



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

*O papel da eriptose e de mediadores inflamatórios na anemia de
pacientes com doença renal crônica*

Aluna: Erika Sousa Dias
Orientadora: Profa. Dra. Andrea N Moreno Amaral
Co-orientador: Thyago Proença de Moraes

Curitiba, agosto/2024



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

*O papel da eriptose e de mediadores inflamatórios na anemia de
pacientes com doença renal crônica*

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea N Moreno Amaral
Co-orientador: Thyago Proença de Moraes

Curitiba, agosto/2024

Folha Informativa

Este documento foi elaborado seguindo as novas normas estabelecidas pela ABNT e o trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Anemia e Imunologia (LabAIRe), do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) localizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) com orientação da Profa. Dra. Andrea N Moreno Amaral e coorientação do Prof. Dr. Thyago Proença de Moraes.

Todos os envolvidos na pesquisa declaram não haver nenhum conflito de interesse.

Para a elaboração deste trabalho não foi utilizado inteligência artificial. Para organização das referências foi utilizado o programa Mendeley.

Durante o mestrado, a aluna recebeu bolsa CAPES por 24 meses.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a todos os participantes deste estudo que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e aceitaram realizar coletas adicionais de sangue durante seus exames.

Sou grata à CAPES pela bolsa concedida durante o período de 2022-2024.

Minha gratidão também vai para as minhas colegas e grandes amigas de laboratório: Júlia Bacarin Monte Alegre (mestranda), Gabriela Bohnen (mestre e doutoranda), Beatriz Akemi (mestre e doutoranda), e Dra. Marina De Castro Deus.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Profa. Dra. Andrea Novais Moreno Amaral, por confiar no meu trabalho e me proporcionar as melhores oportunidades desde 2019.

Também agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Thyago Moraes, pelo suporte nas análises estatísticas deste estudo, e à equipe técnica do LEM, que sempre esteve disponível para me auxiliar em tudo.

As minhas amigas Luanna Bomfim e Jéssica Seidenfuss por todo apoio durante todos esses anos.

Agradeço de coração à minha família, especialmente à minha madrastra Adriana Macedo, aos meus irmãos Henrique Sousa Dias e Rafaela Macedo Dias, e ao meu namorado Henrique Begnini Dallazen.

Um agradecimento especial ao meu pai, Gilvan Silveira Dias, que sempre me incentivou a seguir meus sonhos, mesmo que isso significasse me mudar da Bahia para o Paraná. Seu apoio e generosidade foram fundamentais em cada etapa dessa jornada.

Por fim, presto minha homenagem à memória da minha mãe, Mileide Cristine Maia de Sousa, uma mulher incrível que me inspira profundamente como pessoa, mesmo após sua partida.

Lista de Figuras

Figura 1: Prognóstico da DRC por categoria de TFG e albuminúria	15
Figura 2: Mecanismos subjacentes a anemia renal	17
Figura 3: Representação da sinalização, vida útil e ambiente redox dos eritrócitos	20
Figura 4: Eriptose sendo indicada pela exposição da FS (A) e níveis de Ca intracelular (B).....	21
Figura 5: Representação dos mecanismos associados à anemia e a inflamação.....	24
Figura 6: Representação gráfica de como foram realizadas as etapas experimentais do estudo.....	27
Figura 7: Correlação entre cálcio intracelular ($icCa^{2+}$) e eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (FS).....	32
Figura 8: Correlação entre eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (FS) e a citocina IL-6.....	32
Figura 9: Correlação entre eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (FS) e a citocina IL-1 β	33
Figura 10: Correlação entre eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (FS) e a citocina IFN- γ	33
Figura 11: Correlação entre eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (FS) e a citocina TNF- α	34
Figura 12: Correlação entre eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (FS) e os valores de Hemoglobina (Hb).....	34
Figura 13: Correlação entre a citocina IL-6 e os valores de hemoglobina (Hb).....	35
Figura 14: Correlação entre a citocina IFN- γ e os valores de hemoglobina (Hb).....	35
Figura 15: Correlação entre a citocina IL-1 β e os valores de hemoglobina (Hb).....	36
Figura 16: Correlação entre a citocina TNF- α e os valores de hemoglobina (Hb).....	36
Figura 17: Gráfico de Dispersão entre os níveis de A: IL-6, B: IFN- γ ; C: IL-1 β e D: TNF- α com a % da exposição de fosfatidilserina (FS) e níveis de hemoglobina (Hb).....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características demográficas e laboratoriais dos grupos Doença renal crônica V (DRC-V), Diálise Peritoneal (DP) e Hemodiálise (HD)..... 30

Tabela 2: Representação dos valores de média $\pm$ desvio padrão dos marcadores utilizados no estudo dos grupos doença renal crônica estágio V (DRC-V), Diálise Peritoneal (DP) e Hemodiálise (HD)..... 31

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

AEE	Agentes estimuladores de eritropoiese
Ca ²⁺	Cálcio
DD	Dependentes de diálise
DP	Diálise peritoneal
DRC	Doença Renal Crônica
DRC-V	Doença Renal Crônica estágio V
ELISA	do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPO	Eritropoetina
FS	Fosfatidilserina
Hb	Hemoglobina
HD	Hemodiálise
HIF	Fator induzível por hipóxia
HIF-PHI	Hidroxilase prólil de fator induzível por hipóxia
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
IS	Indoxil sulfato
LabAIRe	Laboratório de Pesquisa em Anemia e Imunologia
MFI	Média de intensidade de fluorescência
NDD	Não dependentes de diálise
O ₂	Oxigênio
PPGCS	Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
PTH	Paratormônio
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TU	Toxinas urêmicas

RESUMO

Introdução: A eriptose, ou morte programada dos eritrócitos, é um processo naturalmente induzido pela senescência celular. No entanto, na doença renal crônica (DRC), esse fenômeno ocorre de forma aumentada e está associado à anemia renal, uma complicação comum nessa população. A eriptose na DRC pode ser desencadeada por toxinas urêmicas e citocinas inflamatórias. Nesse contexto, em indivíduos com DRC, a inflamação crônica é prevalente e está intimamente ligada à anemia renal. **Objetivos:** Desta forma, no presente estudo buscou-se identificar a correlação entre a eriptose, os mediadores inflamatórios e a anemia, em pacientes com DRC no estágio V (DRC-V), divididos de acordo com a modalidade de diálise. **Metodologia:** Foram incluídos no estudo 41 pacientes DRC-V, sendo 19 pacientes em hemodiálise (HD) e 22 em diálise peritoneal (DP). Os eritrócitos foram isolados de sangue periférico e marcados com Anexina-V⁺ para detecção da exposição de fosfatidilserina (FS) e Fluo4-AM para cálcio intracelular (icCa²⁺). As leituras foram realizadas por citometria de fluxo. O soro obtido das amostras foi mensurado quanto as concentrações das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-1 β através do método de ELISA. Análise estatística foi realizada com o programa Prism GraphPad 10. **Resultados:** Observou-se maiores níveis de exposição de FS e icCa²⁺ no grupo HD em comparação à DP. Com exceção do TNF- α , todas as citocinas apresentaram maior concentração em HD comparado à DP. Observa-se correlação entre FS e icCa²⁺ em DRC-V e HD. Ainda, altas concentrações de IL-6 correlacionaram-se com alta expressão de FS nos grupos DRC-V e DP. O mesmo foi observado para as citocinas IL-1 β e IFN- γ no grupo DRC-V. Ainda, foi possível observar que o aumento da expressão de FS correlacionou-se com níveis baixos de Hb nos grupos DRC-V e HD. Da mesma forma, concentrações elevadas de IFN- γ , IL-1 β correlacionam-se com baixos níveis de Hb em todos os grupos estudados. Já TNF- α apresentou correlação com Hb somente no grupo HD. Nos grupos DRC-V e HD, pontos com concentrações elevadas de IFN- γ , IL-1 β e TNF- α se encontram nos menores valores de Hb ≤ 11 g/dL e maior exposição de FS. **Conclusão:** A eriptose e a inflamação estão correlacionadas com a anemia renal em pacientes DRC-V, especialmente em pacientes submetidos à hemodiálise (HD). Esses achados indicam que tanto a eriptose quanto a inflamação podem servir como biomarcadores úteis para monitorar a anemia renal. Além disso, os resultados sugerem que intervenções terapêuticas direcionadas para reduzir a eriptose e a inflamação podem ser abordagens promissoras para o tratamento da anemia renal em pacientes com DRC-V.

Palavras-chave: Eriptose; Anemia; Inflamação; Doença renal crônica

ABSTRACT

Introduction: Eryptosis, or programmed erythrocyte death, is naturally induced by cellular senescence. However, in chronic kidney disease (CKD), this phenomenon occurs in an increased manner and is associated with renal anemia, a common complication in this population. Uremic toxins and inflammatory cytokines can trigger eryptosis in CKD. In this context, in individuals with CKD, chronic inflammation is prevalent and is closely linked to renal anemia. **Objectives:** Thus, in the present study, we sought to identify the correlation between eryptosis, inflammatory mediators, and anemia in patients with CKD stage V (CKD-V), divided according to the dialysis modality. **Objectives:** This study aimed to identify the correlation between eryptosis, inflammatory mediators, and anemia, assessed through hemoglobin (Hb) levels, in patients with CKD stage V (CKD-V), divided according to dialysis modality. **Methodology:** Forty-one CKD-V patients were included in the study, with 19 patients on hemodialysis (HD) and 22 on peritoneal dialysis (PD). Erythrocytes were isolated from peripheral blood and stained with Annexin-V⁺ to detect phosphatidylserine (PS) exposure and Fluo4-AM for intracellular calcium (icCa²⁺) detection. Readings were performed using flow cytometry. Serum cytokine concentrations, including IL-6, IFN- γ , TNF- α , and IL-1 β , were measured using the ELISA method. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 10. **Results:** Higher levels of PS exposure and icCa²⁺ were observed in the HD group compared to the PD group. Except for TNF- α , all cytokines showed higher concentrations in the HD group compared to the PD group. A correlation was observed between PS and icCa²⁺ in both CKD-V and HD groups. Additionally, high concentrations of IL-6 were correlated with increased PS expression in the CKD-V and PD groups. Similar correlations were observed for IL-1 β and IFN- γ in the CKD-V group. Furthermore, increased PS expression was associated with lower Hb levels in the CKD-V and HD groups. Similarly, elevated concentrations of IFN- γ and IL-1 β were correlated with lower Hb levels across all groups studied. TNF- α was correlated with Hb levels only in the HD group. In the CKD-V and HD groups, higher IFN- γ , IL-1 β , and TNF- α concentrations were found in patients with Hb levels ≤ 11 g/dL and higher PS exposure. **Conclusion:** This study suggests that eryptosis and inflammation are correlated with renal anemia in CKD-V patients, especially in patients undergoing hemodialysis (HD). These findings indicate that eryptosis and inflammation may be helpful biomarkers for monitoring renal anemia. Furthermore, the results suggest that targeted therapeutic interventions to reduce eryptosis and inflammation may be promising approaches for treating renal anemia in CKD-V patients.

Keywords: Eryptosis; Anemia; Inflammation; Chronic Kidney Disease

RESUMO POPULAR

Indivíduos com doença renal crônica geralmente desenvolvem anemia com o avanço da doença. Isso acontece quando ocorre diminuição do número de glóbulos vermelhos, que são células que transportam oxigênio no corpo. E não é só isso, a inflamação também aparece nesses indivíduos e pode piorar ainda mais a anemia, atrapalhando a produção desses glóbulos vermelhos. Ainda, esses glóbulos vermelhos (também conhecidos como eritrócitos) podem entrar em morte celular programada chamada eriptose por conta dessa inflamação. Nosso estudo avaliou a relação da eriptose e a inflamação com a anemia nesses indivíduos. Os resultados revelaram uma forte ligação entre inflamação, eriptose e anemia nesses pacientes. Esses resultados podem abrir caminho para novas formas de tratar a anemia nesses indivíduos, com foco em controlar a inflamação e a eriptose. É uma forma de melhorar a qualidade de vida e reduzir a mortalidade desses pacientes.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Doença Renal Crônica e anemia renal	15
3.2 Eriptose	18
3.3 Toxinas urêmicas	21
3.4 Inflamação.....	22
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo geral.....	26
4.2 Objetivos específicos	26
5. METODOLOGIA	27
5.1 População e desenho do estudo	28
5.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	28
5.3 Amostra.....	28
5.4 Quantificação da fosfatidilserina	28
5.5 Níveis de cálcio intracelular (icCa^{2+})	29
5.6 Dosagem dos mediadores inflamatórios	29
5.7 Análise estatística.....	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1 Dados da população	30
6.2 Correlação entre os marcadores de eriptose (FS e icCa^{2+}) nos grupos	31
6.3 Correlação entre fosfatidilserina e mediadores inflamatórios	32
6.4 Correlação entre hemoglobina (Hb) e FS	34
6.5 Correlação entre hemoglobina e mediadores inflamatórios.....	35
6.6 Dispersão entre hemoglobina, citocinas e fosfatidilserina	36
7. DISCUSSÃO	38
8. CONCLUSÃO	43
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
Referências bibliográficas.....	45

1. INTRODUÇÃO

A Doença Renal Crônica (DRC) possui uma prevalência mundial estimada entre 11 e 13%, em que a taxa global de mortalidade em todas as idades aumentou cerca de 41,5% entre 1990 e 2017 (Bikbov *et al.*, 2020; Hill *et al.*, 2016). A anemia é uma complicação comum em pacientes renais crônicos e está associada com um aumento na morbidade e mortalidade. A prevalência da anemia aumenta com o estágio da DRC, tendo 22,4% e 41,3% nos estágios 3 e 4 da DRC, respectivamente (Gilbertson *et al.*, 2016), com taxas de 53,9% até 90% em pacientes no estágio 5 (Gilbertson *et al.*, 2016, Palaka *et al.*, 2020). A anemia é uma complicação multifatorial, porém alguns fatores já foram associados com a fisiopatologia da doença, como a redução progressiva na produção e secreção de eritropoetina (EPO), deficiência absoluta do ferro, inflamação sistêmica, diminuição da resposta da medula óssea à EPO por conta de toxinas urêmicas e diminuição da expectativa de vida dos eritrócitos (Portolés *et al.*, 2021).

