações da lipase das lipoproteínas (248).

As alterações dos lipídeos plasmáticos nos doentes com DRCT podem incluir elevações nos triglicerídeos, nas VLDL, nas lipoproteínas remanescentes (*remnants*), acumulação de lipídeos e lipoproteínas oxidadas, redução no colesterol HDL com redução da respetiva maturação e função (158). A redução das concentrações da Apo-AI (com impacto nas HDL) e da Apo-AII são características da DRCT, tal como a redução da atividade da LCAT – uma enzima com importância no transporte inverso do colesterol (158).

Segundo Vaziri (158), a diminuição da depuração das lipoproteínas ricas em triglicerídeos na DRCT pode apresentar um impacto no metabolismo energético, uma vez que tais alterações, incluindo a função da lipase das lipoproteínas, pode limitar a acessibilidade de lipídeos para a produção de energia no músculo esquelético, levando a uma redução na capacidade física, e no tecido adiposo, contribuindo para o “*wasting syndrome*” destes doentes.

Iseki e col., estudando 1167 doentes em hemodiálise, mostraram que os níveis baixos de colesterol se associavam a maior mortalidade (165). Liu e col. estudaram um conjunto de 823 doentes em hemodiálise, e verificaram que um valor maior de colesterol se associava a uma mortalidade menor em doentes com sinais de inflamação/desnutrição, enquanto que se associava a um risco aumentado nos restantes doentes (164).

O índice de massa corporal mais elevado pode apresentar-se como fator protetor dos doentes em hemodiálise, no que respeita à mortalidade (189, 251). No presente estudo os doentes falecidos apresentaram valores de BMI mais baixos, quando comparados com os restantes, em boa concordância com a literatura citada.

Uma maior massa muscular, por outro lado, pode ser considerada como protetora nos doentes em diálise, ao refletir um melhor estado físico geral. Neste estudo, os doentes que faleceram apresentaram um valor de creatinina mais baixo, que poderá corresponder a menor massa muscular, uma vez que estes doentes não apresentavam função renal significativa (nula ou apenas residual).

Foram desenvolvidos *scores* de risco para mortalidade de doentes em hemodiálise, entre os quais o de Floege e col. (252) Existem também índices de co-morbilidade preparados especificamente para este tipo de doentes, como é o caso do de Liu e col. (253).

## Limitações

O presente estudo apresenta diversos tipos de limitações. O número de doentes relativamente limitado, apresentou-se como a principal limitação. Muito embora tenham sido estudados um número alargado de parâmetros, diversos outros marcadores com potencial interesse não foram analisados. O número de voluntários utilizados enquanto controlos foi acentuadamente mais baixo do que o número dos doentes, o que constitui uma limitação importante. O número de pacientes em HD usando CVC como o acesso vascular foi bastante limitado, o que pode dificultar a interpretação de alguns dados obtidos na avaliação da importância do acesso vascular. A função endotelial dos doentes não foi estudada diretamente, apenas foram medidos bio-marcadores plasmáticos.

## Conclusões

Em conclusão, o presente estudo mostra que, nos doentes em hemodiálise, o tipo de acesso vascular, o valor da CRP (um marcador de inflamação), e os triglicérides (um marcador de metabolismo lipídico e de estado nutricional) foram parâmetros que se apresentaram como estando associados a diferenças na mortalidade. Estes fatores poderão eventualmente ser utilizados como indicadores de risco de mortalidade em doentes em hemodiálise.

Este estudo mostrou ainda que os doentes com CVC, em particular os que não se encontravam medicados com estatina, apresentaram valores mais elevados de D-dímeros, possivelmente na dependência de uma maior produção e degradação de fibrina. Foi ainda notado que a terapêutica com estatinas se associou a uma menor inflamação nos doentes com CVC, enquanto que nos doentes com FAV, a mesma terapêutica se associou a menores níveis de adiponectina e a valores mais elevados de tPA e de PAI-1. Este estudo demonstrou ainda que os doentes em hemodiálise através de CVC, particularmente aqueles que não estão sob terapia com estatinas, apresentam maior *turnover* de fibrina e uma maior proporção de partículas de LDL oxidado, quando comparados com os doentes com FAV e sem tratamento com estatinas, o que lhes poderá conferir maior risco cardiovascular. O tipo de acesso vascular para hemodiálise poderá influenciar a inflamação e fibrinólise/função endotelial nestes doentes, sendo menos certo o papel da terapêutica com estatinas.

Este trabalho aponta ainda no sentido de os doentes em hemodiálise com resistência aos AEE apresentarem uma deficiência de ferro funcional, associada a um estado inflamatório exacerbado, não obstante apresentarem valores de BMI mais baixos e valores mais altos de adiponectina, quando comparados com os restantes doentes. Foi ainda verificado que nos doentes em hemodiálise a adiponectina apresenta uma correlação inversa com o BMI. Contudo, nesta população de doentes, o BMI não apresenta uma relação nítida com a IL-6 nem com a CRP.

Numa outra vertente, o presente estudo permite concluir que a adiponectina, o PAI-1 e a idade são fatores determinantes dos valores de t-PA nos doentes em hemodiálise. Os resultados obtidos sugerem que o t-PA possa funcionar como

um marcador de disfunção sistémica, possivelmente envolvendo o endotélio, o tecido adiposo (através da adiponectina), no contexto de um estado inflamatório crónico, frequentemente presente neste tipo de doentes.

Por outro lado, o presente trabalho aponta no sentido de diferentes fatores, genéticos e não genéticos, se comportarem como determinantes da atividade PON1 em doentes em hemodiálise, a qual se encontra reduzida nestes doentes, quando comparada com controlos. Os polimorfismos genéticos L55M e Q192R do gene *pon1*, as VLDL, o colesterol LDL, a Apo A, a CRP, o tempo em diálise e a dose de AEE foram outros fatores que pareceram influenciar a atividade da enzima. A PON1 poderá ter um papel protetor, designadamente no que respeita à aterosclerose, pelo que a sua atividade diminuída, seja por razões genéticas, seja pela inflamação, seja por outros motivos, poderá associar-se ao prognóstico frequentemente negativo destes doentes.

Este estudo permitiu salientar a associação entre três parâmetros e a mortalidade dos doentes em hemodiálise. Destes, pelo menos dois são potencialmente modificáveis – a presença de CVC e os triglicéridos, estes últimos encarados como marcadores do estado nutricional. Estes fatores poderão posteriormente vir a ser objeto de estudos de intervenção específicos. Assinala-se o fato dos dados terem sido obtidos em Portugal, em doentes com características epidemiológicas próprias.

Na população Portuguesa analisada, os padrões nutricionais e dietéticos podem assumir um papel potencialmente determinante na sobrevida destes pacientes. Aspectos como restrições dietéticas impostas, a anorexia induzida pelo estado urémico latente, outros estados de doença, processos infecciosos e inflamatórios potencialmente indutores de processos catabólicos, a par de más condições socio- económicas, podem assumir relevo importante.

Tendo em conta toda a controvérsia que rodeia o problema das dietas, os achados relativos à associação entre triglicéridos baixos e maior mortalidade, a par de registos anteriores de associação entre mortalidade e colesterol baixo e a ineficácia das estatinas neste contexto, parecem contrariar o interesse de uma dieta pobre em lipídeos nestes doentes (254).

Também o acentuado processo inflamatório, para o qual contribui certamente, em alguns casos, a presença de CVC, poderá ser diminuído, limitando, sempre que possível, o uso deste tipo de acesso.



