

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

**ATIVIDADE DA DELTA AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE SANGÜÍNEA E O ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES HEMODIALISADOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliana Valentini

Santa Maria, RS, Brasil

**ATIVIDADE DA DELTA AMINOLEVULINATO DESIDRATASE SANGÜÍNEA E O
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES HEMODIALISADOS**

por

Juliana Valentini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador (a): Profa. Dra. Solange Cristina Garcia

Santa Maria, RS, Brasil

2007

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

ATIVIDADE DA DELTA AMINOLEVULINATO DESIDRATASE SANGÜÍNEA E O
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES HEMODIALISADOS

elaborada por
Juliana Valentini
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Solange Cristina Garcia, Dra.
(Presidente/Orientador)

Fernando Barbosa Júnior, Dr. (USP)

Maria Rosa Chitolina Schetingger, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 09 de março de 2007.

Dedicatória

Aos meus queridos e amados pais

Dentro de mim há um lugar
onde meus sonhos mais ternos residem
onde minhas esperanças mais caras permanecem vivas
onde meus sentimentos mais profundos são sentidos
e onde minhas lembranças favoritas são acalantadas com aconchego
No meu coração apenas as coisas mais especiais em meu mundo
conseguem penetrar e lá permanecem para sempre
E sempre que entro em contato com as esperanças,
sentimentos e lembranças em meu coração,
percebo a profundidade
Com que minha vida foi tocada por **vocês.**

Agradecimento especial

A Prof. Dr (a) Solange Cristina Garcia, que admiro pela determinação, humildade, honestidade e dedicação a pesquisa. Agradeço pela oportunidade para realizar este trabalho. A ela, meu reconhecimento e gratidão.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida e saúde.

Aos meus amigos do LATOX: Ângela, Silvana, Marieli, Clóvis, Rachel, Patrícia, Fernanda, Raquel, André, Miguel, Denise, Juliana, os quais são como uma família para mim, pois juntos enfrentamos as dificuldades, e juntos realizamos este trabalho. Sem vocês não seria possível.

As meninas que trabalharam diretamente comigo, Natália e Sílvia, obrigada pela parceria mesmo sem espectro.

As minhas amigas Denise Grotto e Juliana Vicentini pelo apoio profissional e emocional.

Aos meus amigos Juliana Motta, Viviane, André, Lenice, pela amizade, conselhos, disposição em ouvir e momentos de “relax”. Obrigada.

Aos amigos do LATOX, que já seguiram os seus caminhos, Gabriela, Juniara, Lucas, Cristiane, Marcos, Karen, Carmem, Caren e Eduardo.

A professora Tatiana Emanuelli, pelos conhecimentos a mim passados, e pela disponibilidade de ensinar, sempre com bom humor e entusiasmo.

Ao professor Leandro Machado de Carvalho pela disponibilidade em ajudar, e mesmo os resultados com ele obtidos não estarem aqui servirão para trabalhos futuros.

Aos professores Fernando Barbosa Júnior, Maria Rosa Schetingger e Vera Maria Morsch por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Aos professores da pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Bioquímica Toxicológica que de alguma maneira contribuíram para a construção do meu conhecimento científico.

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar este curso.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Atividade da Delta Aminolevulinato desidratase sangüínea e o estresse oxidativo em pacientes hemodialisados

Autora: Juliana Valentini

Orientadora: Solange Cristina Garcia

Data e Local de defesa: Santa Maria, 09 de março de 2007.

A ácido delta aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) é uma enzima tiólica, envolvida na biossíntese de compostos tetrapirrólicos, como o heme. Essa enzima é inibida por vários metais, sendo inclusive sua inibição um indicador de intoxicação por chumbo (Pb). Adicionalmente, muitos estudos sugerem sua inibição como um marcador do estresse oxidativo, devido a alta afinidade dos grupos –SH da enzima aos agentes pró-oxidantes. Pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) sob tratamento de hemodiálise têm o estresse oxidativo amplificado, bem como níveis de alumínio aumentados. Os objetivos deste estudo foram avaliar em pacientes com IRC sob tratamento de hemodiálise e indivíduos saudáveis, os efeitos dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma, um marcador do estresse oxidativo comumente utilizado, e níveis de alumínio (Al) sobre a atividade da δ -ALA-D sangüínea. Também foi verificado o envolvimento dos grupos –SH na atividade da enzima, através da incubação *in vitro* com dithiothreitol (DTT), um agente redutor. Os resultados encontrados foram, atividade da δ -ALA-D diminuída, os níveis de TBARS e Al aumentados ($p < 0,05$) em pacientes hemodialisados comparados ao grupo de indivíduos saudáveis. A atividade da enzima após incubação com DTT foi significativamente aumentada nos hemodialisados, mas não atingiu os níveis encontrados nos indivíduos saudáveis. Além disso, a atividade da enzima correlacionou-se negativamente com os níveis de TBARS e Al, no entanto, a correlação parcial mostrou influência somente do TBARS na atividade da enzima.

Conclui-se que em pacientes hemodialisados a atividade da δ -ALA-D é significativamente diminuída, que seus grupos –SH estão inibidos, provavelmente devido ao estresse oxidativo. No entanto, a inibição dos grupos –SH não é provavelmente a única causa de diminuição da atividade enzimática, já que o DTT não reverteu sua atividade a níveis normais.

Palavras-chave: δ -aminolevulinato desidratase; TBARS; alumínio; hemodialisados; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post Graduate Course on Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

Human erythrocyte delta-aminolevulinatase activity and oxidative stress in hemodialysis patients

Author: Juliana Valentini

Adviser: Solange Cristina Garcia

Date and Place of the defense: Santa Maria, march, 09, 2007.