Pacientes com DRC enfrentam um estado inflamatório crônico, que está associado a uma série de fatores adversos como maior incidência de infecções, aterosclerose e aumento nos níveis séricos de citocinas inflamatórias (Gluba Brzózka *et al.*, 2020). Alguns elementos também contribuem para a persistência da inflamação nesse grupo de pacientes, incluem-se o ambiente urêmico, estresse oxidativo, diminuição da depuração de citocinas e aspectos relacionados a diálise (Gluba Brzózka *et al.*, 2020; Malyszko; Mysliwiec, 2007).

Tanto mediadores inflamatórios (Bester; Pretorius, 2016) como toxinas urêmicas (Dias *et al.*, 2021; Tozoni *et al.*, 2019, Virzì *et al.*, 2019) foram considerados indutores da eriptose, morte programada dos eritrócitos, desencadeada pelo aumento do cálcio intracelular que induz a exposição da fosfatidilserina (FS) na superfície celular (Lang; Lang, 2015; Lang; Qadri; Lang, 2012). Com aumento da exposição de FS, os eritrócitos são removidos da circulação por eritrofagocitose (Bonan *et al.*, 2016). Em pacientes em estágios mais

avançados da DRC foi observado um aumento significativo de eriptose comparado com indivíduos saudáveis, sendo esse aumento relacionado com a presença de toxinas urêmicas, estresse oxidativo, inflamação e ao tratamento da diálise (hemodiálise ou diálise peritoneal) (Bissinger *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2021; Lang *et al.*, 2017; Repsold; Joubert, 2018).

Neste contexto, apesar dos avanços significativos na pesquisa sobre a DRC e a anemia renal, ainda há uma lacuna substancial no entendimento da relação entre os marcadores da eriptose e os mediadores inflamatórios. Sugere-se que a eriptose possa desempenhar um papel crucial na patogênese da anemia em pacientes com DRC. Ao mesmo tempo, a inflamação sistêmica é uma característica proeminente da DRC e contribui para a progressão da doença e complicações associadas. No entanto, a correlação específica entre a eriptose e a presença de mediadores inflamatórios com a anemia nessa população ainda não está claramente estabelecida na literatura atual.

2. JUSTIFICATIVA

A anemia está associada com o aumento da mortalidade em pacientes renais crônicos, destacando a necessidade de uma investigação aprofundada sobre os mecanismos envolvidos. De um lado, a eritose *per se* é capaz de reduzir o número de eritrócitos circulantes, podendo contribuir para a anemia renal, considerando que os pacientes não conseguem compensar a perda de eritrócitos através do aumento da eritropoiese. Por outro lado, pacientes com DRC apresentam um estado crônico inflamatório, em que mediadores inflamatórios foram relacionados com supressão da eritropoiese.

Portanto, há uma lacuna significativa no entendimento de como esses processos interagem e contribuem para a anemia na população renal crônica. Investigar essa relação não só preencherá uma lacuna de conhecimento, mas também lançará luz sobre os mecanismos subjacentes à anemia renal. Além disso, a compreensão desses parâmetros pode potencialmente delinear novas estratégias terapêuticas, como o uso de tratamentos com anticitocinas, que visam abordar a inflamação como uma intervenção direcionada para melhorar os resultados clínicos em pacientes com DRC e anemia renal.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doença renal Crônica e anemia renal

A Doença Renal Crônica (DRC) é definida pela diminuição da função renal medida pela taxa de filtração glomerular (TFG) inferior a 60 mL/min por 1,73 m² e/ou marcadores de dano renal que perdurem por mais três meses (Webster *et al.*, 2017). É classificada conforme a TFG e os níveis de albuminúria (Figura 1). Nos estágios mais avançados da doença, os pacientes precisam de terapia renal substitutiva, o que significa que devem fazer tratamentos como: hemodiálise (HD), diálise peritoneal (DP) ou transplante renal (KDIGO, 2024; Webster *et al.*, 2017). No Brasil, 95,3% dos pacientes fazem em hemodiálise e 4,7% diálise peritoneal (DP) (Nerbass *et al.*, 2023).

Prognóstico de DRC por Categorias de TFG e Albuminúria				Categorias de Albuminúria Persistente Descrição e classe		
				A1	A2	A3
				Normal ou levemente aumentada	Moderadamente aumentada	Severamente aumentada
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30–300 mg/g 3–30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
TFG Categorias (ml/min/1,73 m ²) Descrição e classe	G1	Normal ou alta	≥90			
	G2	Levemente reduzida	60–89			
	G3a	Leve a moderadamente reduzida	45–59			
	G3b	Moderada a severamente reduzida	30–44			
	G4	Severamente reduzida	15–29			
	G5	Falência renal	<15			

Figura 1: Prognóstico da DRC por categoria de TFG e albuminúria KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes). Verde significa baixo risco se não teve outros marcadores para doença renal; amarelo significa risco moderadamente aumentado; laranja significa alto risco; vermelho significa muito alto risco. Fonte: Adaptado de KDIGO, 2024

A HD é realizada em uma unidade de diálise ambulatorial, geralmente três vezes por semana, com cada sessão durando entre 3 e 4 horas. O procedimento requer acesso a vasculatura por uma fistula arteriovenosa e uso de uma máquina de diálise na qual o sangue

é limpo removendo produtos de retenção urêmica por uma membrana semipermeável. Já a DP é realizada em casa pelo pacientes, diariamente. Dessa forma, ocorrem menos visitas a unidade de diálise (uma vez por mês) e esse tipo de diálise requer o acesso a cavidade peritoneal por meio de um cateter peritoneal (Rubin *et al.*, 2004).

A DRC é normalmente assintomática ou causa sintomas inespecíficos, como por exemplo: letargia, coceira ou perda de apetite. Entretanto, possui uma alta prevalência global (entre 11 e 13% da população), em que todos os estágios da doença estão associados com riscos para problemas cardiovasculares e diminuição da qualidade de vida (Hill *et al.*, 2016; Webster *et al.*, 2017). A prevalência global da DRC aumentou cerca de 86,95% e a taxa de mortalidade de 98,02% entre 1990 e 2016 (Xie *et al.*, 2018). Diversas complicações são encontradas na DRC, como: hipertensão arterial, anemia, desnutrição e doença mineral óssea (Bello *et al.*, 2017).

A anemia em pacientes com DRC é caracterizada por ser normocítica, normocrômica e hipoproliferativa, ou seja, o tamanho e a forma dos eritrócitos se mantêm normais, entretanto ocorre uma diminuição na circulação das células. É uma comorbidade multifatorial, os principais fatores que contribuem com essa complicação nesse grupo de pacientes são: deficiência relativa de eritropoetina (EPO), inibidores de eritropoiese induzidos pela uremia, diminuição do tempo de vida útil dos eritrócitos, desequilíbrio na homeostase do ferro (Babitt; Lin, 2012). Está entre as comorbidades mais comuns nesse grupo de pacientes, sendo relacionada com a diminuição da qualidade de vida, aumento do risco de hospitalização e mortalidade (Portolés *et al.*, 2021).

O ferro e a EPO estão envolvidos na produção de eritrócitos na medula óssea, enquanto a hepcidina, um hormônio hepático, regula a disponibilidade do ferro e a sua reciclagem pelos macrófagos. A produção de hepcidina é estimulada por três fatores: inflamação, excesso de ferro e anemia ou hipóxia. Entretanto, o excesso de hepcidina possui um papel

significativo no desequilíbrio de ferro, o que contribui para o desenvolvimento na anemia na doença renal crônica (Babitt; Lin, 2012; Yilmaz *et al.*, 2011).

Citocinas inflamatórias suprimem a eritropoiese na medula óssea, a produção de EPO no rim e estimulam a produção de hepcidina, impactando na absorção do ferro. Nos pacientes com DRC os níveis de hepcidina são elevados, indícios indicam que devido a redução da depuração renal e a inflamação. Além disso, a DRC também inibe a produção de EPO pelos rins e induz a presença inibidores urêmicos resultando em uma diminuição da vida útil dos eritrócitos e um aumento da perda de sangue (Figura 2) (Babitt; Lin, 2012; July; Koury; Haase, 2015).

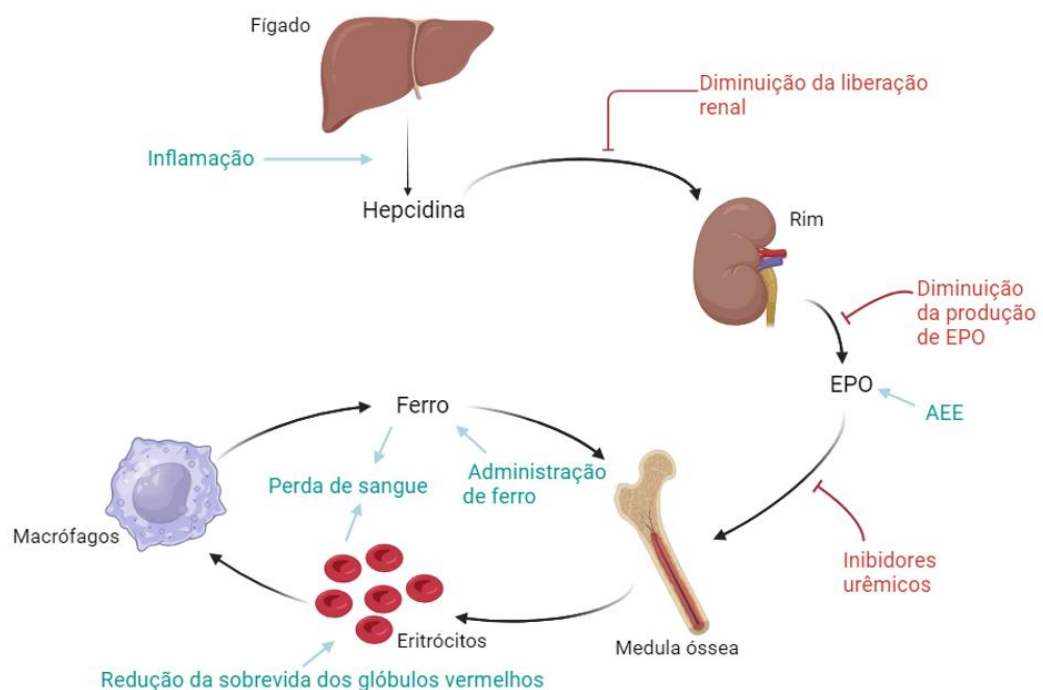


Figura 2: Mecanismos subjacentes a anemia renal. As setas pretas representam os fluxos de ferro e hormonais e cinzas os processos regulatórios, ambos simbolizam o que ocorre no processo fisiológico. As setas coloridas (verde e vermelho) referem-se as consequências adicionais que ocorrem na DRC, em que o verde indica ativação e o vermelho inibição. Fonte: Adaptado de Babitt & Lin, 2012 pelo Biorender.

Pacientes com DRC podem ser divididos em dois grupos, com base se realizam ou não a diálise, os não dependentes de diálise (NDD) e os dependentes de diálise (DD). A anemia ocorre em 60% dos pacientes NDD e 93% dos DD (Evans *et al.*, 2020). Em outro estudo,

a anemia esteve presente em 47,7% dos 5.222 pacientes em pré-diálise, foi sugerido que a prevalência da anemia aumentou à medida que a função renal diminuiu (McClellan *et al.*, 2004). Esta condição também se desenvolve nos estágios iniciais da DRC e se torna mais frequente de acordo com a diminuição da taxa de filtração glomerular, em que uma incidência de 10% já observada no estágio 1 e um aumento de 70% no estágio 5 (Yilmaz *et al.*, 2011).

Pacientes com DRC em HD tendem a apresentar anemia mais grave comparada com os que realizam o tratamento com a DP, devido a maior perda de sangue e hemólise que ocorre na hemodiálise, além disso, na DP ocorre uma melhor remoção de moléculas que não foram completamente identificadas, mas que são associadas a inibição da eritropoiese (Macdougall, 2007). A diretriz “KDOQI Anemia Guideline, 2006”, explica que existem mais benefícios na qualidade de vida de um paciente renal crônico com a Hemoglobina (Hb) em $\geq 11,0$ g/dL ao invés dos riscos de manter a Hb >13 g/dL.

Os atuais tratamentos para a anemia incluem: suplementação com ferro, transfusão de sangue, agentes estimuladores de eritropoiese (AEE), inibidores da hidroxilase prólil de fator induzível por hipóxia (HIF-PHI) (Sonia *et al.*, 2023). No tratamento com AEE cerca de 10% dos pacientes são hipo ou não responsivos a essa abordagem (Swinkels; Winkels; Wetzels, 2008). A hiporresponsividade à EPO pode ser definida através de três fatores: aumento na quantidade de dose necessária a AEE, uma diminuição dos níveis de hemoglobina quando a dose é mantida constante e falha em aumentar o nível de Hb em >11 g/dL quando a administração de AEE ultrapassa 500UI/Kg/Semana (KDOQI Anemia Guideline, 2006).