# **BIBLIOGRAFIA**

---



## Bibliografia

1. MOLINA, D. K. & DIMAIO, V. J. (2012) Normal organ weights in men: part II-the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys, *American Journal of Forensic Medical Pathology*, 33, 368-72.
2. (2002) K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification, *American Journal of Kidney Diseases*, 39, S1-266.
3. EDTA-ERA REGISTRY (2012) Annual report 2012. ([www.era-edta-reg.org](http://www.era-edta-reg.org))
4. Sociedade Portuguesa de NEFROLOGIA (2015) Relatório anual. Gabinete de registo 2014. ([www.spnefro.pt](http://www.spnefro.pt))
5. CARVALHO, E., DO SAMEIRO FARIA, M., NUNES, J. P., SAMPAIO, S. & VALBUENA, C. (2006) Renal diseases: a 27-year renal biopsy study, *Journal of Nephrology*, 19, 500-7.
6. PIO, D. S. F., SILVA P., NUNES S., COSTA T., CARVALHO E., VIZCAÍNO J.R., FARIA M.S., MOTA C. (2010) Renal biopsies in children. A twelve-year review., *Portuguese Journal of Nephrology and Hypertension*, 24, 215-221.
7. DO SAMEIRO FARIA, M., SAMPAIO, S., FARIA, V. & CARVALHO, E. (2003) Nephropathy associated with heroin abuse in Caucasian patients, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18, 2308-2313.
8. VANHOLDER, R. & DE SMET, R. (1999) Pathophysiologic Effects of Uremic Retention Solutes, *Journal of the American Society of Nephrology*, 10, 1815-1823.
9. DURANTON, F., DEPNER, T. A. & ARGILÉS, À. The Saga of Two Centuries of Urea: Nontoxic Toxin or Vice Versa?, *Seminars in Nephrology*, 34, 87-96.
10. ROOS, J. F., DOUST, J., TETT, S. E. & KIRKPATRICK, C. M. J. (2007) Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children—A meta-analysis, *Clinical Biochemistry*, 40, 383-391.
11. COCKCROFT, D. W. & GAULT, M. H. (1976) Prediction of creatinine clearance from serum creatinine, *Nephron*, 16, 31-41.
12. LEVEY, A. S., CORESH, J., GREENE, T. et al. (2007) Expressing the Modification of Diet in Renal Disease Study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values, *Clinical Chemistry*, 53, 766-72.
13. ABEL, J. J., ROWNTREE, L. G. & TURNER, B. B. (1990) On the removal of diffusable substances from the circulating blood by means of dialysis. Transactions of the Association of American Physicians, 1913, *Transfusion Science*, 11, 164-5.
14. PASKALEV, D. N. (2001) Georg Haas (1886–1971): The Forgotten Hemodialysis Pioneer, *Dialysis and Transplantation*, 30, 828-832.
15. KOLFF, W. J., BERK, H. T., TER WELLE, M. et al. (1997) The artificial kidney: a dialyser with a great area. 1944, *Journal of the American Society of Nephrology*, 8, 1959-65.
16. BLAGG, C. R. (2007) The early history of dialysis for chronic renal failure in the United States: a view from Seattle, *American Journal of Kidney Disease*, 49, 482-96.
17. BRESCIA, M. J., CIMINO, J. E., APPEL, K. & HURWICH, B. J. (1966) Chronic Hemodialysis Using Venipuncture and a Surgically Created Arteriovenous Fistula, *New England Journal of Medicine*, 275, 1089-1092.
18. HIMMELFARB, J. & IKIZLER, T. A. (2010) Hemodialysis, *New England Journal of Medicine*, 363, 1833-1845.
19. MEYER, T. W. & HOSTETTER, T. H. (2007) Uremia, *New England Journal of Medicine*, 357, 1316-25.
20. DHONDT, A., VANHOLDER, R., VAN BIESEN, W. & LAMEIRE, N. (2000) The removal of uremic toxins, *Kidney International*, 58, S47-S59.

21. CANAUD, B., BRAGG-GRESHAM, J. L., MARSHALL, M. R. et al. (2006) Mortality risk for patients receiving hemodiafiltration versus hemodialysis: European results from the DOPPS, *Kidney International*, 69, 2087-93.
22. WANG, A. Y., NINOMIYA, T., AL-KAHWA, A. et al. (2014) Effect of Hemodiafiltration or Hemofiltration Compared With Hemodialysis on Mortality and Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Failure: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Trials, *American Journal of Kidney Diseases*, 63, 968-978.
23. NISTOR, I., PALMER, S. C., CRAIG, J. C. et al. (2014) Convective Versus Diffusive Dialysis Therapies for Chronic Kidney Failure: An Updated Systematic Review of Randomized Controlled Trials, *American Journal of Kidney Diseases*, 63, 954-967.
24. SUSANTITAPHONG, P., SIRIBAMRUNGWONG, M. & JABER, B. L. (2013) Convective therapies versus low-flux hemodialysis for chronic kidney failure: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28, 2859-2874.
25. GRITTERS-VAN DEN OEVER, M., GROOTEMAN, M. P. C., BARTELS, P. C. M. et al. (2009) Post-dilution haemodiafiltration and low-flux haemodialysis have dissimilar effects on platelets: a side study of CONTRAST, *Nephrology Dialysis Transplantation*.
26. LOWRIE, E. G., LAIRD, N. M., PARKER, T. F. & SARGENT, J. A. (1981) Effect of the hemodialysis prescription of patient morbidity: report from the National Cooperative Dialysis Study, *New England Journal of Medicine*, 305, 1176-81.
27. OWEN, W. F., JR., LEW, N. L., LIU, Y., LOWRIE, E. G. & LAZARUS, J. M. (1993) The urea reduction ratio and serum albumin concentration as predictors of mortality in patients undergoing hemodialysis, *New England Journal of Medicine*, 329, 1001-6.
28. KALANTAR-ZADEH, K., KILPATRICK, R. D., KUWAE, N. et al. (2005) Revisiting mortality predictability of serum albumin in the dialysis population: time dependency, longitudinal changes and population-attributable fraction, *Nephrology Dialysis and Transplantation*, 20, 1880-8.
29. HELD, P. J., PORT, F. K., WOLFE, R. A. et al. (1996) The dose of hemodialysis and patient mortality, *Kidney International*, 50, 550-6.
30. EKNOYAN, G., BECK, G. J., CHEUNG, A. K. et al. (2002) Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis, *New England Journal of Medicine*, 347, 2010-9.
31. CULLETON, B. F., WALSH, M., KLARENBACH, S. W. et al. (2007) Effect of frequent nocturnal hemodialysis vs conventional hemodialysis on left ventricular mass and quality of life: a randomized controlled trial, *JAMA*, 298, 1291-9.
32. ROCCO, M. V., LOCKRIDGE, R. S., BECK, G. J. et al. (2011) The effects of frequent nocturnal home hemodialysis: the Frequent Hemodialysis Network Nocturnal Trial, *Kidney International*, 80, 1080-1091.
33. VOLLMER, W. M., WAHL, P. W. & BLAGG, C. R. (1983) Survival with dialysis and transplantation in patients with end-stage renal disease, *New England Journal of Medicine*, 308, 1553-8.
34. HELD, P. J., BRUNNER, F., ODAKA, M. et al. (1990) Five-year survival for end-stage renal disease patients in the United States, Europe, and Japan, 1982 to 1987, *American Journal of Kidney Disease*, 15, 451-7.
35. JAGER, K. J., LINDHOLM, B., GOLDSMITH, D. et al. (2011) Cardiovascular and non-cardiovascular mortality in dialysis patients: where is the link[quest], *Kidney International Supplements*, 1, 21-23.
36. SYSTEM, U. S. R. D. (2013) 2013 USR DS annual data report. Volume two. Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. ([www.usrds.org](http://www.usrds.org))
37. BRADBURY, B. D., FISSELL, R. B., ALBERT, J. M. et al. (2007) Predictors of early mortality among incident US hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS), *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2, 89-99.