The acid aminolevulinatase (δ -ALA-D) is a thiol enzyme involved in tetrapirrólicos composite biosynthesis, as heme. This enzyme is inhibited by some metals, having been also its inhibition a pointer of poisoning for lead (Pb). Additionally, many studies suggest its inhibition as a marker of it oxidative stress, due the high affinity of groups - SH of the enzyme to the pró-oxidantes agents. Patients with chronic renal insufficiency (IRC) under treatment of hemodialysis have oxidative stress amplified, as well as increased aluminum levels. The objectives of this study had been to evaluate in patients IRC under treatment of hemodialysis (HD) and healthy individuals, the effect of the levels of reactive species to the acid tiobarbitúrico (TBARS) in the plasma, a marker of comumente estresse it oxidativo used, and aluminum levels (Al) on the activity of blood δ -ALA-D. Also the involvement of groups - SH in the activity of the enzyme was evaluated, through the incubation *in vitro* with dithiothreitol (DTT), a reducing agent. The joined results had been, activity of diminished δ -ALA-D, the increased of TBARS levels and Al ($p < 0.05$) in hemodialisados patients compared with the group of healthy individuals. The activity of the enzyme after incubation with DTT significantly was increased in the hemodialisados ones, but it did not reach the levels found in the healthy individuals. Moreover, the activity of the enzyme was correlated negative with the TBARS levels and Al, however, the partial correlation only showed influence of the TBARS in the activity of the enzyme. It is concluded that in HD patients the activity of δ -ALA-D

significantly is diminished, that its groups - SH are inhibited, provalmente had to oxidative stress. However the inhibition of the groups - SH is not the only cause of reduction of the enzymatic activity, since the DTT did not revert its activity the normal levels.

Keywords: δ -aminolevulinato dehydratase; TBARS; aluminum; hemodialisados; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Condensação Assimétrica de duas moléculas do ácido aminolevulínico (ALA) catalisada pela ALA-D | 20 |
| FIGURA 2 – Formação das espécies reativas do oxigênio, a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons. | 23 |
| FIGURA 3 – Sistema enzimático antioxidante | 25 |
| FIGURA 4 – Mecanismo de ação do complexo glutaciona..... | 26 |
| FIGURA 5 – Oxidação de ácidos graxos poliinsaturados..... | 29 |

LISTA DE TABELA

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Valores de Alumínio propostos para a população não exposta..... | 33 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

δ -ALA-D – Ácido delta aminolevulinato desidratase

ALA – Ácido Aminolevulínico

Al – Alumínio

CAT – Catalase

DTT – Dithiothreitol

ERNs – Espécies reativas do nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

GPx – Glutaciona peroxidase

GSH – Glutaciona reduzida

GR – Glutaciona redutase

GSSG – Glutaciona dissulfeto

GST – Glutaciona S-transferase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IRC – Insuficiência renal crônica

MDA – Malondialdeído

MPO – Mieloperoxidase

NO – Óxido nítrico

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídio

O₂[•] – Radical superóxido

OH[•] – Radical hidroxil

ONOO[•] – Peróxido nitrito

ONOOH – Peróxido nitroso

Pb – Chumbo

SH – Grupos sulfidrílicos

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| DEDICATÓRIA..... | 3 |
| AGRADECIMENTO ESPECIAL..... | 4 |
| AGRADECIMENTOS..... | 5 |
| RESUMO..... | 6 |
| ABSTRACT | 8 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 10 |
| LISTA DE TABELA..... | 11 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 12 |
| SUMÁRIO..... | 13 |
| APRESENTAÇÃO | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 2.1 Enzima δ – ALA-D | 18 |
| 2.1.1 Histórico e função..... | 18 |
| 2.1.2 Características Estruturais | 19 |
| 2.1.3 Importância Toxicológica e no Estresse Oxidativo da δ – ALA-D..... | 20 |
| 2.2 Estresse oxidativo | 21 |
| 2.2.1 Agentes oxidantes..... | 21 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2 Antioxidantes | 23 |
| 2.3 Biomarcadores do estresse oxidativo..... | 26 |
| 2.4 Estresse oxidativo e hemodiálise..... | 29 |
| 2.5 Insuficiência renal crônica..... | 29 |
| 2.6 Hemodiálise..... | 30 |
| 2.7 Alumínio, Hemodiálise e Estresse Oxidativo..... | 31 |
| 3 RESULTADOS | 33 |
| 3.1 Manuscrito | 34 |
| 4 DISCUSSÃO | 50 |
| 5 CONCLUSÕES | 53 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item RESULTADOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados ao manuscrito deste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são relacionadas às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

A enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos, os quais têm importância, principalmente como grupos prostéticos de proteínas. É uma enzima sulfidrílica, ou seja, possui grupos $-SH$ essenciais para a sua atividade (Bevan et al., 1980). A maioria das isoformas desta enzima isoladas até o momento requer zinco (Zn^{2+}) para sua atividade catalítica.

A atividade da ALA-D é considerada um indicador da exposição por metais, especialmente o chumbo (Pb). Além disso, a δ -ALA-D vem sendo preconizada como um marcador do estresse oxidativo. Essa enzima é inibida em situações oxidativas, como intoxicação por chumbo, mercúrio, alumínio, cádmio, exposição às espécies orgânicas de selênio, diabetes e insuficiência renal crônica (IRC). Além disso, sua inibição amplifica o estresse oxidativo, já que há um acúmulo de ácido aminolevulínico (ALA), o qual pode sofrer autooxidação e induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), provocando danos oxidativos no DNA, peroxidação lipídica e depleção do sistema de defesa antioxidante celular (Gurer e Ercal, 2000).

O estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, é um fator potencialmente importante na mortalidade e mediador de muitas complicações nos pacientes com IRC, principalmente nos que já estão sob tratamento dialítico.

O alumínio é um metal onipresente, e torna-se um agravante para pacientes hemodialisados, pois além desses terem um sistema de eliminação renal insuficiente, soma-se o fato de que a água de hemodiálise e soluções parenterais usadas tem esse metal como contaminante. Também o Al pode ser vinculado através dos medicamentos usados nos vários distúrbios apresentados por esses pacientes, já que a maioria contém Al em sua formulação, ou o Al torna-se contaminante desses medicamentos pelo processo de lixiviação.