3.2 Eriptose

Os eritrócitos representam a célula mais comum no sangue adulto, com uma média de vida de 120 dias em indivíduos saudáveis. São caracterizados por serem células bicôncavas,

sem núcleo e mitocôndrias. Essa estrutura permite o acúmulo da proteína hemoglobina (Hb), responsável pelo transporte de oxigênio (O₂) (Higgins, 2015; Lang; Qadri; Lang, 2012; Minetti *et al.*, 2019).

Novos eritrócitos são produzidos constantemente na medula óssea, esse processo de produção e maturação é chamado de eritropoiese, em que sua regulação é mediada pelo hormônio eritropoetina (EPO), produzida pelos rins, sendo o principal regulador da produção de células vermelhas (Dzierzak; Philipsen, 2013). Em condições de hipóxia, suprimento inadequado de oxigênio aos tecidos, a resposta inicial é a produção de EPO nos rins, a qual é controlada diretamente pela quantidade de oxigênio dos tecidos através do complexo de fatores de transcrição induzidos pela hipóxia (HIF) (Campos *et al.*, 2016; Dzierzak; Philipsen, 2013).

A eriptose é a morte programada dos eritrócitos, caracterizada pelo encolhimento celular e pela exposição da fosfatidilserina (FS) da membrana interna para externa (Lang; Qadri; Lang, 2012; Lang *et al.*, 2010). Desencadeada pelo aumento do influxo de Ca²⁺ (Cálcio), mediado por canais na membrana da célula que são ativados por estímulos, como: estresse oxidativo, toxinas urêmicas, dentre outros fatores. A contração osmótica leva a entrada do Ca²⁺ e a estimulação de uma esfingomielinase que por consequência forma a ceramida, então a ceramida e Ca²⁺ ativam a scramblase e ocorre a inativação de flippases, gerando uma exposição da fosfatidilserina (FS) (Boulet; Doerig; Carvalho, 2018; Dias *et al.*, 2020; Lang *et al.*, 2007). Diferente da hemólise, a eriptose elimina os eritrócitos através de outro mecanismo, antes mesmo que ocorra a hemólise nos eritrócitos (Lang; Qadri; Lang, 2012).

Eritrócitos que apresentam a FS exposta são removidos da circulação por eritrofagocitose, através de monócitos (Bonan *et al.*, 2016) e macrófagos (Bonomini *et al.*, 2001). A proteína transmembrana CD47 transmite um sinal de “*Don’t eat me*” através da interação com o receptor de macrófago SIRPα, impedindo que ocorra a eritrofagocitose. Em

indivíduos saudáveis, a produção de CD47 diminui após aproximadamente 120 dias, permitindo que o sistema monocítico-macrófago remova os eritrócitos. Entretanto, na DRC a expectativa da vida útil dos eritrócitos é reduzida para cerca de 73 dias e ocorre a exposição da FS na superfície do eritrócito, e a transmissão do sinal “Eat me”. Desse modo, monócitos e macrófagos reconhecem a FS exposta e os eritrócitos são removidos de circulação (Figura 3) (Arias; Arias, 2017; Dias *et al.*, 2020). Se a perda de eritrócitos não for compensada por um aumento da eritropoiese, esse fenômeno pode contribuir para a anemia (Lang *et al.*, 2017).

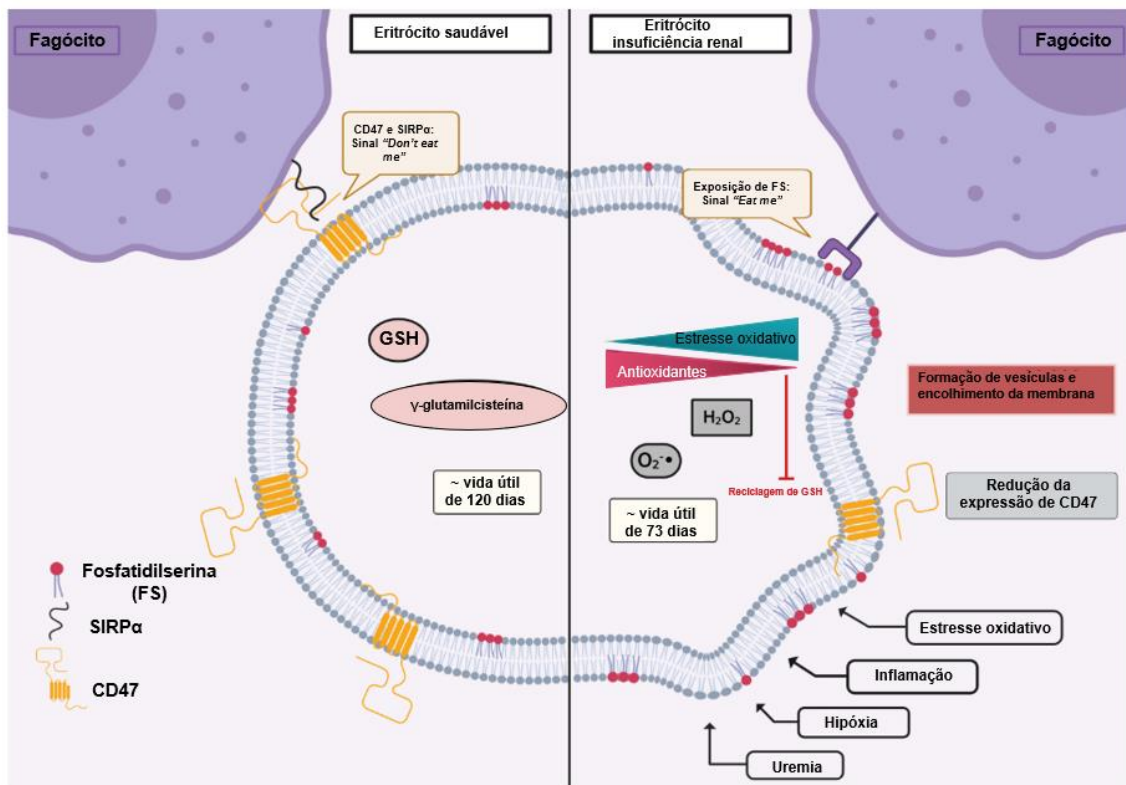


Figura 3: Representação da sinalização, vida útil e ambiente redox dos eritrócitos, sendo separado em condições saudáveis (esquerda) e na doença renal (direita). Fonte: Adaptado de Dias e colaboradores (2020).

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, verificou-se que os dois marcadores de eritrose (FS e níveis de Ca^{2+} intracelular) foram aumentados em pacientes que realizam hemodiálise em comparação com o grupo controle (indivíduos saudáveis). Na exposição da

FS, houve uma diferença significativa entre Pre e pós HD, em que o pós-HD apresentou um aumento no número de eritrócitos com a FS exposta. Entretanto, em relação aos níveis de Ca^{2+} não foi observada diferença significativa entre pré e pós-HD (Figura 4) (Dias *et al.*, 2021).

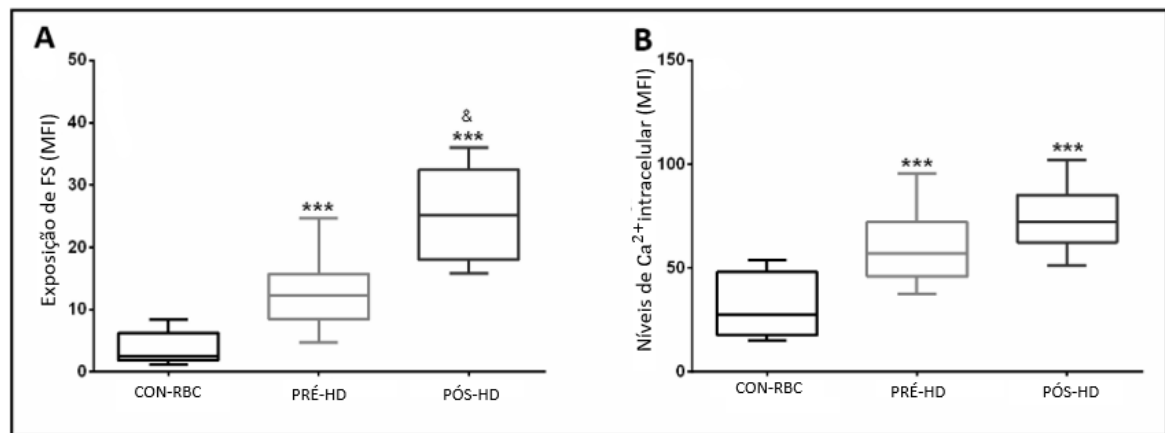


Figura 4: Eriptose sendo indicada pela exposição da FS (A) e níveis de Ca intracelular (B). Os dados estão sendo expressos pela média de intensidade de fluorescência (MFI). CON-RBC: Control Red Blood Cells, HD: Hemodiálise. *** $p < 0,001$ comparando os grupos (pré e pós hemodiálise) com controle. & $p < 0,05$ comparando pré e pós hemodiálise. Fonte: Adaptado de Dias *et al.*, 2021.

3.3 Toxinas urêmicas

A uremia ocorre devido a retenção de solutos, coletivamente chamada de toxinas urêmicas ou solutos urêmicos, quando não são eliminados pelos rins acabam interagindo negativamente com os processos fisiológicos (Hamza; Metzinger; Metzinger-Le Meuth, 2020). As toxinas urêmicas (TUs) podem ser divididos em três categorias: Solutos pequenos sem ligação proteica (<500 Daltons); com ligação proteica; moléculas intermediárias (≥ 500 Daltons) (Vanholder *et al.*, 2003).

Os principais solutos de retenção urêmica de pequeno peso e que apresentam relevância clínica são a ureia e creatinina. Entre as moléculas intermediárias, podem ser incluídos o hormônio paratireoide (PTH), Interleucinas (IL- 6,8 e 10) e TNF- α . Além disso, os produtos de retenção urêmica ligados a proteína incluem o indoxil sulfato, p -cresil sulfato e ácido indol-3-acético (Espí *et al.*, 2020). As TUs contribuem para o estresse oxidativo (Verma et

al., 2021), e apresentam relação com a eriptose, as estudadas até o momento foram: Indoxil sulfato (IS) (Ahmed *et al.*, 2013a), vanadato (Foller *et al.*, 2008), acroleína (Ahmed *et al.*, 2013b) e metilglioxal (Nicolay *et al.*, 2006).

A toxina IS aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e eriptose em eritrócitos do grupo de indivíduos saudáveis (Dias *et al.*, 2018). A acumulação dessas toxinas leva a danos renais, aumento do estresse oxidativo e inflamação (Lu *et al.*, 2021). Na DRC, a presença elevada TUs pode levar a um envelhecimento prematuro de eritrócitos, a uma exposição da FS, além de uma redução da vida útil dessas células (Bonan *et al.*, 2016). O acúmulo de toxinas urêmicas (TUs) também está associado a uma diminuição da produção de eritropoetina pelos rins, a qual compromete a eritropoiese pela medula óssea e dessa forma afeta a produção de eritrócitos, ocasionando anemia em pacientes com problemas renais (Hamza; Metzinger; Metzinger-Le Meuth, 2020).

3.4 Inflamação

A inflamação é a resposta a estímulos biológicos, químicos ou físicos, na fase aguda ocorre a migração de células do sistema imunológico para o local onde ocorreu o estímulo, mediada por citocinas e quimiocinas, entretanto, na fase crônica, a inflamação é persistente e pode causar danos aos tecidos (Germolec *et al.*, 2018). Diversas doenças são associadas a inflamação crônica, como: artrite, diabetes, doenças autoimunes e a DRC (Germolec *et al.*, 2018; Petreski *et al.*, 2021).

Citocinas são proteínas de tamanho pequeno (15-20kDa) e estão envolvidas no desenvolvimento e na regulação da atividade do sistema imunológico. Elas se subdividem em grupos distintos, como as interleucinas que são expressas por leucócitos, Fator de necrose tumoral, em que o alfa é liberado por monócitos/macrófagos e Interferons que podem ser divididos em três grupos, em que o tipo 2 é conhecido como Interferon γ

secretado por células natural killer e linfócitos T (Petreski *et al.*, 2021).

Cerca de 30% a 50% dos pacientes com DRC nos estágios mais avançados apresentam um estado inflamatório elevado, conforme os níveis de proteína C reativa, interleucina (IL) -1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF- α) (Gluba-Brzózka *et al.*, 2020). Segundo De Francisco e colaboradores (2009), a inflamação persistente pode contribuir para a variabilidade nos níveis de Hb, além de contribuir para a hiporresponsividade nos pacientes que fazem tratamento com AEE. Do mesmo modo, o desenvolvimento da anemia renal pode ser influenciado pelo estado inflamatório (Gluba-Brzózka *et al.*, 2020). As citocinas também apresentam o potencial de suprimir a proliferação de células progenitoras eritroides (Yilmaz *et al.*, 2011).

As moléculas inflamatórias provocam efeitos adversos sobre as células do sistema hematológico, tais como deficiência de ferro, redução na produção de EPO, aumento na fagocitose de eritrócitos e aumento da eriptose pelo estresse oxidativo na circulação (Wacka *et al.*, 2023). Através da produção de IL-6, devido a inflamação sistêmica, ocorre a indução para uma produção de hepcidina que regula a homeostase do ferro. Então, a hepcidina tanto reduz a absorção intestinal do ferro quanto a liberação de ferro por macrófagos, porém, a reciclagem de ferro por macrófagos é responsável por cerca de 90% das demandas diárias de ferro para a eritropoiese (Wacka *et al.*, 2023; Weiss; Ganz; Goodnough, 2019). Pacientes com Doença Renal Crônica no estágio V (DRC-V) apresentam aumento na produção de IL-6 devido a hemodiálise e a dialise peritoneal, que estimulam respostas inflamatórias adicionais (Su; Lei; Zhang, 2017).