38. ORTIZ, A., COVIC, A., FLISER, D. et al. (2014) Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure, *Lancet*, 383, 1831-43.
39. STEENKAMP, R., RAO, A. & RODERICK, P. (2015) UK Renal Registry 17th Annual Report: Chapter 5 Survival and Cause of Death in UK Adult Patients on Renal Replacement Therapy in 2013: National and Centre-specific Analyses, *Nephron*, 129 Suppl 1, 99-129.
40. ROBERTS, M. A., POLKINGHORNE, K. R., McDONALD, S. P. & IERINO, F. L. (2011) Secular trends in cardiovascular mortality rates of patients receiving dialysis compared with the general population, *American Journal of Kidney Diseases*, 58, 64-72.
41. VILLAR, E., REMONTET, L., LABEEUW, M. & ECOCHARD, R. (2007) Effect of age, gender, and diabetes on excess death in end-stage renal failure, *Journal of the American Society of Nephrology*, 18, 2125-34.
42. CARRERO, J. J., DE JAGER, D. J., VERDUIJN, M. et al. (2011) Cardiovascular and noncardiovascular mortality among men and women starting dialysis, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6, 1722-30.
43. KAZMI, W. H., GILBERTSON, D. T., OBRADOR, G. T. et al. (2005) Effect of comorbidity on the increased mortality associated with early initiation of dialysis, *American Journal of Kidney Disease*, 46, 887-96.
44. COOPER, B. A., BRANLEY, P., BULFONE, L. et al. (2010) A randomized, controlled trial of early versus late initiation of dialysis, *New England Journal of Medicine*, 363, 609-19.
45. BLOCK, G. A., HULBERT-SHEARON, T. E., LEVIN, N. W. & PORT, F. K. (1998) Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study, *American Journal of Kidney Diseases*, 31, 607-617.
46. BLOCK, G. A., KLASSEN, P. S., LAZARUS, J. M. et al. (2004) Mineral Metabolism, Mortality, and Morbidity in Maintenance Hemodialysis, *Journal of the American Society of Nephrology*, 15, 2208-2218.
47. TENTORI, F., BLAYNEY, M. J., ALBERT, J. M. et al. (2008) Mortality Risk for Dialysis Patients With Different Levels of Serum Calcium, Phosphorus, and PTH: The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS), *American Journal of Kidney Diseases*, 52, 519-530.
48. BLOCK, G. A., RAGGI, P., BELLASI, A., KOOIENGA, L. & SPIEGEL, D. M. (2007) Mortality effect of coronary calcification and phosphate binder choice in incident hemodialysis patients, *Kidney International*, 71, 438-441.
49. FOLEY, R. N., PARFREY, P. S. & SARNAK, M. J. (1998) Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease, *American Journal of Kidney Diseases*, 32, S112-9.
50. HERZOG, C. A., MANGRUM, J. M. & PASSMAN, R. (2008) Sudden cardiac death and dialysis patients, *Seminars in Dialysis*, 21, 300-7.
51. FOLEY, R. N., PARFREY, P. S. & SARNAK, M. J. (1998) Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease, *Journal of the American Society of Nephrology*, 9, S16-23.
52. SHASTRI, S., TANGRI, N., TIGHIOUART, H. et al. (2012) Predictors of sudden cardiac death: a competing risk approach in the hemodialysis study, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 7, 123-30.
53. JADOUL, M., THUMMA, J., FULLER, D. S. et al. (2012) Modifiable practices associated with sudden death among hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 7, 765-74.
54. BLEYER, A. J., RUSSELL, G. B. & SATKO, S. G. (1999) Sudden and cardiac death rates in hemodialysis patients, *Kidney International*, 55, 1553-9.
55. FOLEY, R. N., GILBERTSON, D. T., MURRAY, T. & COLLINS, A. J. (2011) Long interdialytic interval and mortality among patients receiving hemodialysis, *New England Journal of Medicine*, 365, 1099-107.

56. DE JAGER, D. J., GROOTENDORST, D. C., JAGER, K. J. et al. (2009) Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis, *JAMA*, 302, 1782-9.
57. SARNAK, M. J. & JABER, B. L. (2000) Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population, *Kidney International*, 58, 1758-64.
58. VOGELZANG, J. L., VAN STRALEN, K. J., NOORDZIJ, M. et al. (2015) Mortality from infections and malignancies in patients treated with renal replacement therapy: data from the ERA-EDTA registry, *Nephrology Dialysis Transplantation*.
59. NAQVI, S. B. & COLLINS, A. J. (2006) Infectious complications in chronic kidney disease, *Advances in Chronic Kidney Diseases*, 13, 199-204.
60. POWE, N. R., JAAR, B., FURTH, S. L., HERMANN, J. & BRIGGS, W. (1999) Septicemia in dialysis patients: incidence, risk factors, and prognosis, *Kidney International*, 55, 1081-90.
61. GANESH, S. K., STACK, A. G., LEVIN, N. W., HULBERT-SHEARON, T. & PORT, F. K. (2001) Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients, *Journal of the American Society of Nephrology*, 12, 2131-8.
62. BAYES, B., PASTOR, M. C., BONAL, J. et al. (2003) Homocysteine, C-reactive protein, lipid peroxidation and mortality in haemodialysis patients, *Nephrology Dialysis and Transplantation*, 18, 106-12.
63. CRESSMAN, M. D., HEYKA, R. J., PAGANINI, E. P. et al. (1992) Lipoprotein(a) is an independent risk factor for cardiovascular disease in hemodialysis patients, *Circulation*, 86, 475-82.
64. SARNAK, M. J., LEVEY, A. S., SCHOOLWERTH, A. C. et al. (2003) Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention, *Circulation*, 108, 2154-69.
65. COLLINS, A. J. (2003) Cardiovascular mortality in end-stage renal disease, *American Journal of the Medical Sciences*, 325, 163-7.
66. STENVINKEL, P., CARRERO, J. J., AXELSSON, J. et al. (2008) Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle?, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3, 505-21.
67. KENDRICK, J. & CHONCHOL, M. B. (2008) Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease, *Nature Clinical Practice in Nephrology*, 4, 672-81.
68. MACALLISTER, R. J., RAMBAUSEK, M. H., VALLANCE, P. et al. (1996) Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure, *Nephrology Dialysis and Transplantation*, 11, 2449-52.
69. DREW, D. A., TIGHIOUART, H., SCOTT, T. et al. (2014) Asymmetric dimethylarginine, race, and mortality in hemodialysis patients, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 9, 1426-33.
70. SCHINDLER, R., SENF, R. & FREI, U. (2002) Influencing the inflammatory response of haemodialysis patients by cytokine elimination using large-pore membranes, *Nephrology Dialysis and Transplantation*, 17, 17-9.
71. CAGLAR, K., PENG, Y., PUPIM, L. B. et al. (2002) Inflammatory signals associated with hemodialysis, *Kidney International*, 62, 1408-16.
72. COSTA, E., LIMA, M., ALVES, J. M. et al. (2008) Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy, *Journal of Clinical Immunology*, 28, 268-75.