Existem poucos relatos na literatura em relação à atividade da enzima delta aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) em pacientes com IRC sob tratamento de hemodiálise, e sua relação com os níveis de alumínio e de substâncias reativas ao

ácido tiobarbitúrico (TBARS) em sangue. Além disso, não há trabalhos que relacionem o envolvimento dos grupos tióis (-SH) na atividade da δ -ALA-D de hemodialisados. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade da δ -ALA-D sangüínea em pacientes hemodialisados comparando-os com indivíduos saudáveis. Além da atividade basal, também foi determinada a atividade após incubação do sangue com dithiothreitol (DTT), onde se verificou o possível envolvimento dos grupos -SH na atividade da enzima encontrada. Adicionalmente, foi verificada a possível correlação entre a atividade da δ -ALA-D e os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e alumínio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzima ALA-D

2.1.1 Histórico e função

Isolada nos anos 50 (Gibson et al., 1955), a metaloproteína citoplasmática δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D, E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidrolase é a enzima que catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (ácido 5-aminolevulínico, ALA), com perda de 2 moléculas de água, para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG), mostrada na figura 1 (Jaffe, 2004). Esta reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes), sendo esta via biossintética semelhante em bactérias, vegetais e animais (Rodrigues, 1989). Nos mamíferos, os tecidos que apresentam maior atividade desta enzima são o hepático, o renal e os tecidos hematopoiéticos (Gibson et al., 1955).

Os compostos tetrapirrólicos têm importância metabólica baseada, principalmente, na sua função como grupos prostéticos de proteínas. O heme (ferroprotoporfirina), por exemplo, faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina, respectivamente); do transporte de elétrons (citocromos a, b e c); da biotransformação de xenobióticos (citocromo P450) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (Timbrell, 1991).

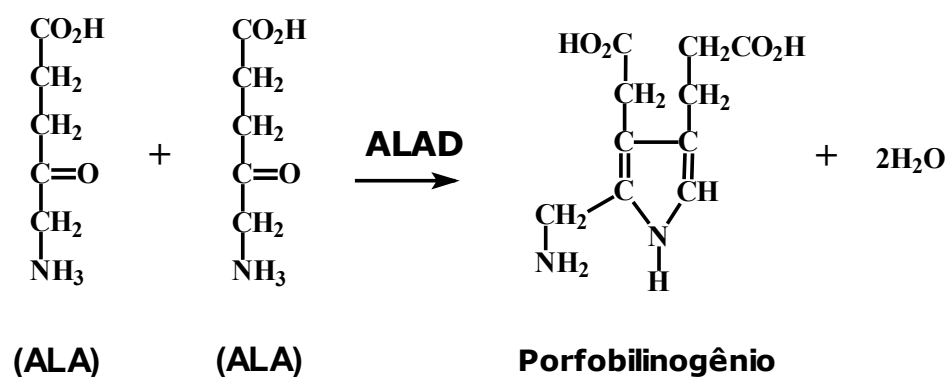


Figura 1: Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima δ -aminolevulinato desidratase, formando o porfobilinogênio (PBG).

2.1.2 Características estruturais

A δ -ALA-D, independente da sua fonte, é uma enzima sulfidrídica (Bevan et al., 1980), sendo, portanto, inibida por agentes bloqueadores de grupos sulfidrídicos, tais como N-etilmaleimida, iodoacetato (Jordan et al., 1976; Barnard et al., 1977), para-cloromercúriobenzoato, monoiodoacetamida e DTNB (Barreiro, 1967; Barnard et al., 1977; Tamai et al., 1979) e por metais pesados que possuam elevada afinidade por grupamentos sulfidrídicos, como o chumbo, o cádmio e o mercúrio (Gibson et al., 1955; Rocha et al., 1995; Emanuelli et al., 1996), e possivelmente o alumínio (Zaman et al, 20 e 21 do artigo), pois ainda há controvérsias quanto a ação do Al sob essa enzima (Vieira et al., 2000).

A maioria das enzimas δ -ALA-D isoladas até o momento requer um íon metálico bivalente para estarem ativas, mas, dependendo de sua fonte, requerem metais diferentes para sua ativação. A δ -ALA-D, de animais, leveduras e bactérias, é dependente de zinco (Chen e Neilands, 1973; Finelli et al., 1974), sendo também demonstrado que resíduos de cisteína da proteína estão envolvidos na união deste metal (Dent et al., 1990; Spencer e Jordan, 1994). Por outro lado, a enzima proveniente de vegetais, apesar de possuir uma similaridade de 35-50 % com a de outras fontes, não requer zinco, mas sim magnésio (Shibata e Ochiai, 1977; Tamai et al., 1979). A região rica em cisteína presente na enzima de origem animal, e que

corresponde à região que supostamente se liga ao zinco, é substituída na enzima de vegetais por uma região rica em aspartato, que caracterizaria o sítio para a união do magnésio (Boese et al., 1991; Schaumburg et al., 1991).

A enzima δ -ALA-D de mamíferos é inibida por quelantes como EDTA e 1,10-fenantrolina (Chen e Neilands, 1976; Sommer e Beyersmann, 1984), sendo esta inibição revertida pela adição de zinco (Bevan et al., 1980). Isto mostra que o zinco faz parte da estrutura da enzima e, possivelmente, tenha um papel fundamental no seu mecanismo catalítico. Entretanto, o papel do zinco na atividade da δ -ALA-D não está, ainda, completamente elucidado. Algumas evidências sugerem uma função catalítica direta, enquanto outras apontam para uma função estrutural do zinco na enzima, ou ambas (Tsukamoto et al., 1979; Dent et al., 1990; Spencer e Jordan, 1995). Após a remoção do zinco pelo EDTA, os grupos $-SH$ da enzima são facilmente oxidados, com concomitante perda da atividade enzimática. A apoenzima oxidada obtida então, apenas incorporará zinco novamente na presença de um ativador sulfidrílico (Tsukamoto et al., 1979; Bevan et al., 1980).

2.1.3 Importância toxicológica e no estresse oxidativo da δ -ALA-D

Devido a sua natureza sulfidrílica, a enzima δ -ALA-D pode ser inibida por uma variedade de metais pesados, bem como por espécies oxidantes que tenham afinidade pelos grupos $-SH$ da mesma. Trabalhos recentes, com animais de laboratório, sugerem a determinação da atividade da δ -ALA-D como um marcador do estresse oxidativo (Folmer et al., 2002; Soares et al., 2002; Maciel et al., 2000).

Patologias humanas, tais como câncer (Gonçalves et al., 2005); diabetes (Fernandez-Cuartero et al., 1999) e insuficiência renal crônica (Fontanellas et al., 2002; Guolo et al., 1996) relataram uma diminuição da atividade da δ -ALA-D, ao mesmo tempo em que ocorre dano oxidativo.