O soro de pacientes em estágios mais avançados da DRC que também apresentem doenças inflamatórias inibiu a formação de colônias eritroides e resposta a EPO, porém esse processo foi revertido pela adição de anticorpos diretos contra TNF- α e Interferon γ (IFN- γ). O aumento da inflamação também está associado com uma supressão da produção

de EPO que influencia na eritropoiese (Allen *et al.*, 1999; Yilmaz *et al.*, 2011).

O IFN- γ diminui a expressão do receptor de EPO em células progenitoras eritroides, inibe sua diferenciação e reduz o tempo de vida útil dos eritrócitos (Taniguchi *et al.*, 1997; Wacka *et al.*, 2023). Além disso, IL-1 α , TNF- α e IL-1 β inibiram de forma dose-dependente a produção de EPO induzida por hipóxia em um estudo com células Hep3B, em que a citocina IL-1 β foi a que mais demonstrou efeito na inibição (Faquin; Schneider; Goldberg, 1992; Yilmaz *et al.*, 2011).

Segundo Keithi-Reddy e colaboradores (2008), a anemia renal foi associada com valores elevados do TNF- α , além de níveis elevados de IL-6 e IL-8 em pacientes anêmicos comparados com não anêmicos. A deterioração da função renal na uremia pode ser associada a um aumento significativo na atividade do TNF- α (Stenvinkel *et al.*, 2005). Dessa forma, os mediadores TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ parecem estar relacionados à síntese comprometida de EPO em relação ao desenvolvimento da anemia associada à inflamação (Figura 5) (Wacka *et al.*, 2023).

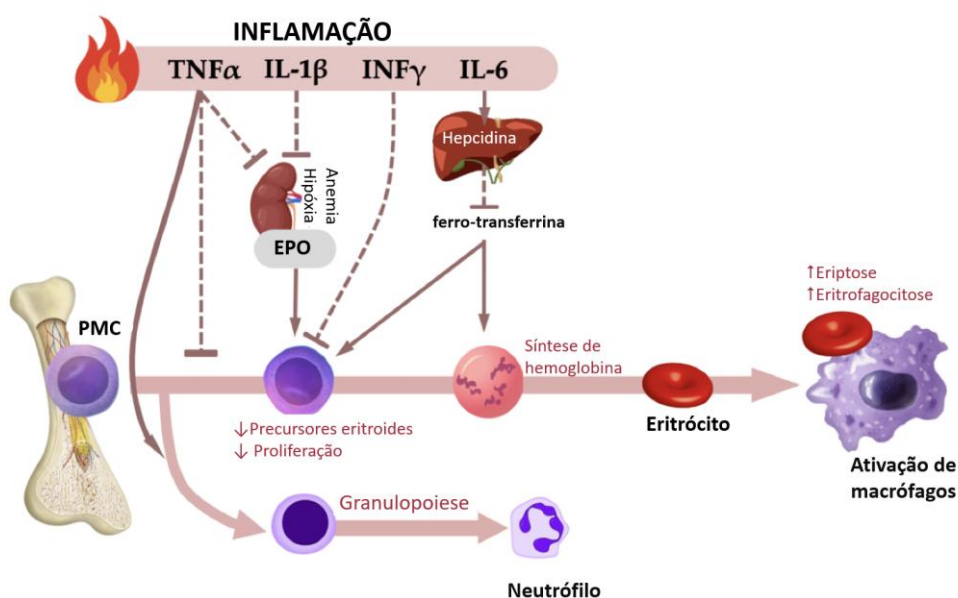


Figura 5: Representação dos mecanismos associados à anemia relacionadas com a inflamação. Em que as abreviações significam: TNF- α , fator de necrose tumoral α ; IL-1 β , interleucina 1 β ; IFN- γ , interferon γ ; IL-6, interleucina 6; EPO, eritropoietina; PMC, progenitor mieloide comum. As linhas tracejadas indicam inibição. As setas para cima indicam aumento e as para baixo uma redução ou diminuição. Fonte: Adaptado de Wacka et al., 2023.

As citocinas inflamatórias também são importantes preditores de mortalidade cardiovascular em pacientes com a DRC (Keithi-Reddy *et al.*, 2008). De acordo com Ridker e colaboradores (2018), foi observada uma redução das taxas de eventos cardiovasculares adversos graves em pacientes com alto risco de aterosclerose e com DRC através da utilização de um inibidor de IL-1 β , chamado de canakinumab.

Pacientes hiporresponsivos a AEE demonstraram uma associação entre o estado inflamatório e o desequilíbrio oxidativo devido o processo de diálise (Khalil *et al.*, 2016). Adicionalmente, pacientes não responsivos ao tratamento com AEE também apresentam níveis elevados de citocinas, como: TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-13 (Macdougall *et al.*, 2004). O estado inflamatório que ocorre no paciente hiporresponsivo influencia na resposta a EPO humana recombinante, levando a uma interrupção do metabolismo do ferro e a liberação de citocinas que por sua vez inibem a eritropoiese (Drueke *et al.*, 2001). Nessa perspectiva, Gluba-Brzózka e colaboradores (2020) consideram que estratégias utilizando anticitocinas e antioxidantes podem ser sugeridas no futuro visando também o tratamento a hiporresponsividade à EPO relacionada à inflamação.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a correlação entre eriptose e inflamação no contexto de anemia renal em pacientes com doença renal crônica estágio V (DRC-V).

4.2 Objetivos específicos

- a) Quantificar a eriptose e citocinas de pacientes com DRC-V, distinguindo entre aqueles submetidos à hemodiálise e à diálise peritoneal.
- b) Correlacionar os níveis de fosfatidilserina e mediadores inflamatórios nos grupos do estudo.
- c) Correlacionar os níveis de hemoglobina e a expressão de fosfatidilserina nos grupos do estudo.
- d) Correlacionar os níveis de hemoglobina e mediadores inflamatórios nos grupos do estudo.

5. METODOLOGIA

5.1 População e desenho do estudo

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob o número 5.587.701 e com o CAAE de número 61295922.1.0000.0020. Os pacientes em tratamento de diálise foram recrutados do Hospital Santa Casa em Curitiba, Paraná. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), amostras biológicas foram coletadas pela própria equipe do hospital, no momento anterior da hemodiálise ou em exames de rotina dos pacientes em diálise peritoneal. As etapas experimentais do trabalho estão representadas na figura 6. O desenho do estudo é transversal.

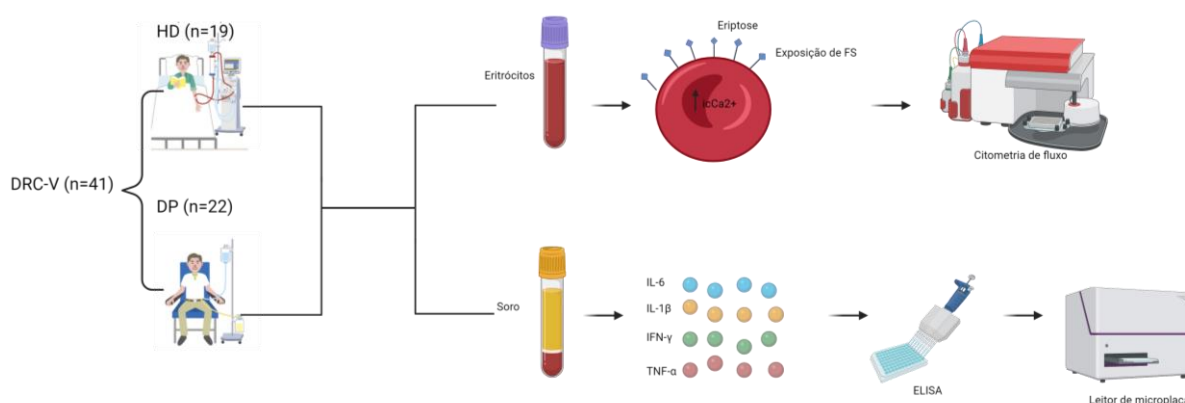


Figura 6: Representação gráfica de como foram realizadas as etapas experimentais do estudo. DRC-V: Doença renal crônica estágio V, grupo com pacientes em hemodiálise e em diálise peritoneal. DP: diálise peritoneal. HD: Hemodiálise. Fonte: Criado pelo Biorender com imagens do *Central Florida Kidney Centers*

Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais, como creatinina, albumina, hematócrito, hemoglobina, PTH, ureia, ferro sérico e ferritina sérica, foram coletados a partir dos prontuários dos pacientes. Todas as amostras foram coletadas no Hospital Santa Casa de Curitiba e transportadas, processadas e armazenadas no Laboratório de Pesquisa em Anemia e Imunologia (LabAIRE), do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) localizado na PUCPR para a realização dos ensaios.

5.2 Critérios de inclusão e exclusão

- a) Critérios de inclusão: Foram incluídos no estudo pacientes maiores de 18 anos em diálise por mais de três meses do Hospital Santa Casa de Curitiba. Os participantes incluídos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).
- b) Critérios de exclusão: Pacientes em tratamento com anti-inflamatórios por qualquer razão no momento da coleta, pacientes com doença autoimune, com câncer, pacientes grávidas ou com infecção ativa foram excluídos do estudo.

5.3 Amostra

O ensaio foi realizado com 19 amostras de pacientes em pré hemodiálise (HD), 22 amostras de pacientes em diálise peritoneal (DP). O sangue foi coletado em tubos de 4 mL contendo EDTA para a realização do isolamento dos eritrócitos e em tubos com gel separador para obtenção do soro e transportadas no mesmo dia da coleta pela equipe do LabAIRE. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm por 15 minutos). Nos tubos de soro foram realizadas a identificação e armazenamento em micro tubos cônicos de 1,5 mL a 80°C para posterior mensuração das citocinas. Nos tubos com EDTA foi realizado o isolamento de eritrócitos para a realização dos ensaios no mesmo dia.

5.4 Quantificação de Fosfatidilserina (FS)

Após o isolamento dos eritrócitos foi realizada a marcação com Anexina-V+-PE (ImmunoTools, Friesoythe, Alemanha), por 15 minutos no escuro, conforme instruções do fabricante, para a quantificação da exposição de FS.

Em seguida, os eritrócitos marcados por Anexina-V+-PE foram ressuspensos em Fixfacs (paraformaldeído 4% em tampão fosfato PBS) e realizado a leitura por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometry).

5.5 Níveis de cálcio intracelular (icCa²⁺)

Os eritrócitos isolados foram marcados com solução Fluo-4/AM+ (Invitrogen, EUA) para a dosagem do icCa²⁺, durante 40 minutos no escuro a 37 °C, conforme instruções do fabricante. Em seguida, os eritrócitos foram ressuspensos em Tris-glicose e a leitura realizada por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometry).

5.6 Dosagem dos mediadores inflamatórios

A quantificação das citocinas IL-6, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α com o soro de pacientes em hemodiálise (HD) e em diálise peritoneal (DP) foi realizada pelo método imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), conforme as instruções do fabricante (ImmunoTools, Friesoythe, Alemanha).

5.7 Análise estatística

Foi realizado a estatística descritiva dos dados demográficos e laboratoriais de todos os grupos. Para a comparação das médias dos dados demográficos e laboratoriais, bem como dos níveis de morte celular e níveis de citocinas entre os pacientes DP e HD, foram utilizados o teste t ou teste Mann-Whitney, conforme o resultado do teste de normalidade. O programa utilizado foi o GraphPad Prism.

Para a associação entre as variáveis % de FS na superfície dos eritrócitos, bem como, concentrações de cada citocina avaliada com os níveis de Hb de cada paciente foi realizada análise de correlação de Spearman. Correlação significativa foi considerada como $p < 0,05$. Em seguida, uma análise de regressão linear simples foi realizada para modelar a relação entre as variáveis, sendo utilizado o programa GraphPad Prism.

Os gráficos de dispersão entre a expressão de FS, concentrações de citocinas e níveis de hemoglobina no grupo DRC-V foram realizados pelo programa STATA.

6. RESULTADOS

6.1 Dados da população

A tabela 1 apresenta os dados demográficos, laboratoriais e clínicos dos grupos: pacientes com DRC no estágio V (DRC-V), com a subdivisão diálise peritoneal (DP) e hemodiálise (HD). A média de idade dos pacientes incluídos no estudo foi de $62,51 \pm 14,1$, com 56% do sexo masculino e com média do IMC de $26,38 \pm 5,6$. Dos parâmetros laboratoriais, observou-se hemoglobina de $11,16 \pm 1,65$ g/dL. A porcentagem dos pacientes DRC-V anêmicos ($Hb \leq 11$ g/dL) foi de 51%, hipertensos de 90% e diabéticos 40%. Foi realizada uma comparação estatística entre o grupo DP e HD, em que foi observado diferença estatística significativa nas médias de ferro sérico ($p=0,0307$).