73. HUNG, C. Y., CHEN, Y. A., CHOU, C. C. & YANG, C. S. (2005) Nutritional and inflammatory markers in the prediction of mortality in Chinese hemodialysis patients, *Nephron Clinical Practice*, 100, c20-6.
74. WANNER, C., ZIMMERMANN, J., SCHWEDLER, S. & METZGER, T. (2002) Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients, *Kidney International Supplements*, 99-102.
75. YEUN, J. Y., LEVINE, R. A., MANTADILOK, V. & KAYSEN, G. A. (2000) C-Reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients, *American Journal Kidney Disease*, 35, 469-76.
76. ZIMMERMANN, J., HERRLINGER, S., PRUY, A., METZGER, T. & WANNER, C. (1999) Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients, *Kidney International*, 55, 648-58.
77. PANICHI, V., MAGGIORE, U., TACCOLA, D. et al. (2004) Interleukin-6 is a stronger predictor of total and cardiovascular mortality than C-reactive protein in haemodialysis patients, *Nephrology Dialysis and Transplantation*, 19, 1154-60.
78. BARANY, P., DIVINO FILHO, J. C. & BERGSTROM, J. (1997) High C-reactive protein is a strong predictor of resistance to erythropoietin in hemodialysis patients, *American Journal of Kidney Diseases*, 29, 565-8.
79. COSTA, E., ROCHA, S., ROCHA-PEREIRA, P. et al. (2008) Cross-talk between inflammation, coagulation/fibrinolysis and vascular access in hemodialysis patients, *Journal of Vascular Access*, 9, 248-53.
80. SCHOENMAKERS, S. H., REITSMA, P. H. & SPEK, C. A. (2005) Blood coagulation factors as inflammatory mediators, *Blood Cells Molecules and Diseases*, 34, 30-7.
81. VOLANAKIJE & KAPLAN, M. H. (1971) Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 136, 612-&.
82. THOMPSON, D., PEPYS, M. B. & WOOD, S. P. (1999) The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine, *Structure*, 7, 169-77.
83. KAPLAN, M. H. & VOLANAKIJE (1974) Interaction of C-reactive protein complexes with complement system. 1. Consumption of human complement associated with reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-poly saccharide and with choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin., *Journal of Immunology*, 112, 2135-2147.
84. PEPYS, M. B. & HIRSCHFIELD, G. M. (2003) C-reactive protein: a critical update, *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1805-12.
85. ZOCCALI, C., BENEDETTO, F. A., MALLAMACI, F. et al. (2000) Inflammation is associated with carotid atherosclerosis in dialysis patients. Creed Investigators. Cardiovascular Risk Extended Evaluation in Dialysis Patients, *Journal of Hypertension*, 18, 1207-13.
86. KALANTAR-ZADEH, K., REGIDOR, D. L., MCALLISTER, C. J., MICHAEL, B. & WARNOCK, D. G. (2005) Time-dependent associations between iron and mortality in hemodialysis patients, *Journal of the American Society of Nephrology*, 16, 3070-80.
87. AKCHURIN, O. M. & KASKEL, F. (2015) Update on inflammation in chronic kidney disease, *Blood Purification*, 39, 84-92.
88. RAUCHHAUS, M., COATS, A. J. S. & ANKER, S. D. The endotoxin-lipoprotein hypothesis, *The Lancet*, 356, 930-933.
89. SANDEK, A., UTCHILL, S. & RAUCHHAUS, M. (2007) The endotoxin-lipoprotein hypothesis-an update, *Archives of Medical Science*, 3, S81.
90. LAUDE-SHARP, M., CAROFF, M., SIMARD, L. et al. (1990) Induction of IL-1 during hemodialysis: transmembrane passage of intact endotoxins (LPS), *Kidney International*, 38, 1089-94.
91. FALLAHZADEH, M. K., ROOZBEH, J., GERAMIZADEH, B. & NAMAZI, M. R. (2011) Interleukin-2 serum levels are elevated in patients with uremic pruritus: a novel finding with practical implications, *Nephrology Dialysis and Transplantation*, 26, 3338-44.

92. HOLTZMAN, S., ABBEY, S. E., CHAN, C., BARGMAN, J. M. & STEWART, D. E. (2012) A genetic predisposition to produce low levels of IL-10 is related to depressive symptoms: a pilot study of patients with end stage renal disease, *Psychosomatics*, 53, 155-61.
93. PARK, J. T., YOO, T. H., KIM, J. K. et al. (2013) Leptin/adiponectin ratio is an independent predictor of mortality in nondiabetic peritoneal dialysis patients, *Peritoneal Dialysis International*, 33, 67-74.
94. ROSSI, M., CAMPBELL, K. L., JOHNSON, D. W. et al. (2014) Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease, *Archives of Medical Research*, 45, 309-17.
95. JOFRÉ, R., RODRIGUEZ-BENITEZ, P., LÓPEZ-GÓMEZ, J. M. & PÉREZ-GARCIA, R. (2006) Inflammatory Syndrome in Patients on Hemodialysis, *Journal of the American Society of Nephrology*, 17, S274-S280.
96. KOVESDY, C. P., KOPPLE, J. D. & KALANTAR-ZADEH, K. (2013) Inflammation in renal insufficiency *UpToDate*. (www.uptodate.com)
97. TANG, W. H., WANG, Z., KENNEDY, D. J. et al. (2015) Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease, *Circulation Research*, 116, 448-55.
98. TANG, W. H., WANG, Z., LEVISON, B. S. et al. (2013) Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk, *New England Journal of Medicine*, 368, 1575-84.
99. RUIZ, S., PERGOLA, P. E., ZAGER, R. A. & VAZIRI, N. D. (2013) Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease, *Kidney International*, 83, 1029-41.
100. DE ZEEUW, D., AKIZAWA, T., AUDHYA, P. et al. (2013) Bardoxolone Methyl in Type 2 Diabetes and Stage 4 Chronic Kidney Disease, *New England Journal of Medicine*, 369, 2492-2503.
101. GONZÁLEZ-ESPINOZA, L., ROJAS-CAMPOS, E., MEDINA-PÉREZ, M. et al. (2011) Pentoxifylline decreases serum levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and C-reactive protein in hemodialysis patients: results of a randomized double-blind, controlled clinical trial, *Nephrology Dialysis Transplantation*.
102. BINIAZ, V., SADEGHI SHERMEH, M., EBADI, A., TAYEBI, A. & EINOLLAHI, B. (2014) Effect of Vitamin C Supplementation on C-reactive Protein Levels in Patients Undergoing Hemodialysis: A Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Study, *Nephrourology Monthly*, 6, e13351.
103. HUNG, A. M., ELLIS, C. D., SHINTANI, A., BOOKER, C. & IKIZLER, T. A. (2011) IL-1 $\beta$  Receptor Antagonist Reduces Inflammation in Hemodialysis Patients, *Journal of the American Society of Nephrology*, 22, 437-442.
104. SANTORO, A. (2000) Confounding factors in the assessment of delivered hemodialysis dose, *Kidney International Supplements*, 76, S19-27.
105. IFUDU, O., MAYERS, J. D., COHEN, L. S. et al. (1996) Correlates of vascular access and nonvascular access-related hospitalizations in hemodialysis patients, *American Journal of Nephrology*, 16, 118-23.
106. SCHWAB, S. J., HARRINGTON, J. T., SINGH, A. et al. (1999) Vascular access for hemodialysis, *Kidney International*, 55, 2078-90.
107. CHANG, C. J., KO, P. J., HSU, L. A. et al. (2004) Highly increased cell proliferation activity in the restenotic hemodialysis vascular access after percutaneous transluminal angioplasty: implication in prevention of restenosis, *American Journal of Kidney Diseases*, 43, 74-84.
108. MILLER, P. E., CARLTON, D., DEIERHOI, M. H., REDDEN, D. T. & ALLON, M. (2000) Natural history of arteriovenous grafts in hemodialysis patients, *American Journal of Kidney Diseases*, 36, 68-74.