A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em conseqüências patológicas, tais como anemia (Sassa et al., 1989; Goering, 1993). Além da redução na síntese do heme, a inibição desta enzima pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA pode estar relacionado com a

superprodução de espécies reativas de oxigênio (Pereira et al., 1992; Bechara et al., 1993).

2.2 Estresse oxidativo

O oxigênio possui dupla face, é provedor da vida, e ao mesmo tempo pode levar a degeneração e morte celular, o que resulta no aparecimento de substâncias reativas que estão envolvidas na fisiopatologia de várias doenças.

Como essas espécies reativas são, em sua maioria derivadas do metabolismo do oxigênio, e podem ser radicalares ou não, logo o termo geral usado para se referir a elas são espécies reativas do oxigênio (EROs). Estas têm uma meia vida biológica muito curta e grande capacidade reativa. Em condições normais, têm importância como sinalizadores moleculares e são geradas pela ativação de macrófagos e leucócitos, desempenhando papel essencial na defesa do organismo contra microorganismos invasores e na manutenção da integridade das células. Por outro lado, quando há desequilíbrio, através de uma excessiva geração de oxidantes e/ou a insuficiência dos mecanismos de defesa antioxidantes, as EROs reagem com constituintes biológicos que estão próximos, como átomos isolados (hidrogênio ou íons metálicos), ou, ainda com moléculas (açúcares, proteínas, lipídeos, DNA), o que resulta em processos de relevância biológica, criando uma condição denominada estresse oxidativo (Halliwell, 1987).

2.2.1 Agentes oxidantes

A cadeia respiratória mitocondrial representa a mais importante fonte de oxidantes no organismo como parte da fosforilação oxidativa. O sistema de enzimas NADPH-oxidase, encontrado na membrana das células reduz o oxigênio molecular O_2 , em compostos intermediários altamente reativos, destacando-se o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}).

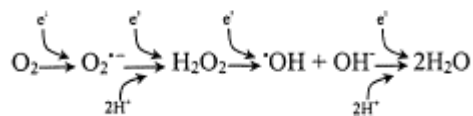


Figura 2 - Formação das espécies reativas de oxigênio, a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons.

Conforme visto na Figura 2, o ânion radical superóxido é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até água, sendo formado a partir dele as demais EROs, como o radical hidroxila, um dos mais potentes oxidantes, com capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas de lipídios e DNA.

As EROs podem ainda ser formados pelas reações enzimáticas da ciclooxigenase, lipooxigenase, aldeído oxidase, além da autooxidação das catecolaminas, flavinas e ferridoxinas e pelas reações catalisadas pelos metais de transição como o ferro e o cobre.

Na presença de cloro, a mieloperoxidase (MPO) oriunda dos neutrófilos, converte H_2O_2 em ácido hipocloroso (HOCl^\cdot), um poderoso composto capaz de oxidar muitas moléculas como lipídios, e outros constituintes intracelulares, particularmente, proteínas de membranas do grupo dos tióis.

Além das espécies reativas oriundas do metabolismo do oxigênio, existem aquelas formadas a partir do metabolismo do nitrogênio, e por isso denominadas espécies reativas do nitrogênio (ERNs). O óxido nítrico (NO^\cdot) é um radical livre com potente efeito vasodilatador. Sua síntese é iniciada a partir do substrato L-arginina, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). NO reage rapidamente com o oxigênio tanto na fase gasosa como em solução aquosa, formando o gás dióxido de nitrogênio. A forma induzível da enzima (i NOS) é ativada via elevação do cálcio intracelular, pela estimulação da acetilcolina, bradicinina. Essa forma induzível da enzima é também sintetizada quando há um estímulo específico, em geral, um processo inflamatório. As substâncias reativas com o oxigênio inativam o óxido nítrico (NO), pelos superóxidos, promovendo sua deficiência funcional e formação de produtos citotóxicos como peróxido nitrito (ONOO^-) e ácido peróxido nitroso (ONOOH).

2.2.2 Antioxidantes

Frente à ação potencial lesiva destas substâncias reativas, torna-se vital um delicado controle de sua produção e consumo dentro das células, ou seja, um fino balanceamento de sua concentração intra e extra celular. Isso é possível graças à atividade dos antioxidantes que, removendo as substâncias reativas, as mantêm em baixas concentrações (Reilly et al, 1991).

O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, varredura das ROS, seqüestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres, aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo. Ainda conforme a ação sobre os radicais livres, o antioxidante pode ser denominado de “*scavenger*”, quando ele age transformando um radical livre em outro menos reativo, ou “*quencher*”, quando consegue neutralizar completamente o radical livre através da absorção de toda a energia de excitação (Belló, 2002). Para uma melhor distinção entre os vários tipos de antioxidantes esses são classificados conforme a sua estrutura em *enzimáticos* e *não-enzimáticos*.

Sistema Enzimático

O sistema enzimático é a primeira linha de defesa antioxidante, evitando o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. É formado por diversas enzimas, destacando-se a glutathiona peroxidase (GPx); catalase (CAT); e superóxido dismutase (SOD) (Belló, 2002).