Parâmetros	DRC-V (n=41)	Pacientes em diálise peritoneal (n=22)	Pacientes em hemodiálise (n=19)	Valor de p
Dados Demográficos				
Idade (anos)	$62,51 \pm 14,18$	$66,14 \pm 10,93$	$58,32 \pm 16,52$	0,078
Idade (Mín e Max)	20 e 84	48 e 82	20 e 84	
Sexo masculino (%)	56	50	63	
IMC (kg/m ²)	$26,38 \pm 5,65$	$25,74 \pm 5,15$	$27,06 \pm 6,21$	0,5359
Dados Laboratoriais				
Creatinina (mg/dL)	$7,21 \pm 2,97$	$7,03 \pm 3,54$	$7,41 \pm 2,21$	0,2931
Albumina (g/dL)	$3,71 \pm 0,41$	$3,62 \pm 0,47$	$3,81 \pm 0,30$	0,1672
Hematócrito (%)	$32,48 \pm 5,43$	$32,70 \pm 4,8$	$32,23 \pm 6,21$	0,7848
Hemoglobina (g/dL)	$11,16 \pm 1,65$	$11,27 \pm 1,56$	$11,04 \pm 1,79$	0,6614
PTH (Mediana (Mín-Max))	268,2 (31-953)	324,2 (63-953)	120 (31-624)	
Ureia (mg/dL)	$110,3 \pm 28,86$	$109,51 \pm 25,24$	$111,2 \pm 33,26$	0,8565
Ferro sérico (µg/dL)	$84,55 \pm 31,41$	$94,29 \pm 32,71$	$73,27 \pm 26,32$	0,0307*
Ferritina sérica (ng/mL)	$278,0 \pm 190,7$	$283,5 \pm 222,5$	$271,6 \pm 151,6$	0,7076
Tempo de diálise (meses) (Mediana (Mín-Max))	21 (3-139)	15,50 (3-139)	28 (4-95)	
Dados Clínicos				
Hipertensão (%)	90	91	90	
Diabetes (%)	49	55	42	
Anemia (%)	51	50	53	

Tabela 1: Características demográficas e laboratoriais dos grupos Doença renal crônica estágio V (DRC-V), diálise peritoneal (DP) e Hemodiálise (HD). Dados expressos como média±desvio padrão. Variáveis categóricas expressas como frequência. Paratormônio (PTH) e índice de massa corporal (IMC). * $p<0,05$. Valor de p representa a comparação entre os grupos de pacientes em DP e HD.

Na tabela 2 estão representados os dados dos biomarcadores celulares avaliados no estudo. A comparação estatística foi realizada nos entre os subgrupos diálise peritoneal (DP) e hemodiálise (HD). Sendo possível observar que a média de intensidade de fluorescência

(MFI) nos eritrócitos com FS na superfície foi maior no grupo HD ($19,57 \pm 5,6$) quando comparado com o grupo DP ($10,90 \pm 4,7$) ($p < 0,0001$). Em relação ao nível de icCa^{2+} a MFI encontrada em pacientes HD foi de $84,44 \pm 6,77$ a qual foi significativamente maior comparado com os pacientes DP em que a média foi de $30,9 \pm 14,05$ ($p < 0,0001$). Em relação a comparação dos níveis de citocinas, o grupo HD apresentou maiores níveis de IL-6 ($31,56 \pm 10,43$), IL-1 β ($21,05 \pm 5,34$), IFN- γ ($18,72 \pm 5,17$), comparando com o grupo em DP ($15,57 \pm 2,39$; $12,47 \pm 6,31$; $8,29 \pm 4,04$, respectivamente) ($p < 0,0001$). Em relação a TNF- α não foi observada diferença significativa entre as médias dos grupos HD ($11,78 \pm 6,40$) e DP ($13,25 \pm 5,17$) ($p < 0,25$).

Marcadores	DRC-V (n=41)	DP (n=22)	HD (n=19)	Valor de p
Fosfatidilserina (%MFI)	$14,92 \pm 6,72$	$10,90 \pm 4,7$	$19,57 \pm 5,6$	$<0,0001^*$
Cálcio intracelular (%MFI)	$55,71 \pm 29,24$	$30,9 \pm 14,05$	$84,44 \pm 6,77$	$<0,0001^*$
IL-6 & (pg/mL)	$22,77 \pm 10,74$	$15,57 \pm 2,39$	$31,56 \pm 10,43$	$<0,0001^*$
IFN- γ (pg/mL)	$13,12 \pm 6,95$	$8,29 \pm 4,04$	$18,72 \pm 5,17$	$<0,0001^*$
IL-1 β (pg/mL)	$16,45 \pm 7,24$	$12,47 \pm 6,31$	$21,05 \pm 5,34$	$<0,0001^*$
TNF- α (pg/mL)	$12,57 \pm 5,75$	$13,25 \pm 5,17$	$11,78 \pm 6,40$	$0,2557$

Tabela 2: Representação dos valores de média $\pm$ desvio padrão dos marcadores utilizados no estudo. Doença renal crônica V (DRC-V), Diálise peritoneal (DP) e Hemodiálise (HD). Valor de p representa a comparação entre os grupos de pacientes em DP e HD. MFI=Média de intensidade de fluorescência. * $p < 0,05$.

6.2 Correlação entre os marcadores de eriptose (FS e icCa^{2+}) nos grupos

A análise de correlação entre os marcadores de eriptose no grupo DRC-V e individualmente entre as modalidades de diálise revelou relação significativa ($p < 0,05$) (Figura 7) indicando que valores elevados de icCa^{2+} estão associados a maiores valores de exposição de FS no grupo DRC-V ($r=0,6929$; $p < 0,0001$) (Figura 7A). Quando a mesma análise foi realizada nos subgrupos, observou-se correlação positiva e significativa no grupo

HD ($r=0,4827$; $p<0,0348$) (Figura 7C), e correlação positiva fraca e não significativa no grupo DP ($r=0,3032$; $p<0,2564$) (Figura 7B).

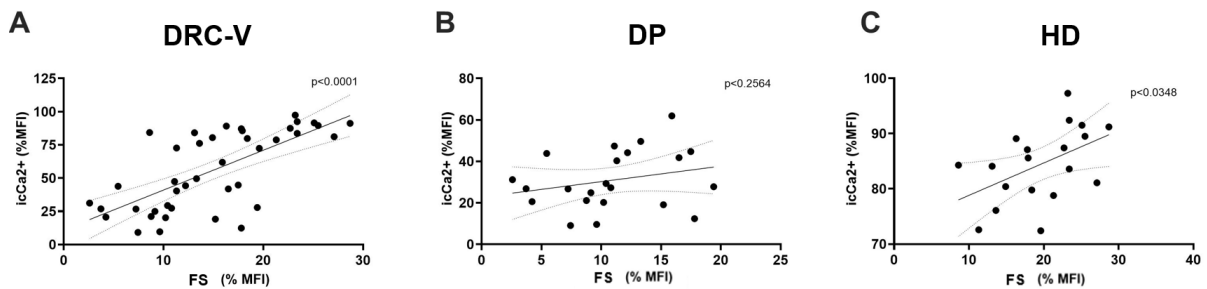


Figura 7: Correlação entre cálcio intracelular (icCa²⁺) e fosfatidilserina (FS) em eritrócitos de pacientes DRC-V. Representados pela % de MFI - Média de intensidade de fluorescência. A: Doença renal crônica estágio V (DRC-V), B: diálise peritoneal (DP) e C: hemodiálise (HD).

6.3 Correlação entre FS e mediadores inflamatórios

A análise de correlação entre a exposição de FS e os níveis de IL-6 demonstrou que menores concentrações de IL-6 foram associadas com menores níveis de exposição de FS no grupo DRC-V ($r=0,4999$; $p<0,0003$) (Figura 8A). Da mesma forma, correlação positiva e significativa foi observada no subgrupo DP ($r=0,3473$; $p<0,039$) (Figura 8B), sem significância no subgrupo HD ($r=0,003$; $p<0,99$) (Figura 8C).

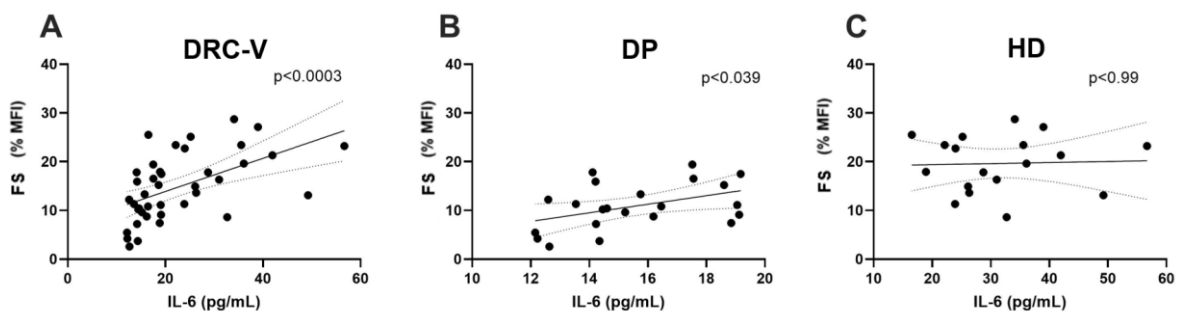


Figura 8: Correlação entre eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (FS) e a citocina IL-6. Representados pela % de Média de intensidade de fluorescência (MFI). A: Doença renal crônica estágio V (DRC-V), B: Grupo em diálise peritoneal (DP) C: Hemodiálise (HD).

Para a citocina IL-1 β a correlação foi positiva somente no grupo DRC-V ($r=0,34$; $p<0,001$), em que valores mais baixos de IL-1 β foram relacionados com menores valores de

exposição de FS (Figura 9A). Na análise dos subgrupos, tanto para DP ($r=0,25$; $p<0,254$) como para HD ($r=0,4326$; $p<0,064$) observou-se correlação positiva moderada, mas sem significância estatística (Figura 9B e C, respectivamente).

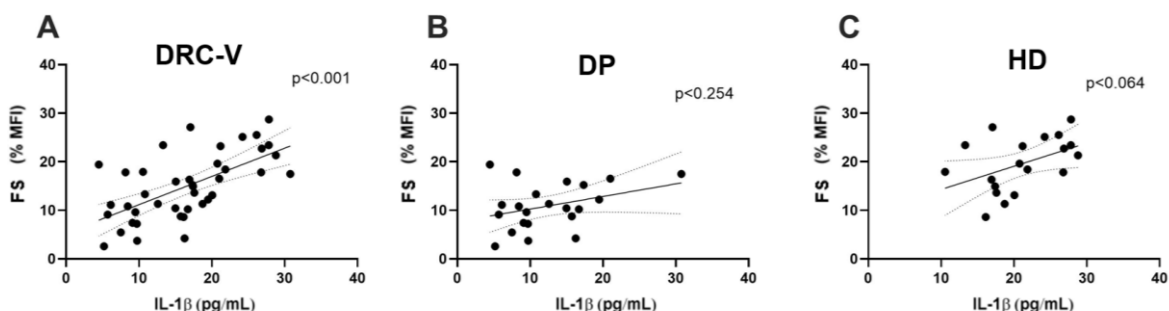


Figura 9: Correlação entre eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (FS) e a citocina IL-1 β . Representados pela % de MFI - Média de intensidade de fluorescência. A: Doença renal crônica estágio V (DRC-V), B: Grupo em diálise peritoneal (DP) e C: Hemodiálise (HD).

Na correlação entre a citocina IFN- γ e a exposição de FS observa-se correlação positiva moderada significativa somente no grupo DRC-V ($r=0,4370$; $p<0,001$), dessa forma menores valores da citocina estão correlacionados com menores valores de exposição de FS (Figura 10A). No grupo DP ($r=0,1282$; $p<0,569$) e no grupo HD ($r=0,3256$; $p=0,173$) as correlações foram positivas fracas e não significativas (Figura 10B e C, respectivamente).

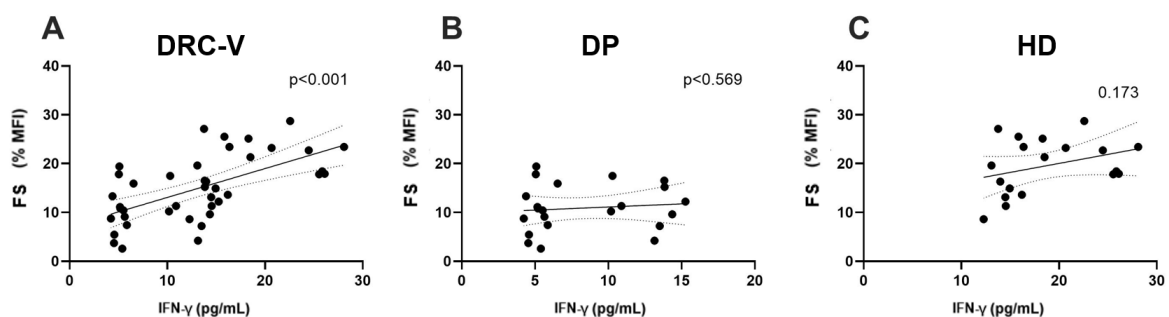


Figura 10: Correlação entre eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (FS) e a citocina IFN- γ . Representados pela % de MFI - Média de intensidade de fluorescência. A: Doença renal crônica estágio V (DRC-V), B: Grupo em diálise peritoneal (DP), C: Hemodiálise (HD).

Não foi observado correlação significativa em nenhum dos três grupos estudados em relação as concentrações de TNF- α . No grupo DRC-V, o coeficiente de correlação foi

$r=0,08190$ com $p<0,61$, indicando uma correlação fraca (Figura 11A). No grupo DP, $r=0,1316$ e $p<0,559$, sugerindo uma correlação positiva fraca. O grupo HD apresentou $r=0,4267$ e $p<0,0685$ com uma correlação positiva moderada, mas sem significância estatística (Figura 11B e C, respectivamente).