109. MAYA, I. D., O'NEAL, J. C., YOUNG, C. J., BARKER-FINKEL, J. & ALLON, M. (2009) Outcomes of brachiocephalic fistulas, transposed brachiobasilic fistulas, and upper arm grafts, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4, 86-92.
110. SCHWAB, S. J., BULLER, G. L., MCCANN, R. L., BOLLINGER, R. R. & STICKEL, D. L. (1988) Prospective evaluation of a Dacron cuffed hemodialysis catheter for prolonged use, *American Journal of Kidney Diseases*, 11, 166-9.
111. LOK, C. E. (2007) Fistula first initiative: advantages and pitfalls, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2, 1043-53.
112. WINKELMAYER, W. C. (2011) Tackling the Achilles' Heel of Hemodialysis, *New England Journal of Medicine*, 364, 372-374.
113. MANDOLFO, S., PIAZZA, W. & GALLI, F. (2002) Central venous catheter and the hemodialysis patient: a difficult symbiosis, *Journal of Vascular Access*, 3, 64-73.
114. MCGEE, D. C. & GOULD, M. K. (2003) Preventing complications of central venous catheterization, *New England Journal of Medicine*, 348, 1123-33.
115. POLDERMAN, K. H. & GIRBES, A. J. (2002) Central venous catheter use. Part 1: mechanical complications, *Intensive Care Medicine*, 28, 1-17.
116. SESSO, R., BARBOSA, D., LEME, I. L. et al. (1998) Staphylococcus aureus prophylaxis in hemodialysis patients using central venous catheter: effect of mupirocin ointment, *Journal of the American Society of Nephrology*, 9, 1085-92.
117. ALLON, M. (2004) Dialysis catheter-related bacteremia: treatment and prophylaxis, *American Journal of Kidney Diseases*, 44, 779-91.
118. ISHANI, A., COLLINS, A. J., HERZOG, C. A. & FOLEY, R. N. (2005) Septicemia, access and cardiovascular disease in dialysis patients: the USRD Wave 2 study, *Kidney International* 68, 311-8.
119. XUE, J. L., DAHL, D., EBBEN, J. P. & COLLINS, A. J. (2003) The association of initial hemodialysis access type with mortality outcomes in elderly Medicare ESRD patients, *American Journal of Kidney Diseases*, 42, 1013-9.
120. DHINGRA, R. K., YOUNG, E. W., HULBERT-SHEARON, T. E., LEAVEY, S. F. & PORT, F. K. (2001) Type of vascular access and mortality in U.S. hemodialysis patients, *Kidney International*, 60, 1443-51.
121. PASTAN, S., SOUCIE, J. M. & MCCLELLAN, W. M. (2002) Vascular access and increased risk of death among hemodialysis patients, *Kidney International*, 62, 620-6.
122. OCAK, G., HALBESMA, N., LE CESSIE, S. et al. (2011) Haemodialysis catheters increase mortality as compared to arteriovenous accesses especially in elderly patients, *Nephrology Dialysis and Transplantation*, 26, 2611-7.
123. AGRAS, P. I., BASKIN, E., CENGIZ, N. et al. (2005) Global fibrinolytic capacity in children on dialysis, *Thrombosis Research*, 115, 185-9.
124. YU, A., EGBERG, N. & JACOBSON, S. H. (2003) Haemostatic complications in haemodialysis patients: effect of type of vascular access and dialysis filter, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 63, 127-33.
125. KANNO, Y., KOBAYASHI, K., TAKANE, H. et al. (2007) Elevation of plasma D-dimer is closely associated with venous thrombosis produced by double-lumen catheter in pre-dialysis patients, *Nephrology Dialysis and Transplantation*, 22, 1224-7.
126. ASTOR, B. C., EUSTACE, J. A., POWE, N. R. et al. (2005) Type of vascular access and survival among incident hemodialysis patients: the Choices for Healthy Outcomes in Caring for ESRD (CHOICE) Study, *Journal of the American Society of Nephrology*, 16, 1449-55.
127. BANERJEE, T., KIM, S. J., ASTOR, B. et al. (2014) Vascular access type, inflammatory markers, and mortality in incident hemodialysis patients: the Choices for Healthy Outcomes in Caring for End-Stage Renal Disease (CHOICE) Study, *American Journal of Kidney Diseases*, 64, 954-61.

128. POLKINGHORNE, K. R., McDONALD, S. P., ATKINS, R. C. & KERR, P. G. (2004) Vascular access and all-cause mortality: a propensity score analysis, *Journal of the American Society of Nephrology*, 15, 477-86.
129. RAVANI, P., PALMER, S. C., OLIVER, M. J. et al. (2013) Associations between hemodialysis access type and clinical outcomes: a systematic review, *Journal of the American Society of Nephrology*, 24, 465-73.
130. BOAZ, M., SMETANA, S., WEINSTEIN, T. et al. (2000) Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial, *The Lancet*, 356, 1213-1218.
131. TEPEL, M., VAN DER GIET, M., STATZ, M., JANKOWSKI, J. & ZIDEK, W. (2003) The Antioxidant Acetylcysteine Reduces Cardiovascular Events in Patients With End-Stage Renal Failure: A Randomized, Controlled Trial, *Circulation*, 107, 992-995.
132. STENVINKEL, P., CARRERO, J. J., AXELSSON, J. et al. (2008) Emerging Biomarkers for Evaluating Cardiovascular Risk in the Chronic Kidney Disease Patient: How Do New Pieces Fit into the Uremic Puzzle?, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3, 505-521.
133. BOSSOLA, M. & TAZZA, L. (2015) Wishful Thinking: The Surprisingly Sparse Evidence for a Relationship between Oxidative Stress and Cardiovascular Disease in Hemodialysis Patients, *Seminars in Dialysis*, n/a-n/a.
134. MACKNESS, M. I., ARROL, S. & DURRINGTON, P. N. (1991) Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein, *FEBS Letters*, 286, 152-4.
135. MACKNESS, M. & MACKNESS, B. (2004) Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important?, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 37, 1317-23.
136. DEAKIN, S., MOREN, X. & JAMES, R. W. (2005) Very low density lipoproteins provide a vector for secretion of paraoxonase-1 from cells, *Atherosclerosis*, 179, 17-25.
137. GUGLIUCCI, A., KOTANI, K. & KIMURA, S. (2012) Paraoxonase 1 in chronic kidney failure, *Journal of Lipids*, 2012, 726048.
138. LEVIEV, I., NEGRO, F. & JAMES, R. W. (1997) Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 17, 2935-9.
139. MACKNESS, B., DURRINGTON, P., McELDUFF, P. et al. (2003) Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study, *Circulation*, 107, 2775-9.
140. BHATTACHARYYA, T., NICHOLLS, S. J., TOPOL, E. J. et al. (2008) Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk, *JAMA*, 299, 1265-76.
141. BOUMAN, H. J., SCHOMIG, E., VAN WERKUM, J. W. et al. (2011) Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy, *Nature Medicine*, 17, 110-6.
142. ANCRENAZ, V., DESMEULES, J., JAMES, R. et al. (2012) The paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel in vitro, *British Journal of Pharmacology*, 166, 2362-70.
143. PARE, G., ROSS, S., MEHTA, S. R. et al. (2012) Effect of PON1 Q192R genetic polymorphism on clopidogrel efficacy and cardiovascular events in the Clopidogrel in the Unstable Angina to Prevent Recurrent Events trial and the Atrial Fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for Prevention of Vascular Events, *Circulation Cardiovascular Genetics*, 5, 250-6.
144. ISHIZUKA, T., FUJIMORI, I., NISHIDA, A. et al. (2012) Paraoxonase 1 as a major bioactivating hydrolase for olmesartan medoxomil in human blood circulation: molecular identification and contribution to plasma metabolism, *Drug Metabolism and Disposition*, 40, 374-80.
145. LEVIN, N. W., LAZARUS, J. M. & NISSENSON, A. R. (1993) National Cooperative rHu Erythropoietin Study in patients with chronic renal failure--an interim report. The