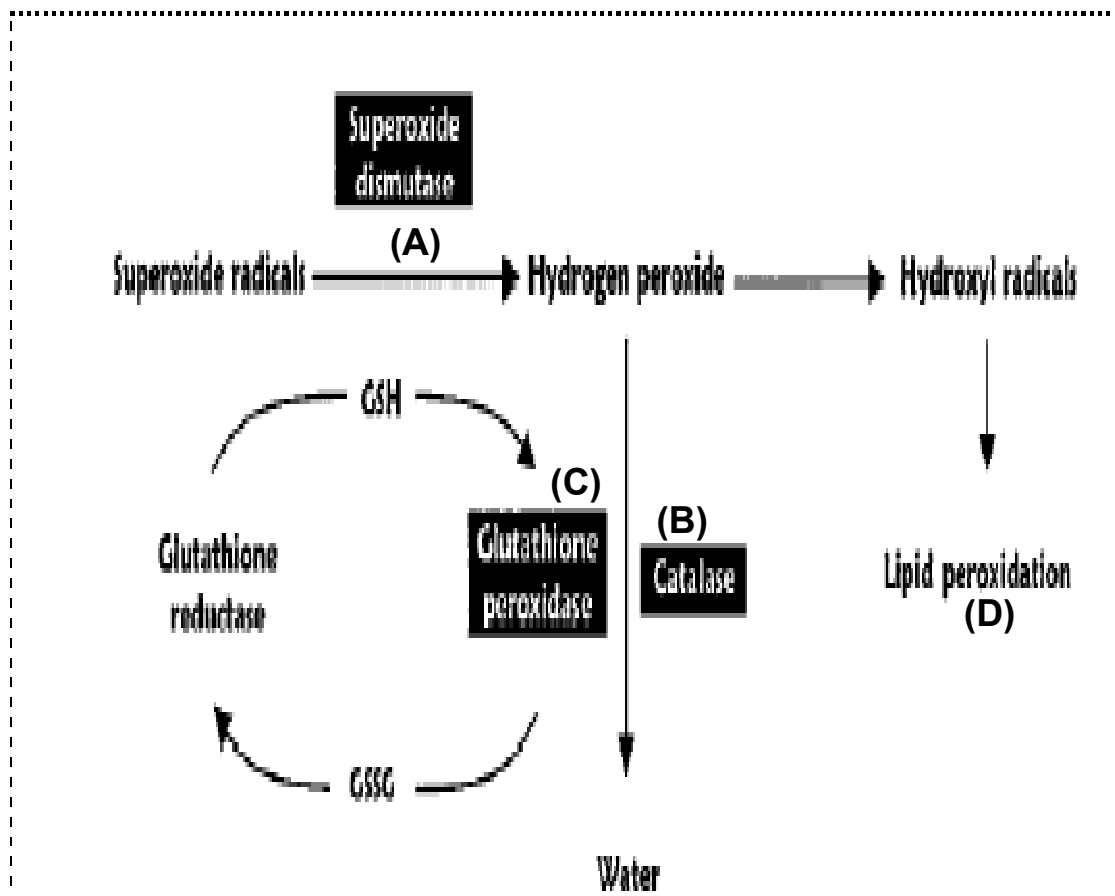


Figura 3: Sistema antioxidante enzimático.

A SOD age transformando dois ânions radicais superóxido em peróxido de hidrogênio (Fig. 3; A), a qual é uma reação normal em pH fisiológico, porém muito acelerada na presença dessa enzima. Pode ocorrer de três formas, dependendo do metal associado à mesma: cobre (Cu) e zinco (Zn) no citoplasma dos eucariontes, manganês (Mn) na matriz mitocondrial e ferro (Fe) em bactérias.

Outro antioxidante enzimático é a catalase, a qual possui a capacidade de transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Fig. 3; B). Sua localização está nos peroxissomas, tendo por isto ação diminuída em órgãos como o coração, pulmão e o cérebro, possuem pouco peroxissomas. Nestes órgãos a ação antioxidante por esta enzima ocorre quando os radicais livres atingem a corrente sanguínea, através da catalase eritrocitária.

O H_2O_2 também pode ser detoxificado pela glutathiona peroxidase (GPx) (Fig. 3; C), localizada no citoplasma e na matriz mitocondrial. Sua ação ocorre por meio da redução do H_2O_2 e de hidropeptídeos orgânicos através da utilização da glutathiona reduzida (GSH), um tripeptídeo composto de ácido α -glutâmico, cisteína e glicina. Assim a GSH atua como um co-substrato, de maneira que doa dois hidrogênios dos seus grupamentos sulfidrilas para os peróxidos, transformando-os em álcool e água. A glutathiona oxidada ou dissulfeto (GSSG) formada é regenerada para GSH através da glutathiona redutase (GR) com transferência de elétron do NADPH (Fig. 4). A GPx ocorre em sua maioria associada ao selênio (Se), e seus principais locais de ação são fígado e eritrócitos, podendo ocorrer também no coração, pulmões e músculos.

Desta forma, o sistema antioxidante enzimático diminui a formação de radicais hidroxila e, conseqüentemente a lipoperoxidação (Fig. 3; D).

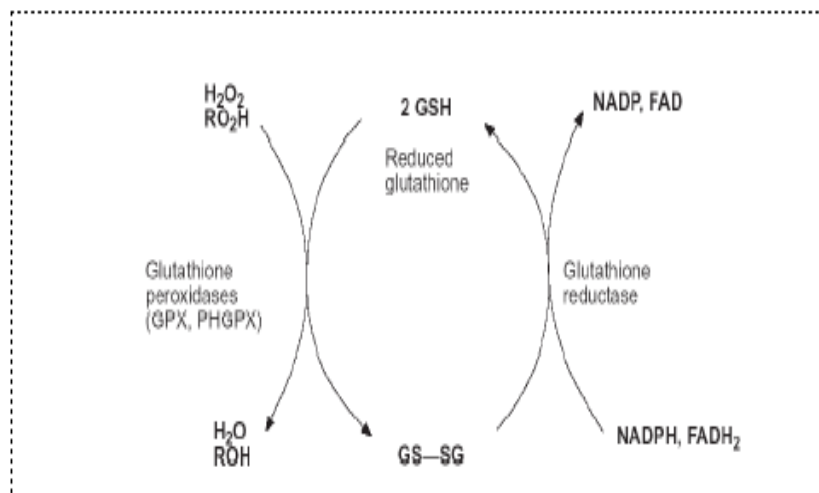


Figura 4: Mecanismo de ação do sistema glutathiona.

Ainda existem as enzimas chamadas glutathiona S-transferases, as quais agem detoxificando agentes alquilantes, incluindo herbicidas, pesticidas e xenobióticos, através da catálise das reações desses agentes com o grupo SH da glutathiona, neutralizando-os e tornando-os mais facilmente metabolizáveis.

Sistema Não-Enzimático

È formado por antioxidantes hidrofílicos (GSH, vitamina C, indóis e catecóis) e lipofílicos (bioflavonas, vitamina E e carotenóides).

A GSH, cujo sistema antioxidante da qual participa foi mostrado anteriormente, é o principal antioxidante não-enzimático endógeno e pode ser encontrada em vários tecidos biológicos, sendo que no sangue, 99,5% da GSH é intra-eritrocitária. Sua função antioxidante se dá pela capacidade de ser um doador imediato de elétrons para neutralizar H_2O_2 e lipoperóxidos, e também pela capacidade de seqüestrar EROs e ERNs (Nozal et al., 1997; Leichtweis e Ji, 2001).