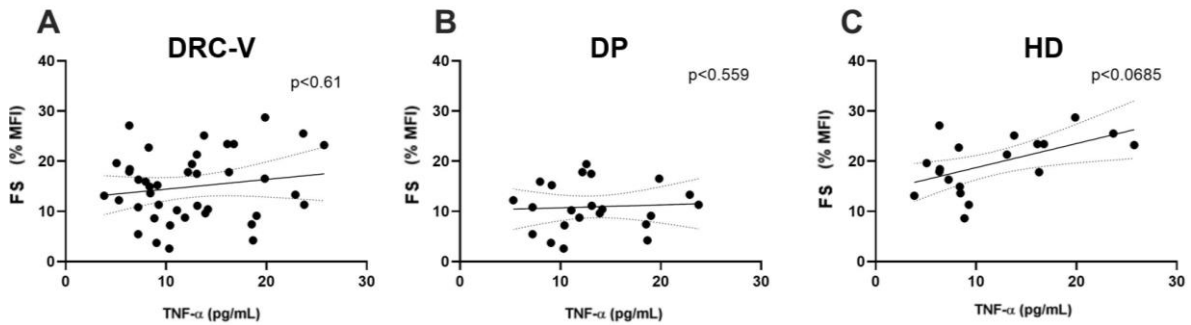


Figura 11: Correlação entre eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (FS) e a citocina TNF- α . Representados pela % de MFI - Média de intensidade de fluorescência. A: Doença renal crônica estágio V (DRC-V), B: Grupo em diálise peritoneal (DP), C: Hemodiálise (HD).

6.4 Correlação entre hemoglobina (Hb) e FS

A correlação entre exposição de FS e níveis de Hb demonstra correlação negativa com significância estatística ($p<0,05$) em que os menores valores de Hb foram associados a maiores valores de exposição de FS no grupo DRC-V ($r=-0,4811$; $p<0,001$) (Figura 12A). Quanto estratificado quanto a modalidade de diálise, o grupo HD também apresentou correlação negativa e significativa ($r=-0,6734$; $p<0,0031$) (Figura 12C), enquanto o grupo DP apresentou correlação negativa fraca e sem significância estatística ($r=-0,366$; $p<0,192$) (Figura 12B).

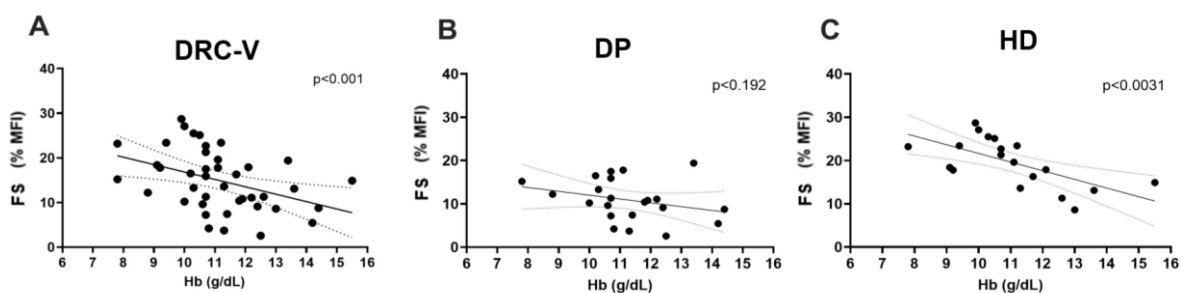


Figura 12: Correlação entre eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (FS) e os valores de Hemoglobina (Hb). Representados pela % de MFI - Média de intensidade de fluorescência. A: Doença renal crônica estágio V(DRC-V), B: Grupo em diálise peritoneal (DP), C: Hemodiálise (HD).

6.5 Correlação entre Hb e mediadores inflamatórios

Na correlação entre a concentração da IL-6 e os níveis de Hb não foram encontrados valores significativos. Os grupos DRC-V ($r=-0,2843$; $p<0,578$) e HD ($r=-0,2519$; $p<0,313$) apresentaram correlações negativas fracas, já o grupo DP ($r=0,035$; $p<0,874$) não apresentou correlação (Figura 13A-C).

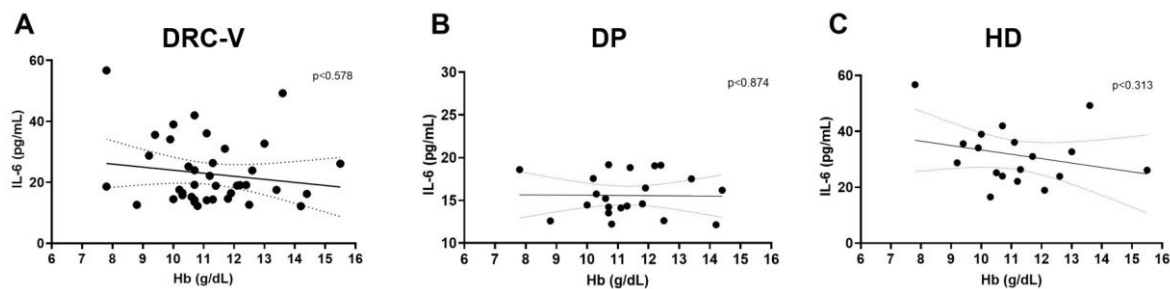


Figura 13: Correlação entre a citocina IL-6 e os valores de hemoglobina (Hb). A: Doença renal crônica estágio V (DRC-V), B: Grupo em diálise peritoneal (DP), C: Hemodiálise (HD).

Na correlação de IFN- γ e Hb nos grupos estudados foi possível observar associação inversa em que à medida que os valores de Hb aumentam, os níveis de IFN- γ tendem a diminuir no grupo DRC-V ($r=-0,4737$; $p<0,0001$). Nos subgrupos, observou-se correlação negativa moderada em DP ($r=-0,7$; $p<0,0001$) e correlação negativa forte e HD ($r=-0,5608$; $p<0,0125$) (Figura 14A-C).

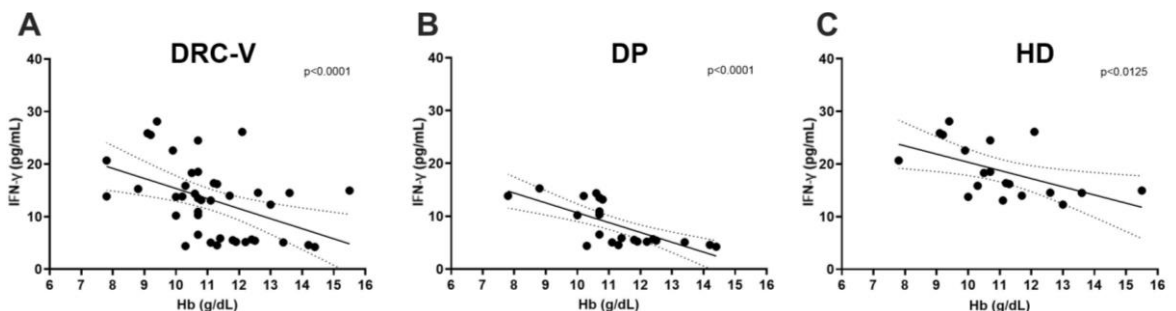


Figura 14: Correlação entre a citocina IFN- γ e os valores de hemoglobina (Hb). A: Doença renal crônica estágio V(DRC-V), B:Grupo em diálise peritoneal (DP), C: Hemodiálise (HD).

Na associação de IL-1 β e Hb foi possível observar correlação negativa moderada significativa em todos os grupos estudados (Figura 15 A-C), conforme menores os níveis de

Hb, maiores foram os níveis de IL-1 β no grupo DRC-V ($r=-0,6055$; $p<0,0001$), DP ($r=-0,6971$; $p<0,0003$) e HD ($r=-0,6082$; $p<0,0057$).

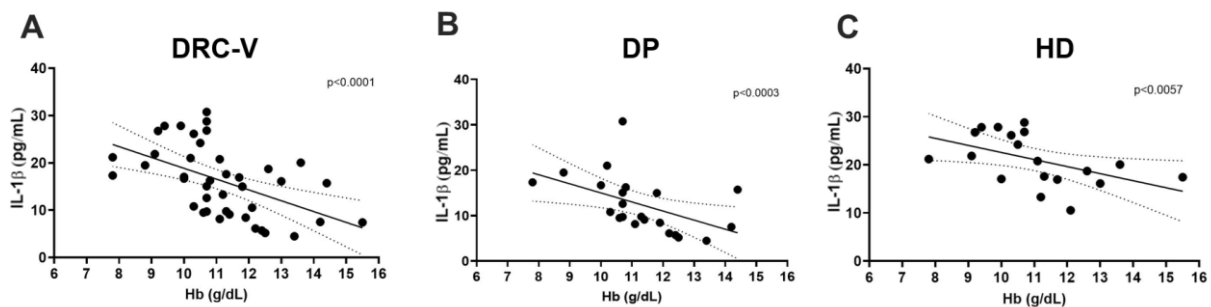


Figura 15: Correlação entre a citocina IL-1 β e os valores de hemoglobina (Hb). A: Doença renal crônica estágio V (DRC-V), B: Grupo em diálise peritoneal (DP), C: Hemodiálise (HD).

Em relação ao TNF- α , menores valores de Hb apresentam correlação negativa moderada significativa com maiores concentrações de TNF- α no grupo HD ($r=-0,5022$; $p<0,028$) (Figura 16 C), entretanto nos grupos DRC-V ($r=-0,288$; $p<0,067$) e DP ($r=-0,069$; $p<0,758$) as correlações entre as variáveis foram negativas fracas e não apresentaram significância estatística (Figura 16 A e B, respectivamente).

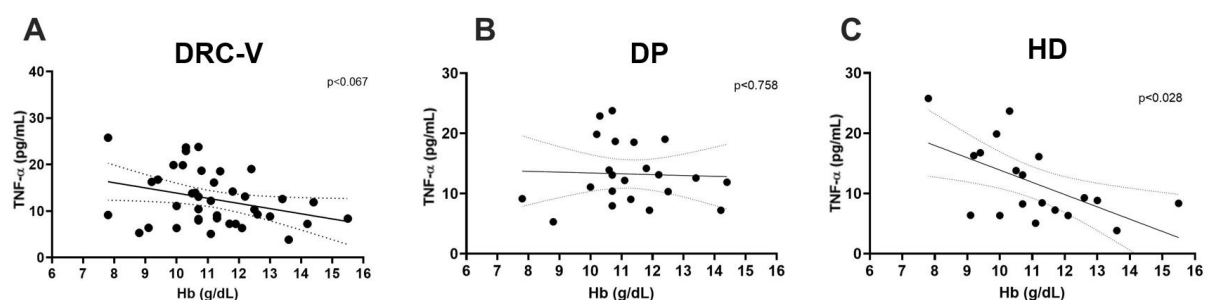


Figura 16: Correlação entre a citocina TNF- α e os valores de hemoglobina (Hb). A: Doença renal crônica estágio V (DRC-V), B: Grupo em diálise peritoneal (DP), C: Hemodiálise (HD).

6.6 Dispersão entre hemoglobina, citocinas e fosfatidilserina

Foi conduzido um gráfico de dispersão para avaliar os níveis de Hb, com as concentrações das citocinas e a exposição da FS para o grupo DRC-V. Sendo definido os níveis mais baixos de Hb de 8 até 11 g/dL e altos acima de 11g/dL, os níveis de citocinas estão representados por níveis de elevados (pontos pretos), medianos (pontos azuis) e

baixos (pontos vermelhos) e os valores de FS por % de MFI (Figura 17).

Em relação aos níveis de IL-6 observou-se que pontos com maiores concentrações da citocina em sua maioria se encontram com os menores valores de Hb e maiores de FS exposta (Figura 17A). O mesmo foi observado em relação aos níveis de Hb, a IFN- γ e % de exposição de FS onde observou-se que os pontos com maiores concentrações da citocina (pontos pretos) em sua maioria se encontram nos valores de Hb ≤ 11 g/dL e maiores % de FS exposta (Figura 17B). Na IL-1 β que os pontos que apresentam maiores concentrações da citocina estão concentrados majoritariamente em valores de Hb ≤ 11 g/dL e em sua maioria com aumento de morte celular (% exposição de FS) (Figura 17C), o mesmo observado para a relação entre os níveis mais baixos de Hb (8 a 11 g/dL) e concentração maior que TNF- α com alta % de exposição de FS (Figura 17D).

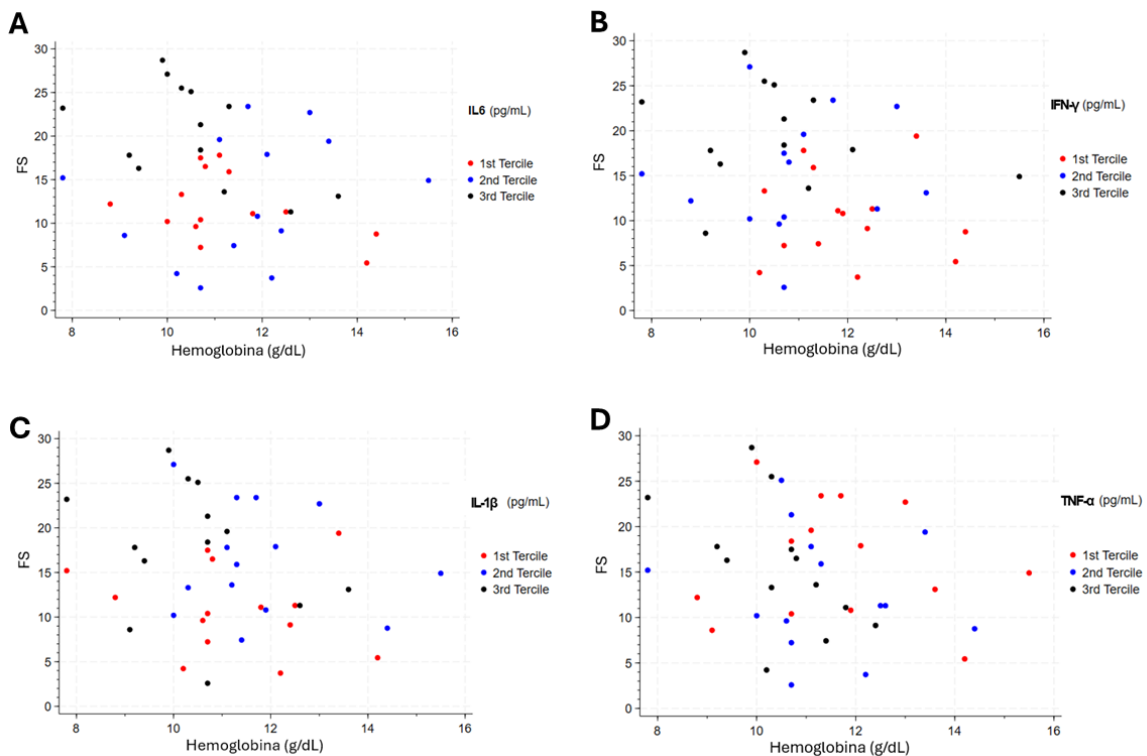


Figura 17: Gráfico de Dispersão entre os níveis de A: IL-6, B: IFN- γ ; C: IL-1 β e D: TNF- α com a % da exposição de fosfatidilserina (FS) e níveis de hemoglobina (Hb). Representados como alta concentração das citocinas pontos pretos (3rd Tertile = Third tertile); mediana em pontos azuis (2nd Tertile= Second tertile) e baixa em pontos vermelhos (1st Tertile=First Tertile).