- National Cooperative rHu Erythropoietin Study Group, *American Journal of Kidney Diseases*, 22, 3-12.
146. BENZ, R. L., PRESSMAN, M. R., HOVICK, E. T. & PETERSON, D. D. (1999) A preliminary study of the effects of correction of anemia with recombinant human erythropoietin therapy on sleep, sleep disorders, and daytime sleepiness in hemodialysis patients (The SLEEPO study), *American Journal of Kidney Diseases*, 34, 1089-95.
  147. PICKETT, J. L., THEBERGE, D. C., BROWN, W. S., SCHWEITZER, S. U. & NISSENSON, A. R. (1999) Normalizing hematocrit in dialysis patients improves brain function, *American Journal of Kidney Diseases*, 33, 1122-30.
  148. ESCHBACH, J. W., ABDULHADI, M. H., BROWNE, J. K. et al. (1989) Recombinant human erythropoietin in anemic patients with end-stage renal disease. Results of a phase III multicenter clinical trial, *Annals of Internal Medicine*, 111, 992-1000.
  149. OFSTHUN, N., LABRECQUE, J., LACSON, E., KEEN, M. & LAZARUS, J. M. (2003) The effects of higher hemoglobin levels on mortality and hospitalization in hemodialysis patients, *Kidney International*, 63, 1908-14.
  150. SINGH, A. K., SZCZECZ, L., TANG, K. L. et al. (2006) Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease, *New England Journal of Medicine*, 355, 2085-98.
  151. DRUEKE, T. B., LOCATELLI, F., CLYNE, N. et al. (2006) Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia, *New England Journal of Medicine*, 355, 2071-84.
  152. PFEFFER, M. A., BURDMANN, E. A., CHEN, C. Y. et al. (2009) A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease, *New England Journal of Medicine*, 361, 2019-32.
  153. KDIGO (2012) Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Chapter 3: Use of ESAs and other agents to treat anemia in CKD, *Kidney International Supplements*, 2, 299-310.
  154. MARCHIOLI, R., FINAZZI, G., SPECCHIA, G. et al. (2013) Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera, *New England Journal of Medicine*, 368, 22-33.
  155. PASIPOULARIDES, A. (2012) Optimal hematocrit: a Procrustean bed for maximum oxygen transport rate?, *Journal of Applied Physiology*, 113, 353-4.
  156. BARANY, P. (2001) Inflammation, serum C-reactive protein, and erythropoietin resistance, *Nephrology Dialysis and Transplantation*, 16, 224-7.
  157. BURNS, J. S. (2014) Erythropoietin for the anemia of chronic kidney disease in hemodialysis patients *UpToDate*. ([www.uptodate.com](http://www.uptodate.com))
  158. VAZIRI, N. D. (2009) Causes of dysregulation of lipid metabolism in chronic renal failure, *Seminars in Dialysis*, 22, 644-51.
  159. PONTICELLI, C., BARBI, G. L., CANTALUPPI, A. et al. (1978) Lipid disorders in renal transplant recipients, *Nephron*, 20, 189-95.
  160. ATTMAN, P. O., SAMUELSSON, O. & ALAUPOVIC, P. (1993) Lipoprotein metabolism and renal failure, *American Journal of Kidney Diseases*, 21, 573-92.
  161. AVRAM, M. M. & BLAUSTEIN, D. A. (1997) Causes, Risks and Therapy of Hyperlipidemia in Chronic Dialysis Patients, *Seminars in Dialysis*, 10, 267-271.
  162. MAGGI, E., BELLAZZI, R., FALASCHI, F. et al. (1994) Enhanced LDL oxidation in uremic patients: An additional mechanism for accelerated atherosclerosis?, *Kidney International*, 45, 876-883.
  163. LEVINE, D. M. & GORDON, B. R. (1995) Lipoprotein(a) levels in patients receiving renal replacement therapy: methodologic issues and clinical implications, *American Journal of Kidney Diseases*, 26, 162-9.
  164. LIU, Y., CORESH, J., EUSTACE, J. A. et al. (2004) Association between cholesterol level and mortality in dialysis patients: role of inflammation and malnutrition, *JAMA*, 291, 451-9.

165. ISEKI, K., YAMAZATO, M., TOZAWA, M. & TAKISHITA, S. (2002) Hypocholesterolemia is a significant predictor of death in a cohort of chronic hemodialysis patients, *Kidney International*, 61, 1887-93.
166. GOLDWASSER, P., MITTMAN, N., ANTIGNANI, A. et al. (1993) Predictors of mortality in hemodialysis patients, *Journal of the American Society of Nephrology*, 3, 1613-22.
167. EPSTEIN, M. & VAZIRI, N. D. (2012) Statins in the management of dyslipidemia associated with chronic kidney disease, *Nature Reviews in Nephrology*, 8, 214-23.
168. KOH, K. K., SAKUMA, I. & QUON, M. J. (2011) Differential metabolic effects of distinct statins, *Atherosclerosis*, 215, 1-8.
169. PERELAS, A., TSOUKANI, A. & PERREA, D. (2010) Effects of lipid-lowering drugs on adiponectin, *Current Vascular Pharmacology*, 8, 836-48.
170. BLAKE, G. J. & RIDKER, P. M. (2000) Are statins anti-inflammatory?, *Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine*, 1, 161-165.
171. RIDKER, P. M., DANIELSON, E., FONSECA, F. A. et al. (2008) Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein, *New England Journal of Medicine*, 359, 2195-207.
172. DENG, J., WU, Q., LIAO, Y., HUO, D. & YANG, Z. (2012) Effect of statins on chronic inflammation and nutrition status in renal dialysis patients: a systematic review and meta-analysis, *Nephrology (Carlton)*, 17, 545-51.
173. PISONI, R., BARKER-FINKEL, J. & ALLO, M. (2010) Statin therapy is not associated with improved vascular access outcomes, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5, 1447-50.
174. WANNER, C., KRANE, V., MARZ, W. et al. (2005) Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis, *New England Journal of Medicine*, 353, 238-48.
175. MÄRZ, W., GENSER, B., DRECHSLER, C. et al. (2011) Atorvastatin and Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Type 2 Diabetes Mellitus Patients on Hemodialysis, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6, 1316-1325.
176. FELLSTROM, B. C., JARDINE, A. G., SCHMIEDER, R. E. et al. (2009) Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis, *New England Journal of Medicine*, 360, 1395-407.
177. BAIGENT, C., LANDRAY, M. J., REITH, C. et al. (2011) The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial, *The Lancet*, 377, 2181-2192.
178. STONE, N. J., ROBINSON, J. G., LICHTENSTEIN, A. H. et al. (2014) 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, *Circulation*, 129, S1-45.
179. GUPTA, R., PLANTINGA, L. C., FINK, N. E. et al. (2007) Statin use and sepsis events [corrected] in patients with chronic kidney disease, *JAMA*, 297, 1455-64.
180. BALISTRERI, C. R., CARUSO, C. & CANDORE, G. (2010) The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases, *Mediators in Inflammation*, 2010, 802078.
181. MUZUMDAR, R., ALLISON, D. B., HUFFMAN, D. M. et al. (2008) Visceral adipose tissue modulates mammalian longevity, *Aging Cell*, 7, 438-40.
182. HOTAMISLIGIL, G. S., SHARGILL, N. S. & SPIEGELMAN, B. M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science*, 259, 87-91.
183. VAN GAAL, L. F., MERTENS, I. L. & DE BLOCK, C. E. (2006) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease, *Nature*, 444, 875-80.