O ácido ascórbico é um antioxidante que atua principalmente no plasma devido a sua hidrossolubilidade, e exerce sua ação como doador de elétrons, através do ascorbato e também como regenerador do tocoferol (Halliwell 1985; Chan, 1993). Também possui habilidade de eliminar o ácido hipocloroso, um agente igualmente envolvido em processos de estresse (Fumeron et al., 2005). Entretanto, sabe-se que em grandes quantidades e associada ao ferro pode ter efeito pró-oxidante por induzir a geração de OH^\bullet (Chan, 1993).

O alfa-tocoferol é um antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e, portanto, atua na proteção contra a lipoperoxidação. Sua ação antioxidante baseia-se na conversão de radicais hidroxil e superóxido em formas menos ativas, e pode ser regenerada pelo ascorbato e pela GSH (Chan, 1993).

A vitamina A é uma expressão genérica empregada para se referir ao retinol e todos os carotenóides dietéticos que tem atividade biológica de transretinol. Dentre os carotenóides mais importantes estão o α -caroteno, β -caroteno, licopeno e luteína. Os carotenóides em geral são seqüestradores de oxigênio (Gomes et al., 2005).

2.3 Biomarcadores do estresse oxidativo

Os radicais livres produzidos pelo metabolismo oxidativo têm uma alta reatividade, e uma meia-vida biológica curta (Galli & Ronco., 2000). Por esse motivo, sua determinação *in vivo* não é viável. Em contraste, os lipídios, proteínas, ácidos nucléicos e carboidratos, após serem modificados pelas espécies reativas, têm uma meia-vida biológica maior, o que os torna marcadores biológicos ideais do estresse

oxidativo. Dentre esses marcadores encontramos proteínas carbonilas, malondialdeído, F2 isoprostanos; 2,4 hidroxinonenal (Dursun et al., 2005; Gonzáles Rico et al., 2006). Também são considerados biomarcadores, os níveis de antioxidantes, como a GSH, e a atividade das enzimas antioxidantes, como SOD, catalase e GPx.

O malondialdeído (MDA) é um marcador da peroxidação lipídica. O fenômeno da peroxidação de um ácido graxo poliinsaturado dá-se justamente devido à existência de várias insaturações em sua molécula, pois é na dupla ligação que o radical peróxido se insere, formando então, um lipoperóxido (Signorini & Signorini., 2001)

Como mostrado na figura 5, o ataque dos radicais livres sobre os ácidos graxos poliinsaturados pode seguir dois caminhos distintos, ambos com a formação de mais radicais livres, formando hidroperóxidos ou endoperóxidos (Fig. 5; etapas 1c e 2c). O caminho dos hidroperóxidos gera dois radicais (Fig.5;1d), enquanto o dos endoperóxidos gera três radicais (Fig 5; 2e). Cada radical gerado pode por si próprio iniciar uma nova peroxidação lipídica, a clássica reação em cadeia, que resulta em uma intensa peroxidação de muitas moléculas de ácidos graxos poliinsaturados partindo-se de poucos radicais, resultando em dano na membrana ou até sua destruição. A medida destes produtos reativos, especialmente malondialdeído (MDA), são utilizados como biomarcadores da peroxidação lipídica em sistemas biológicos (Locatelli et al., 2003; Southrn e Powis, 1988)