7. DISCUSSÃO

Em resumo, os resultados indicam que pacientes em HD apresentam níveis aumentados de FS, icCa^{2+} , e citocinas inflamatórias (com exceção da $\text{TNF-}\alpha$) comparados a pacientes em DP. Como esperado a correlação entre FS e icCa^{2+} foi significativa na DRC-V, e níveis elevados de FS associaram-se a menores concentrações de Hb no grupo DRC-V e HD. Além disso, altas concentrações das citocinas inflamatórias $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{IL-1}\beta$ mostraram forte correlação com menores níveis de Hb, independentemente do tratamento de diálise. Nesse mesmo contexto, a alta taxa da exposição de FS mostrou-se fortemente correlacionada a altas concentrações de $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{IL-1}\beta$ em pacientes DRC-V.

De acordo com a literatura, a exposição de FS foi observada como sendo maior em pacientes submetidos à HD e DP em comparação com indivíduos saudáveis. No entanto, na análise comparativa entre os grupos, foi relatado que pacientes em DP apresentaram eritrócitos com maior exposição de FS em relação aos eritrócitos obtidos de pacientes em HD (Bissinger *et al.*, 2016), o que contrasta com os resultados do presente estudo. Essa discrepância pode ser atribuída a diferenças nas características clínicas e sociodemográficas dos pacientes incluídos em cada estudo. Além disso, outro estudo destacou que a exposição a FS foi mais elevada em pacientes em DP quando comparados a indivíduos saudáveis, e que comorbidades como hipertensão e doenças cardiovasculares não tiveram uma influência significativa sobre os níveis de FS (Virzì *et al.*, 2019).

A correlação positiva entre a exposição da FS e níveis de Ca^{2+} intracelular em que maiores % de exposição de FS foram associados a maiores níveis de icCa^{2+} era esperada, uma vez que a eriptose é caracterizada pelo aumento da exposição de FS induzida pelo aumento do influxo de Ca^{2+} em eritrócitos (Lang; Qadri; Lang, 2012; Lang et al., 2007; Lang; Lang; Foller, 2012). Do ponto de vista fisiológico, a eriptose é um mecanismo de proteção muito semelhante à apoptose de células nucleadas, para remover eritrócitos

defeituosos. É um processo importante, pois permite uma forma de morte celular do eritrócito diferente da hemólise, que resulta na ruptura das membranas com liberação de conteúdo danificado do RBC e consequente inflamação. Com a exposição de FS, o eritrócito é reconhecido por monócitos circulantes com receptores específicos de fosfatidilserina, que engolfam e removem o eritrócito da circulação (Bonan *et al.*, 2016). Contudo, quando ocorre um aumento da eriptose com uma diminuição da reposição destas células na circulação, um quadro de anemia pode ser estabelecido como o que acontece na DRC.

Os achados confirmam o estado inflamado dos pacientes com DRC-V, em que maiores concentrações dos mediadores inflamatórios estavam significativamente aumentadas em pacientes HD comparados com pacientes em DP. Poucos estudos avaliam as concentrações séricas de marcadores inflamatórios na população estudada, sendo as vezes controversas. Enquanto um estudo sugere uma predominância de estado inflamatório Th1 sob condições urêmicas (Sester *et al.*, 2000), outro estudo indica uma prevalência de Th2 (Libetta *et al.*, 2001). Parece, no entanto, que durante o intervalo interdialítico, a produção de citocinas dos monócitos se mantém normal, embora essas células liberem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias sob estimulação urêmica (Coppo *et al.*, 2000). Entre os mediadores inflamatórios, a IL-6 tem sido a citocina mais estudada nas populações com DRC e diálise (Stenvinkel *et al.*, 2002). Níveis elevados de IL-6 são comumente observados em pacientes com DRC (Pecoits-Filho *et al.*, 2003) e tanto a hemodiálise como a diálise peritoneal por si só estimulam ainda mais as respostas inflamatórias e aumentam a produção de IL-6 (Takahashi *et al.*, 2000, Caglar *et al.*, 2002). Além disso, IL-6 prevê melhor mortalidade cardiovascular e por todas as causas do que a PCR e outras citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-18 (Honda *et al.*, 2006, Tripepi *et al.*, 2005).

Entretanto, acredita-se que a inflamação crônica e a resposta de fase aguda interagem em vários níveis para prejudicar a eritropoiese, acelerar a destruição de eritrócitos,

contribuindo para a anemia renal (Chawla; Krisnan, 2009). As citocinas, incluindo IL-1, IL-6, IFN- γ e TNF- α , suprimem e afetam as células precursoras em diferentes estágios da eritropoiese (Allen *et al.*, 1999). O presente estudo aponta correlação entre a exposição de FS e as citocinas (IL-6, IL-1 β , IFN- γ), principalmente na população DRC-V, podendo portanto, potencializar a redução na vida útil dos eritrócitos. Também foi observado uma correlação significativa entre a eriptose e os níveis de Hb, indicando que quanto maior a exposição de FS, menores são os valores de Hb. Sabe-se que existe uma correlação positiva significativa entre eriptose e IL-6, bem como entre eriptose e mieloperoxidase em eritrócitos de indivíduos saudáveis expostos a plasma de pacientes com sepse (Marcello *et al.*, 2023).

De acordo com Khalil e colaboradores (2016), verificou-se uma correlação negativa entre Hb e IL-6, em que menores níveis de Hb apresentaram maiores valores de IL-6, indicando uma possível correlação entre os marcadores inflamatórios e a anemia. Entretanto os resultados apresentados não apontam correlação significativa entre IL-6 e Hb em nenhum dos grupos estudados. As diferenças entre os presentes achados e o estudo anterior, que contou com uma amostra de 80 participantes, podem divergir devido a um menor número de participante no presente estudo e perfil dos pacientes que participaram. Porém, é sabido que pacientes com anemia renal apresentaram valores elevados de TNF- α e níveis significativamente mais baixos de Hb. Além de maiores concentrações de IL-6 e IL-8 em pacientes anêmicos comparados com não anêmicos (Keithi-Reddy *et al.*, 2008). Em concordância com o achado, o presente estudo revelou correlação significativa entre os níveis baixos de Hb com valores elevados de TNF- α no grupo de pacientes DRC-V e na subdivisão de pacientes HD.

A baixa concentração de Hb foi associada à inflamação crônica caracterizada pelos níveis elevados de TNF- α e IL-1 β , com os menores níveis de Hb. Já a IL-6 não apresentou diferença estatística entre o grupo anêmico e não anêmico (Wacka *et al.*, 2023). Os

resultados corroboram com os dados obtidos no presente estudo, nos quais foram encontrados uma correlação significativa entre níveis de Hb e TNF- α no grupo DRC-V e HD, além da significância encontrada entre níveis de Hb e IL-1 β , sem diferença estatística entre a Hb e a IL-6. É necessário ressaltar que Wacka e colaboradores (2023) estudaram a inflamação relacionada com a idade e não exclusivamente no grupo de pacientes doentes renais crônicos.

De acordo com um estudo realizado por Virzì e colaboradores (2022), citocinas e toxinas urêmicas apresentam um efeito prejudicial nos eritrócitos ao induzir a eriptose. A eriptose foi observada significativamente maior em eritrócitos em contato com concentrações mais elevadas das citocinas (IL-6 e IL-1 β) comparadas com as concentrações mais baixas das mesmas citocinas. O estudo revela que eritrócitos incubados com os mediadores inflamatórios (IL-6 e IL-1 β) ou toxinas urêmicas (p-cresol e ureia) apresentaram uma aumento significativo de eriptose em todos os tempos comparado com células não tratadas. Além disso, foi observado uma correlação positiva entre IL-1 β e a eriptose, o que corrobora com o resultados encontrados no presente estudo. Os resultados revelam que maior concentração da IL-1 β estão associados com maiores % de FS e menores valores de Hb.

Com a influência da inflamação na progressão da DRC, estudos com anticitocinas têm sido buscados para a diminuição da inflamação nesta população, até mesmo para o tratamento em relação a hiporesponsividade a EPO relacionada à inflamação (Gluba-Brzózka *et al.*, 2020). Alguns resultados de coortes revelam efeitos positivos na redução de eventos cardiovasculares adversos graves em pacientes com alto risco de aterosclerose com a utilização de canakinumab, um inibidor de IL-1 β (Ridker *et al.*, 2018). O antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1ra), conhecido como Anakinra, também demonstrou controlar a resposta inflamatória em pacientes em HD pela diminuição dos níveis de IL-6 e da proteína C reativa após 4 semanas de utilização (Hung *et al.*, 2011). Além disso, observou-se uma

menor taxa de efeitos adversos, como infecções e citopenias, com a utilização do Anankinra comparando com o placebo. Os resultados também sugerem que o Anankinra apresentou um impacto positivo na redução dos níveis de IL-6 (Dember *et al.*, 2022).

O ziltivekimab, um anticorpo monoclonal direcionado contra a IL-6, foi eficaz na redução de biomarcadores inflamatórios e trombóticos relacionados com a aterosclerose (Ridker *et al.*, 2021). Em outro estudo, o ziltivekimab também apresentou uma significativa melhora nos marcadores de inflamação, diminuiu a necessidade do uso de agentes estimuladores da eritropoiese (AEE) e aumentou os níveis de albumina sérica em pacientes em hemodiálise (HD) com inflamação e hiporresponsividade aos AEE (Pergola *et al.*, 2021). Essas evidências sugerem que tanto o Anankinra quanto o ziltivekimab podem desempenhar um papel importante na gestão da inflamação em pacientes com DRC e em diálise, potencialmente melhorando os desfechos clínicos e reduzindo a necessidade de intervenções adicionais.

Os achados do presente estudo, juntamente com novos dados sobre o uso de anticitocinas na DRC, destacam a necessidade de estratégias terapêuticas personalizadas para melhorar o manejo da inflamação e da anemia renal, com consequente benefício aos pacientes com DRC-V.

8. CONCLUSÃO

As principais conclusões dos resultados são:

- 1) Níveis aumentados de fosfatidilserina (FS) e cálcio intracelular (icCa^{2+}) foram observados mais altos em pacientes em hemodiálise (HD) em comparação aos pacientes em diálise peritoneal (DP).
- 2) Correlação estatística foi observada entre a exposição de FS e os níveis de icCa^{2+} na DRC-V.
- 3) O aumento da expressão de FS correlacionou-se com níveis mais baixos de hemoglobina (Hb) no grupo DRC-V e HD.
- 4) Concentrações elevadas de $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ e Hb correlacionam-se fortemente em todos os grupos de pacientes estudados.
- 5) Altas taxas da exposição de FS correlacionam-se com altas concentrações das citocinas $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ em pacientes DRC-V.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As limitações do estudo incluem o número reduzido de participantes, o que pode ter impactado nas correlações na subdivisão de acordo com a modalidade de diálise. Além disso, as técnicas diferentes das diálises possuem processos diferentes que podem impactar diretamente nos resultados de inflamação na análise dos subgrupos. Ainda, os pacientes em hemodiálise (HD) e diálise peritoneal (DP) podem estar recebendo tratamentos adicionais ou diferentes, que podem influenciar tanto a exposição de FS como na produção dos mediadores inflamatórios.

Algumas sugestões visam conectar as descobertas do presente estudo a potenciais

aplicações clínicas que podem melhorar o gerenciamento e os resultados para pacientes com doença renal crônica em estágio V (DRC-V) submetidos a diferentes tratamentos de diálise. Em que os níveis de FS e icCa^{2+} podem ser biomarcadores clínicos para avaliar o estresse celular na DRC, particularmente em pacientes de HD. Além de alvos terapêuticos em que estratégias destinadas a modular os níveis de citocina, especialmente IFN- γ e IL-1 β em pacientes de HD, podem ser exploradas para mitigar a inflamação e suas complicações associadas na DRC.