184. SHIMOMURA, I., FUNAHASHI, T., TAKAHASHI, M. et al. (1996) Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity, *Nature Medicine*, 2, 800-3.
185. OUCHI, N., KIHARA, S., FUNAHASHI, T. et al. (2003) Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue, *Circulation*, 107, 671-4.
186. CUEVAS, X., GARCIA, F., MARTIN-MALO, A. et al. (2012) Risk factors associated with cardiovascular morbidity and mortality in Spanish incident hemodialysis patients: two-year results from the ANSWER study, *Blood Purification*, 33, 21-9.
187. YEN, T. H., LIN, J. L., LIN-TAN, D. T. & HSU, C. W. (2010) Association between body mass and mortality in maintenance hemodialysis patients, *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 14, 400-8.
188. TANNER, R. M., BROWN, T. M. & MUNTNER, P. (2012) Epidemiology of obesity, the metabolic syndrome, and chronic kidney disease, *Current Hypertension Reports*, 14, 152-9.
189. KALANTAR-ZADEH, K., ABBOTT, K. C., SALAHUDEEN, A. K., KILPATRICK, R. D. & HORWICH, T. B. (2005) Survival advantages of obesity in dialysis patients, *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 543-54.
190. LAVIE, C. J., MILANI, R. V. & VENTURA, H. O. (2009) Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss, *Journal of the American College of Cardiology*, 53, 1925-32.
191. CURTIS, J. P., SELTER, J. G., WANG, Y. et al. (2005) The obesity paradox: body mass index and outcomes in patients with heart failure, *Archives of Internal Medicine*, 165, 55-61.
192. KALAITZIDIS, R. G. & SIAMOPOULOS, K. C. (2011) The role of obesity in kidney disease: recent findings and potential mechanisms, *International Urology and Nephrology*, 43, 771-84.
193. BEDDHU, S., PAPPAS, L. M., RAMKUMAR, N. & SAMORE, M. (2003) Effects of body size and body composition on survival in hemodialysis patients, *Journal of the American Society of Nephrology*, 14, 2366-72.
194. KAKIYA, R., SHOJI, T., TSUJIMOTO, Y. et al. (2006) Body fat mass and lean mass as predictors of survival in hemodialysis patients, *Kidney International*, 70, 549-56.
195. SCHINDLER, R., BOENISCH, O., FISCHER, C. & FREI, U. (2000) Effect of the hemodialysis membrane on the inflammatory reaction in vivo, *Clinical Nephrology*, 53, 452-9.
196. BOLOGA, R. M., LEVINE, D. M., PARKER, T. S. et al. (1998) Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients, *American Journal of Kidney Diseases*, 32, 107-14.
197. MAEDA, K., OKUBO, K., SHIMOMURA, I. et al. (1996) cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221, 286-9.
198. ARITA, Y., KIHARA, S., OUCHI, N. et al. (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257, 79-83.
199. ASO, Y., YAMAMOTO, R., WAKABAYASHI, S. et al. (2006) Comparison of serum high-molecular weight (HMW) adiponectin with total adiponectin concentrations in type 2 diabetic patients with coronary artery disease using a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect HMW adiponectin, *Diabetes*, 55, 1954-60.
200. OUCHI, N., KIHARA, S., ARITA, Y. et al. (1999) Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin, *Circulation*, 100, 2473-6.
201. CHEN, H., MONTAGNANI, M., FUNAHASHI, T., SHIMOMURA, I. & QUON, M. J. (2003) Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 45021-6.
202. MOTOSHIMA, H., WU, X., MAHADEV, K. & GOLDSTEIN, B. J. (2004) Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial

- cells treated with oxidized LDL, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315, 264-71.
203. OKUI, H., HAMASAKI, S., ISHIDA, S. et al. (2008) Adiponectin is a better predictor of endothelial function of the coronary artery than HOMA-R, body mass index, immunoreactive insulin, or triglycerides, *International Journal of Cardiology*, 126, 53-61.
  204. JIA, T., CARRERO, J. J., LINDHOLM, B. & STENVINKEL, P. (2012) The complex role of adiponectin in chronic kidney disease, *Biochimie*, 94, 2150-2156.
  205. HEITZER, T., SCHLUNZIG, T., KROHN, K., MEINERTZ, T. & MÜNDEL, T. (2001) Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress, and Risk of Cardiovascular Events in Patients With Coronary Artery Disease, *Circulation*, 104, 2673-2678.
  206. YUDKIN, J. S., STEHOUWER, C. D. A., EMEIS, J. J. & COPPACK, S. W. (1999) C-Reactive Protein in Healthy Subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction: A Potential Role for Cytokines Originating From Adipose Tissue?, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 19, 972-978.
  207. YILMAZ, M. I., SAGLAM, M., CAGLAR, K. et al. (2006) The Determinants of Endothelial Dysfunction in CKD: Oxidative Stress and Asymmetric Dimethylarginine, *American Journal of Kidney Diseases*, 47, 42-50.
  208. HAND, M. F., HAYNES, W. G. & WEBB, D. J. (1998) Hemodialysis and L-arginine, but not D-arginine, correct renal failure-associated endothelial dysfunction, *Kidney International*, 53, 1068-1077.
  209. MIYAZAKI, H., MATSUOKA, H., ITABE, H. et al. (2000) Hemodialysis Impairs Endothelial Function via Oxidative Stress: Effects of Vitamin E-Coated Dialyzer, *Circulation*, 101, 1002-1006.
  210. MIGLIACCI, R., FALCINELLI, F., IMPERIALI, P. et al. (2004) Endothelial dysfunction in patients with kidney failure and vascular risk factors: acute effects of hemodialysis, *Italian Heart Journal*, 5, 371-7.
  211. CHESEBRO, J. H., KNATTERUD, G., ROBERTS, R. et al. (1987) Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial, Phase I: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. Clinical findings through hospital discharge, *Circulation*, 76, 142-54.
  212. GOLDHABER, S., HEIT, J., SHARMA, G. V. R. K. et al. (1988) Randomised controlled trial of recombinant tissue plasminogen activator versus urokinase in the treatment of acute pulmonary embolism, *The Lancet*, 332, 293-298.
  213. (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, *New England Journal of Medicine*, 333, 1581-7.
  214. YUDKIN, J. S., STEHOUWER, C. D., EMEIS, J. J. & COPPACK, S. W. (1999) C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 19, 972-8.
  215. SCARABIN, P. Y., AILLAUD, M. F., AMOUYEL, P. et al. (1998) Associations of fibrinogen, factor VII and PAI-1 with baseline findings among 10,500 male participants in a prospective study of myocardial infarction--the PRIME Study. Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction, *Thrombosis and Haemostasis*, 80, 749-56.
  216. DAEIHAGH, P., JORDAN, J., CHEN, J. & ROCCO, M. (2000) Efficacy of tissue plasminogen activator administration on patency of hemodialysis access catheters, *American Journal of Kidney Diseases*, 36, 75-9.
  217. PAULSEN, D., REISOETHER, A., AASEN, M. & FAUCHALD, P. (1993) Use of tissue plasminogen activator for reopening of clotted dialysis catheters, *Nephron*, 64, 468-70.