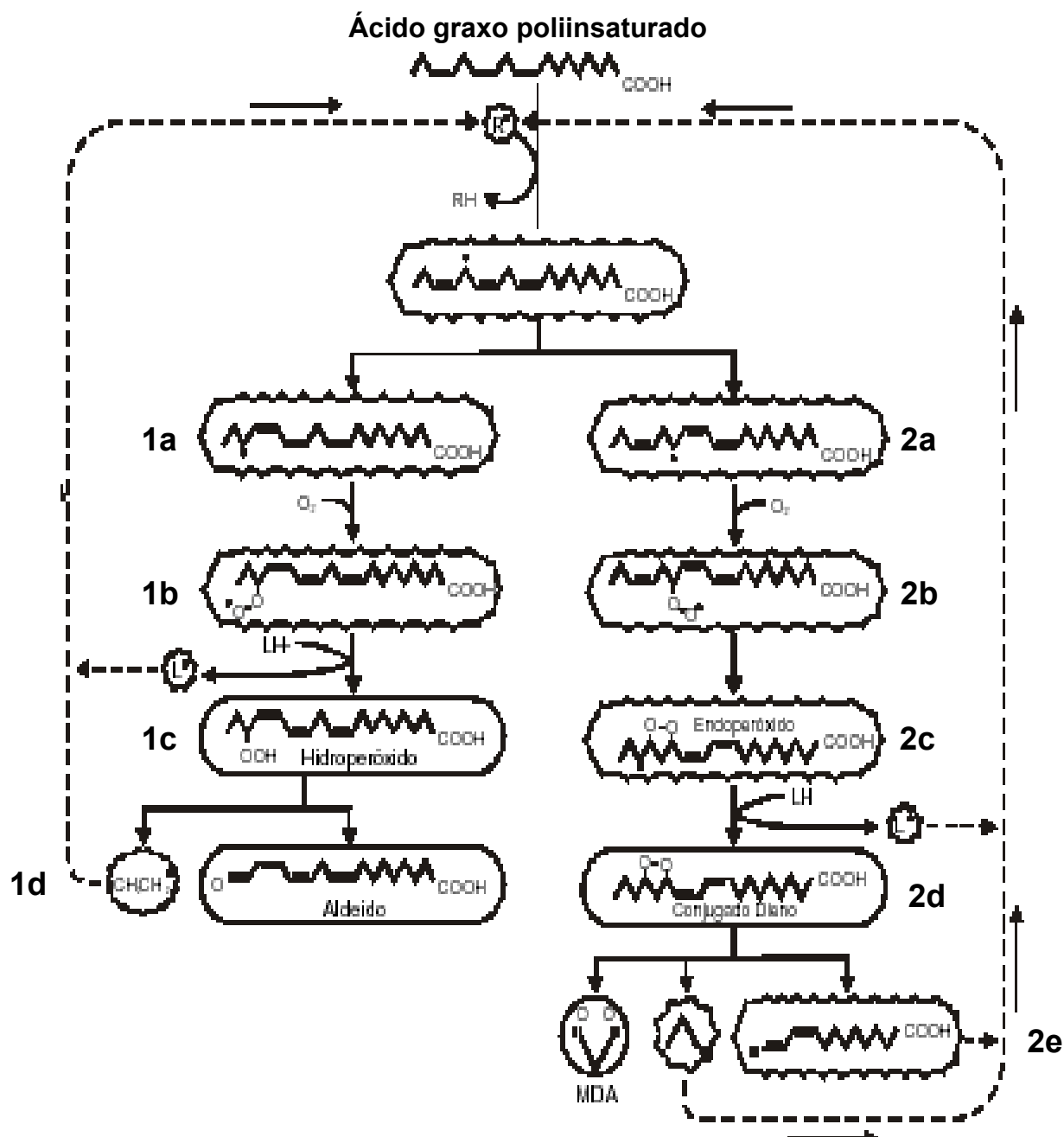


Figura 5: Oxidação de um ácido graxo poliinsaturado.

2.4 Estresse oxidativo e hemodiálise

O estresse oxidativo é um fator importante na mortalidade dos pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) e mediador de muitas complicações, principalmente cardiovascular e neurológica (Locatelli et al., 2003). Está envolvido na patogênese da hipertensão, disfunção endotelial, aterosclerose e inflamação. Encontra-se na insuficiência renal leve e moderada, bem como naqueles que já necessitam de hemodiálise. Na IRC, o estresse oxidativo ocorre pelos efeitos das toxinas urêmicas, angiotensina II, citocinas pró-inflamatórias, sobrecarga de ferro, infecções crônicas, desordens imunológica ou metabólica, assim como o diabetes (Locatelli et al., 2003; Vaziri., 2004; Wardle., 2005).

Apesar do tratamento de hemodiálise possibilitar um aumento na sobrevivência de pacientes com IRC (Dray et al., 2001), este procedimento amplifica o estresse oxidativo devido a múltiplos fatores como: um aumento da produção de EROs e ERNs originários do metabolismo oxidativo; perda de antioxidantes hidrossolúveis, como a vitamina C; anormalidades no metabolismo de lipídios; uso de membranas incompatíveis; impurezas na água de hemodiálise (Canaud et al, 1999; Morena et al, 2000; Draï et al, 2001; Morena et al, 2002), bem como deficiência na excreção do alumínio. (Lee et al., 1999)

2.5 Insuficiência renal crônica

A doença renal crônica consiste em lesão renal com perda progressiva e irreversível das funções renais glomerulares, tubulares e endócrinas. Em sua fase mais avançada é chamada insuficiência renal crônica (IRC) e é a via final comum de uma variedade de afecções renais (Bevilacqua et al., 1995).

De acordo com recente consenso da “National Kidney Foundation”, a IRC é caracterizada por um índice de filtração glomerular inferior a 60ml/min/1,73m² de superfície corporal. O grau da IRC varia de acordo com o índice de filtração glomerular e valores abaixo de 15ml/min/1,73m² já indicam a falência renal (Draibe e Candoroglo, 2004).

Várias patologias podem originar a IRC e dentre as mais comuns estão a hipertensão arterial grave, o diabetes mellitus, a glomerulonefrite crônica, a nefropatia túbulo intersticial crônica, os processos renais obstrutivos crônicos e as

doenças hereditárias tais como rins policísticos e síndrome de Alport (Warnock, 1997; Mallick e Gokal, 1999; Parmar, 2002; Draibe e Cendoroglo, 2004).

Na IRC, a perda de funções tais como a manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e ácido-base, excreção de catabólitos e função reguladora hormonal desencadeia sérios problemas para o paciente como a anemia, deficiência imunológica, tendência a hemorragias, desordens no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas e, vários distúrbios resultantes do acúmulo de toxinas normalmente excretadas pela urina, a chamada síndrome urêmica (Mafra et al., 1999). Além destes problemas, a doença cardiovascular é uma das principais causas de morte dos pacientes com IRC (McGrath et al. , 1995).

A IRC pode ser tratada pela purificação extracorpórea do sangue através de processos dialíticos (hemodiálise ou diálise peritoneal) ou transplante renal. Embora o transplante renal seja o tratamento de escolha, há dificuldades para se obter número suficiente de doadores compatíveis para suprir a demanda necessária. Sendo assim, os tratamentos dialíticos, principalmente, a hemodiálise continuam sendo a opção mais usada na IRC (Mallick e Gokal, 1999).

2.6 Hemodiálise

A hemodiálise é um tratamento utilizado para filtração do sangue, por meio do seu bombeamento até um aparelho contendo membranas semipermeáveis, para retirada de impurezas e substâncias tóxicas do organismo. Em seguida, o sangue retorna purificado para o indivíduo (Mallik e Gokal, 1999).

O sangue circula por um aparelho externo, o dialisador, através de um tubo estéril conectado à fístula arteriovenosa (conexão artificial entre uma artéria e uma veia), habitualmente com fluxo entre 200 e 300 ml/min. No interior do dialisador, uma membrana artificial semipermeável composta por um conjunto de filtros capilares separa o sangue de um líquido, o dialisado, que possui uma composição eletrolítica similar a dos líquidos corpóreos normais. A pressão no compartimento da membrana onde se encontra o dialisado é menor que a do compartimento onde se encontra o sangue, permitindo a filtração de líquidos, produtos da degradação metabólica e substâncias tóxicas presentes no sangue, que ficam no dialisado (Curtis, 1997; Mallik e Gokal, 1999).

A solução de diálise contém solutos como: sódio, potássio, bicarbonato de sódio, cálcio, magnésio, cloro, dentre outros, que irão entrar em equilíbrio com o sangue durante o processo dialítico, mantendo assim a concentração sérica desses solutos dentro dos limites normais. É importante ressaltar que a água usada na solução dialítica deve ser cuidadosamente tratada e sua qualidade monitorada regularmente. A presença de compostos orgânicos como bactérias, fungos, dentre outros ou compostos inorgânicos como, por exemplo, alumínio, flúor e cloramina podem levar a patologias e distúrbios metabólicos importantes (Curtis, 1997; Mallik e Gokal, 1999).