Referências bibliográficas

- AHMED, E. et al. Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. 2013a.
- AHMED, M. S. E. et al. The Uremic Toxin Acrolein Promotes Suicidal Erythrocyte Death. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 37, n. 2–3, p. 158–167, 2013b.
- ALLEN et al. Inhibition of CFU-E colony formation in uremic patients with inflammatory disease: role of IFN-gamma and TNF-alpha. **J Investig Med** ., p. 204–11, maio 1999.
- ARIAS, C. F.; ARIAS, C. F. How do red blood cells know when to die? **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 4, 1 abr. 2017.
- BABITT, J. L.; LIN, H. Y. Mechanisms of Anemia in CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, n. 10, p. 1631–1634, 1 out. 2012.
- BELLO, A. K. et al. **Complications of chronic kidney disease: current state, knowledge gaps, and strategy for action. Kidney International Supplements**Elsevier B.V., , 1 out. 2017.
- BESTER, J.; PRETORIUS, E. Effects of IL-1 β , IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity OPEN. 2016.
- BIKBOV et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global. 2020.
- BISSINGER, R. et al. Reduced Erythrocyte Survival in Uremic Patients Under Hemodialysis or Peritoneal Dialysis. **Kidney & blood pressure research**, v. 41, n. 6, p. 966–977, 1 dez. 2016.
- BONAN, N. B. et al. Uremic Toxicity-Induced Eryptosis and Monocyte Modulation: The Erythrophagocytosis as a Novel Pathway to Renal Anemia. **Blood Purification**, v. 41, n. 4, p. 317–323, 1 abr. 2016.
- BONOMINI, M. et al. Involvement of phosphatidylserine exposure in the recognition and phagocytosis of uremic erythrocytes. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 37, n. 4, p. 807–814, 1 abr. 2001.
- BOULET, C.; DOERIG, C. D.; CARVALHO, T. G. **Manipulating Eryptosis of Human Red Blood Cells: A Novel Antimalarial Strategy? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**Frontiers Media S.A., , 30 nov. 2018.
- CAGLAR, K. et al. Inflammatory signals associated with hemodialysis. **Kidney International**, v. 62, p. 1408–1416, 2002.
- CAMPOS, I. et al. Intradialytic Hypoxemia in Chronic Hemodialysis Patients. **Blood Purif**, v. 41, p. 177–187, 2016.
- CHAWLA, L. S.; KRISHNAN, M. Causes and consequences of inflammation on anemia management in haemodialysis patients. **Hemodialysis International**, v. 13, p. 222–234, 2009.
- COPPO, R.; AMORE, A. Importance of the bradykinin-nitric oxide synthase system in the hypersensitivity reactions of chronic haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 15, p. 1288–1290, 2000.
- DE FRANCISCO, A. L. M.; STENVINKEL, P.; VAULONT, S. Inflammation and its impact on

anaemia in chronic kidney disease: from haemoglobin variability to hyporesponsiveness. **NDT Plus**, v. 2, n. Supplement 1, p. i18–i26, 1 jan. 2009.

DEMBER, L. M. et al. A randomized controlled pilot trial of anakinra for hemodialysis inflammation. **Kidney International**, v. 102, p. 1178–1187, 2022.

DIAS, G. F. et al. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, stimulates reactive oxygen species production and erythrocyte cell death supposedly by an organic anion transporter 2 (OAT2) and NADPH oxidase activity-dependent pathways. **Toxins**, v. 10, n. 7, 5 jul. 2018.

DIAS, G. F. et al. The Role of Eryptosis in the Pathogenesis of Renal Anemia: Insights From Basic Research and Mathematical Modeling. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 1276, 9 dez. 2020.

DIAS, G. F. et al. Uremia and inadequate oxygen supply induce eryptosis and intracellular hypoxia in red blood cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 55, n. 4, p. 449–459, 2021.

DRÜEKE, T. Hyporesponsiveness to recombinant human erythropoietin. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 16 Suppl 7, n. SUPPL. 7, p. 25–28, 2001.

DZIERZAK, E.; PHILIPSEN, S. Erythropoiesis: Development and Differentiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, abr. 2013.

ESPI, M. et al. **Chronic kidney disease-associated immune dysfunctions: Impact of protein-bound uremic retention solutes on immune cells**. **Toxins**MDPI AG, , 1 maio 2020.

EVANS, M. et al. Contemporary management of anaemia, erythropoietin resistance and cardiovascular risk in patients with advanced chronic kidney disease: a nationwide analysis. **Clinical Kidney Journal**, v. 13, n. 5, p. 821, 2020.

FAQUIN, W.; SCHNEIDER, T.; GOLDBERG, M. Effect of Inflammatory Cytokines on Hypoxia-Induced Erythropoietin Production. **Blood**, v. 79, n. 8, p. 1987–1994, 15 abr. 1992.

FÖLLER, M. et al. Vanadate-induced suicidal erythrocyte death. **Kidney & blood pressure research**, v. 31, n. 2, p. 87–93, abr. 2008.

GERMOLEC, D. R. et al. Markers of Inflammation. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1803, p. 57–79, 2018.

GILBERTSON, D. T.; LI, S.; PENG, Y. et al. Anemia prevalence and treatment rates in stage 3-5 non-dialysis-dependent chronic kidney disease patients. **Chronic Diseases Research Group**, v. 1, 2016.

GLUBA-BRZÓZKA, A. et al. The Influence of Inflammation on Anemia in CKD Patients. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, 1 fev. 2020.

HAMZA, E.; METZINGER, L.; METZINGER-LE MEUTH, V. **Uremic Toxins Affect Erythropoiesis during the Course of Chronic Kidney Disease: A Review**. **Cells**NLM (Medline), , 6 set. 2020.

HIGGINS, J. M. **Red Blood Cell Population Dynamics**. **Clinics in Laboratory Medicine**W.B. Saunders, , 1 mar. 2015.

HILL, N. R. et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-

Analysis. **PloS one**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2016.

HONDA, H. et al. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 47, p. 139–148, 2006.

HUNG, A. M. et al. IL-1 β Receptor Antagonist Reduces Inflammation in Hemodialysis Patients. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 22, n. 3, p. 437, mar. 2011.

JULY ; KOURY, |; HAASE, M. J. Anaemia in kidney disease: harnessing hypoxia responses for therapy. **Nat. Rev. Nephrol**, v. 11, p. 394–410, 2015.

KDIGO. **Official Journal Of the internatiOnal SOciety Of nephroLOgy KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease.**

KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease. American Journal of Kidney DiseasesW.B. Saunders, , 2006.

KEITHI-REDDY, S. R. et al. Association of anemia and erythropoiesis stimulating agents with inflammatory biomarkers in chronic kidney disease. **Kidney international**, v. 74, n. 6, p. 782–790, set. 2008.

KHALIL, S. K. M. et al. Oxidative stress during erythropoietin hyporesponsiveness anemia at end stage renal disease: Molecular and biochemical studies. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 3, p. 348, 1 maio 2016.

LANG, E.; LANG, F. **Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death.** *Seminars in Cell and Developmental Biology*Academic Press, , 1 mar. 2015.

LANG, E.; QADRI, S. M.; LANG, F. Killing me softly – Suicidal erythrocyte death. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 8, p. 1236–1243, 1 ago. 2012.

LANG, F. et al. Plasma membrane ion channels in suicidal cell death. 2007.

LANG, F. et al. **Ceramide in Suicidal Death of Erythrocytes***Cell Physiol Biochem*. 2010.

LANG, F. et al. Eryptosis - the Neglected Cause of Anemia in End Stage Renal Disease. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 42, n. 4, p. 749–760, 1 dez. 2017.

LANG, F.; LANG, E.; FLLER, M. Physiology and Pathophysiology of Eryptosis. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 39, n. 5, p. 308, out. 2012.

LIBETTA, C.; RAMPINO, T.; DAL CANTON, A. Polarization of T-helper lymphocytes toward the Th2 phenotype in uremic patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 38, p. 286–295, 2001.

LU, P. H. et al. The Therapeutic Strategies for Uremic Toxins Control in Chronic Kidney Disease. **Toxins**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2021.

MACDOUGALL, I. C. Could anti-inflammatory cytokine therapy improve poor treatment outcomes in dialysis patients? **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 19 Suppl 5, n. SUPPL. 5, ago. 2004.

- MACDOUGALL, I. C. Chronic renal failure Anaemia of chronic kidney disease. 2007.
- MALYSZKO, J.; MYSLIWIEC, M. **Hepcidin in anemia and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney and Blood Pressure Research***, fev. 2007.
- MARCELLO, M. et al. The Cytotoxic Effect of Septic Plasma on Healthy RBCs: Is Eryptosis a New Mechanism for Sepsis? ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 24, n. 18, 1 set. 2023.
- MCCLELLAN, W. et al. The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. ***Current Medical Research and Opinion***, v. 20, n. 9, p. 1501–1510, set. 2004.
- MINETTI, G. et al. Red Blood Cells: Chasing Interactions. 2019.
- NICOLAY, J. et al. Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by Methylglyoxal. ***Cellular Physiology and Biochemistry***, v. 18, n. 4–5, p. 223–232, 2006.
- PALAKA, Eirini; GRANDY, Susan; VAN HAALEN, Heleen; McEWAN, Phil; DARLINGTON, Oliver. The impact of CKD anaemia on patients: incidence, risk factors, and clinical outcomes—A systematic literature review. ***International Journal of Nephrology***, v. 2020, p. 7692376, 21 p., 2020.
- PECOITS-FILHO, R. et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. ***American Journal of Kidney Diseases***, v. 41, p. 1212–1218, 2003.
- PETRESKI, T. et al. Review on Inflammation Markers in Chronic Kidney Disease. 2021.
- PORTOLÉS, J. et al. **Anemia in Chronic Kidney Disease: From Pathophysiology and Current Treatments, to Future Agents. *Frontiers in Medicine***Frontiers Media S.A., , 26 mar. 2021.
- REPSOLD, L.; JOUBERT, A. M. Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. ***BioMed Research International***, v. 2018, 2018.
- RIDKER, P. M. et al. Inhibition of Interleukin-1 β by Canakinumab and Cardiovascular Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease. ***Journal of the American College of Cardiology***, v. 71, n. 21, p. 2405–2414, 29 maio 2018.
- RIDKER, P. M. et al. IL-6 inhibition with ziltivekimab in patients at high atherosclerotic risk (RESCUE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. ***The Lancet***, v. 397, n. 10289, p. 2060–2069, 29 maio 2021.
- RUBIN, H. R. et al. Patient Ratings of Dialysis Care With Peritoneal Dialysis vs Hemodialysis. ***JAMA***, v. 291, n. 6, p. 697–703, 11 fev. 2004.
- SESTER, U.; SESTER, M.; HAUKE, M.; KAUL, H.; KOHLER, H.; GIRDNT, M. T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients. ***Nephrology Dialysis Transplantation***, v. 15, p. 1217–1223, 2000.
- SONIA, S. N. et al. An Overview of Safety and Efficacy Between Hypoxia-Inducible Factor-Prolyl-Hydroxylase Inhibitors and Erythropoietin-Stimulating Agents in Treating Anemia in Chronic Kidney Disease Patients. ***Cureus***, 18 jul. 2023.
- STENVINKEL, P. et al. **IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia-The good, the bad, and the ugly***Kidney International*. 2005

- STENVINKEL, P.; BARANY, P.; HEIMBURGER, O.; PECOITS-FILHO, R.; LINDHOLM, B. Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: what is the role of interleukin-6? *Sv.* 62, p. 103–108, 2002
- SU, H.; LEI, C. T.; ZHANG, C. Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: An update. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. APR, 21 abr. 2017.
- SWINKELS, D. W.; WETZELS, J. F. M. Hepcidin: a new tool in the management of anaemia in patients with chronic kidney disease? **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 23, n. 8, p. 2450–2453, ago. 2008.
- TAKAHASHI, T. et al. Interleukin-6 gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Renal Failure*, v. 22, p. 345–354, 2000
- TANIGUCHI, S. et al. Interferon γ Downregulates Stem Cell Factor and Erythropoietin Receptors But Not Insulin-Like Growth Factor-I Receptors in Human Erythroid Colony-Forming Cells. *Blood*, v. 90, n. 6, p. 2244–2252, 15 set. 1997.
- TOZONI, S. et al. Uremia and Hypoxia Independently Induce Eryptosis and Erythrocyte Redox Imbalance. Article in **Cellular Physiology and Biochemistry**, 2019.
- TRIPEPI, G.; MALLAMACI, F.; ZOCCALI, C. Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 16, p. S83–S88, 2005.
- VANHOLDER, R. et al. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney International*, v. 63, n. 5, p. 1934–1943, 1 maio 2003.
- VERMA, S. et al. Implications of oxidative stress in chronic kidney disease: a review on current concepts and therapies. *Kidney research and clinical practice*, v. 40, n. 2, p. 183–193, 2021.
- VIRZÌ, G. M. et al. Eryptosis Is Altered in Peritoneal Dialysis Patients. *Blood purification*, v. 48, n. 4, p. 351–357, 1 dez. 2019.
- VIRZÌ, G. M. et al. In Vitro Induction of Eryptosis by Uremic Toxins and Inflammation Mediators in Healthy Red Blood Cells. *Journal of Clinical Medicine*, v. 11, n. 18, 1 set. 2022.
- WACKA, E. et al. The Role of Inflammation in Age-Associated Changes in Red Blood System. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 10, 1 maio 2023.
- WEBSTER, A. C. et al. Chronic Kidney Disease. *The Lancet*, v. 389, n. 10075, p. 1238–1252, 25 mar. 2017.
- WEISS, G.; GANZ, T.; GOODNOUGH, L. T. Anemia of inflammation. *Blood*, v. 133, n. 1, p. 40–50, 3 jan. 2019.
- XIE, Y. et al. Analysis of the Global Burden of Disease study highlights the global, regional, and national trends of chronic kidney disease epidemiology from 1990 to 2016. *Kidney International*, v. 94, n. 3, p. 567–581, 1 set. 2018.
- YILMAZ, M. I. et al. Renal Anemia of Inflammation: The Name Is Self-Explanatory. *Blood Purification*, v. 32, n. 3, p. 220–225, 1 out. 2011.