218. HEMMELGARN, B. R., MOIST, L. M., LOK, C. E. et al. (2011) Prevention of dialysis catheter malfunction with recombinant tissue plasminogen activator, *New England Journal of Medicine*, 364, 303-12.
219. SPEISER, W., WOJTA, J., KORNINGER, C. et al. (1987) Enhanced fibrinolysis caused by tissue plasminogen activator release in hemodialysis, *Kidney International*, 32, 280-3.
220. TOMURA, S., NAKAMURA, Y., DOI, M. et al. (1996) Fibrinogen, coagulation factor VII, tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, and lipid as cardiovascular risk factors in chronic hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients, *American Journal of Kidney Diseases*, 27, 848-54.
221. DITTMAN, W. A. & MAJERUS, P. W. (1990) Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant, *Blood*, 75, 329-36.
222. SEGARRA, A., CHACON, P., MARTINEZ-EYARRE, C. et al. (2001) Circulating levels of plasminogen activator inhibitor type-1, tissue plasminogen activator, and thrombomodulin in hemodialysis patients: biochemical correlations and role as independent predictors of coronary artery stenosis, *Journal of the American Society of Nephrology*, 12, 1255-63.
223. COSTA, E., PEREIRA, B. J., ROCHA-PEREIRA, P. et al. (2008) Role of prohepcidin, inflammatory markers and iron status in resistance to rhEPO therapy in hemodialysis patients, *American Journal of Nephrology*, 28, 677-83.
224. BAZELEY, J., BIEBER, B., LI, Y. et al. (2011) C-reactive protein and prediction of 1-year mortality in prevalent hemodialysis patients, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6, 2452-61.
225. LIBETTA, C., SEPE, V., ESPOSITO, P., et al. (2011) Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis, *Clinical Biochemistry*, 44, 1189-98.
226. DRAKESMITH, H. & PRENTICE, A. M. (2012) Hecpidin and the iron-infection axis, *Science*, 338, 768-72.
227. BOLOGA, R. M., LEVINE, D. M., PARKER, T. S. et al. (1998) Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients, *American Journal of Kidney Diseases*, 32, 107-114.
228. WRIGHTING, D. M. & ANDREWS, N. C. (2006) Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3, *Blood*, 108, 3204-9.
229. PRECOURT, L. P., AMRE, D., DENIS, M. C. et al. (2011) The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation, *Atherosclerosis*, 214, 20-36.
230. DANTOINE, T. F., DEBORD, J., CHARMES, J. P. et al. (1998) Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure, *Journal of the American Society of Nephrology*, 9, 2082-8.
231. RAJKOVIC, M. G., BARISIC, K., JURETIC, D. et al. (2011) Polymorphisms of pon1 and pon2 genes in hemodialyzed patients, *Clinical Biochemistry*, 44, 964-8.
232. PARAGH, G., SERES, I., BALOGH, Z. et al. (1998) The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia, *Nephron*, 80, 166-70.
233. RAINWATER, D. L., RUTHERFORD, S., DYER, T. D. et al. (2009) Determinants of variation in human serum paraoxonase activity, *Heredity (Edinb)*, 102, 147-54.
234. JAMES, R. W. & DEAKIN, S. P. (2004) The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity, *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 1986-94.
235. FEINGOLD, K. R., MEMON, R. A., MOSER, A. H. et al. (1998) Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response, *Atherosclerosis*, 139, 307-315.
236. IKEDA, Y., SUEHIRO, T., ITAHARA, T. et al. (2007) Human serum paraoxonase concentration predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients, *Clinical Nephrology*, 67, 358-65.

237. GUGLIUCCI, A., MEHLHAFF, K., KINUGASA, E. et al. (2007) Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: correlation with low molecular AGE adduct clearance, *Clinica Chimica Acta*, 377, 213-20.
238. HENNING, B. F., HOLZHAUSEN, H. & TEPEL, M. (2010) Continuous reduction of plasma paraoxonase activity with increasing dialysis vintage in hemodialysis patients, *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 14, 572-6.
239. MARSILLACH, J., MARTINEZ-VEA, A., MARCAS, L. et al. (2007) Administration of exogenous erythropoietin beta affects lipid peroxidation and serum paraoxonase-1 activity and concentration in predialysis patients with chronic renal disease and anaemia, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34, 347-9.
240. PALACIO, S., GONZALES, N. R., SANGHA, N. S., et al. (2011) Thrombolysis for acute stroke in hemodialysis: international survey of expert opinion, *Clin Journal of the American Society of Nephrology*, 6, 1089-93.
241. ADAMCZAK, M., CHUDEK, J. & WIĘCEK, A. (2009) Adiponectin in Patients with Chronic Kidney Disease, *Seminars in Dialysis*, 22, 391-395.
242. FANTUZZI, G. (2008) Adiponectin and inflammation: Consensus and controversy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, 326-330.
243. DRECHSLER, C., KRANE, V., WINKLER, K., et al. (2009) Changes in adiponectin and the risk of sudden death, stroke, myocardial infarction, and mortality in hemodialysis patients, *Kidney International*, 76, 567-575.
244. OHASHI, N., KATO, A., MISAKI, T. et al. (2008) Association of serum adiponectin levels with all-cause mortality in hemodialysis patients, *Internal Medicine*, 47, 485-91.
245. MENON, V., LI, L., WANG, X. et al. (2006) Adiponectin and Mortality in Patients with Chronic Kidney Disease, *Journal of the American Society of Nephrology*, 17, 2599-2606.
246. VOKURKA, M., KRIJT, J., SULC, K. et al. (2006) Hcpidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis, *Physiological Research*, 55, 667-74.
247. NASCIMENTO, H., SILVA, L., LOURENÇO, P. & ET AL. (2009) Lipid profile in portuguese obese children and adolescents: Interaction of apolipoprotein e polymorphism with adiponectin levels, *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 163, 1030-1036.
248. MILLER, M., STONE, N. J., BALLANTYNE, C. et al. (2011) Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, *Circulation*, 123, 2292-333.
249. BAGDADE, J. D., PORTE, D., JR. & BIERMAN, E. L. (1968) Hypertriglyceridemia. A metabolic consequence of chronic renal failure, *New England Journal of Medicine*, 279, 181-5.
250. TSIMIHODIMOS, V., DOUNOUSI, E. & SIAMOPOULOS, K. C. (2008) Dyslipidemia in Chronic Kidney Disease: An Approach to Pathogenesis and Treatment, *American Journal of Nephrology*, 28, 958-973.
251. KALANTAR-ZADEH, K., BLOCK, G., HUMPHREYS, M. H. et al. (2003) Reverse epidemiology of cardiovascular risk factors in maintenance dialysis patients, *Kidney International*, 63, 793-808.
252. FLOEGE, J., GILLESPIE, I. A., KRONENBERG, F. et al. (2015) Development and validation of a predictive mortality risk score from a European hemodialysis cohort, *Kidney International*.
253. LIU, J., HUANG, Z., GILBERTSON, D. T., et al. (2010) An improved comorbidity index for outcome analyses among dialysis patients, *Kidney International*, 77, 141-51.
254. PALMER, S. C., RUOSPO, M., CAMPBELL, K. L. et al. (2015) Nutrition and dietary intake and their association with mortality and hospitalisation in adults with chronic kidney disease treated with haemodialysis: protocol for DIET-HD, a prospective multinational cohort study, *British Medical Journal Open*, 5, e006897.