O tratamento regular de hemodiálise ameniza parte dos problemas apresentados na IRC e permite uma maior sobrevida ao paciente. Contudo, ele é incapaz de corrigir totalmente os profundos distúrbios metabólicos aos quais os pacientes urêmicos estão sujeitos. Além disso, esse procedimento amplifica o estresse oxidativo na IRC (Nguyen-Khoa et al., 2001; Morena et al., 2002; Himmelfarb et al., 2002).

2.7 Alumínio, hemodiálise e estresse oxidativo

O alumínio (Al) corresponde a cerca de 8% da crosta terrestre, sendo o metal mais abundante e o terceiro elemento em frequência após o oxigênio e silício (Farina et al., 2002; Martin, 1990). Suas propriedades físico-químicas fazem com que ele tenha uma larga aplicação, tais como, em processos industriais, nos sistemas de tratamento de água, adição em pigmentos de tintas, cosméticos e alimentos (Bertholf et al., 1987), e na indústria farmacêutica em decorrência das suas propriedades antisséptica e quelante (Ellenhorn e Barceloux, 1988).

A principal fonte de alumínio para o organismo humano é a dieta, seguida da inalação de partículas em pó (Ash, 1995). Em condições fisiológicas normais, a dieta habitual fornece 5 a 10 mg de alumínio por dia, que são, quase totalmente, eliminados por filtração glomerular renal, mantendo assim os níveis basais desse metal (tabela 1).

Tabela 1: Valores de alumínio sérico e urinário propostos para a população não exposta (Salgado et al, 1993).

| Agente Químico | Indicador Biológico | Valor de Referência |
|----------------|---------------------|-------------------------|
| Alumínio (Al) | Al no soro | < 10 µg/L |
| Alumínio (Al) | Al na urina | < 50 µg/g de creatinina |

O acúmulo corporal e a conseqüente toxicidade do Al ocorrem principalmente na IRC. A deposição do Al nos tecidos tem sido implicada na patogênese de vários distúrbios clínicos dos sistemas músculo-esquelético, nervoso central, hematológico (Di Paolo et al, 1997) e alterações na atividade de enzimas (Schetinger et al., 1995; Zatta et al., 1995). Em pacientes submetidos ao tratamento dialítico, a ausência de uma eficiente eliminação renal, somado ao uso de soluções de dialisado e líquidos de administração parenteral contaminados pelo metal, bem como a diversidade de medicamentos usados por esses pacientes, os quais em sua maioria contém alumínio, podem levar a acúmulos acentuados do mesmo no organismo (Bohrer et al., 2007).

Adicionalmente a estes relatos, vários estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, relacionam o Al ao estresse oxidativo (Vittori et al., 1999).

3 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito que se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. A apresentação do manuscrito está baseada na versão submetida à Revista Clinical Biochemistry.

3.1 Manuscrito

**HUMAN ERYTHROCYTE DELTA-AMINOLEVULINATE DEHYDRATASE
ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS IN HEMODIALYSIS PATIENTS**

Aceito pela Revista Clinical Biochemistry

Human erythrocyte δ -aminolevulinatase activity and oxidative stress in hemodialysis patients

Juliana Valentini¹, Gabriela C. Schmitt¹, Denise Grotto¹, Lucas D. Santa Maria¹,
Silvana P. Boeira¹, Silvia J. Piva¹, Natalia Brucker¹, Denise Bohrer², Valdeci J.
Pomblum³, Tatiana Emanuelli⁴, Solange C. Garcia^{1*}

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

²Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³Department of Medical Clinic, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁴Department of Food Technology and Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Acknowledgements

The authors would like to thank to CNPq and Capes for providing fellowships.

***Corresponding author:**

Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário
Caixa Postal 5061, CEP 97110-970, Santa Maria (RS), Brazil.
Tel.: +55 55 3220 8941; fax +55 55 3220 8018.
E-mail adress: sgarpom@smail.ufsm.br (S.C. Garcia).

Abstract

Background: Oxidative stress is a complicating factor in chronic renal failure, especially in hemodialysis (HD) patients. Also, aluminum intoxication may occur during hemodialysis treatment. Aluminum has been shown to inhibit the sulfhydryl-containing enzyme δ -aminolevulinate dehydratase (ALA-D). Thus, the involvement of -SH oxidation in ALA-D inhibition and its relationship with serum Al levels and lipid peroxidation in HD patients were evaluated. Methods: Blood ALA-D activity, plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and serum aluminum levels were measured in HD patients (n=37) and healthy controls (n=20). Results: TBARS and Al levels were higher in HD patients than in controls ($p<0.01$), while ALA-D activity was lower ($p<0.05$). The sulfhydryl-reducing agent dithiothreitol (DTT) reactivated ALA-D of HD patients, but activity was still lower than that of controls. ALA-D activity was negatively correlated with TBARS ($r= - 0.63$, $p<0.01$) and aluminum levels ($r= -0.31$, $p<0.05$). Conclusions: Reduced ALA-D activity in HD patients was found to be related to the oxidation of -SH groups essential for enzyme activity. Our results suggest that both increased oxidative stress and increased Al levels may have contribute to enzyme inhibition in HD patients.

Keywords: Chronic renal failure; Porphobilinogen synthase; Aluminum; Oxidative stress; Thiobarbituric acid reactive substances.

1. Introduction

Increased oxidative stress is now considered one of the major risk factors for cardiovascular diseases in chronic renal failure (CRF) patients, particularly those treated by hemodialysis (HD) [1,2,3,4,5]. Various studies found an increased production of reactive oxygen species and defective antioxidant levels in CRF patients, which can be related to uremia per se and/or to the bioincompatibility phenomena in dialyzed patients [2,6,7]. During hemodialysis treatment, the interaction of blood with nonbiological materials of the extracorporeal circuit leads to the activation of several noncellular and cellular systems, resulting in a massive production and release of proteolytic enzymes and oxygen free radicals [8], increasing oxidative stress.

δ -Aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D), an enzyme of the heme biosynthesis pathway, is essential for all aerobic organisms. It is a zinc metalloenzyme that requires reduced thiol groups for activity [9]. ALA-D has been suggested as a marker for oxidative stress because it is highly sensitive to –SH oxidation by pro-oxidant elements [10,11,12] leading to reduced enzyme activity [13,14]. ALA-D inhibition impairs heme biosynthesis and leads to the accumulation of its intermediates. One of them, δ -aminolevulinic acid (ALA) has been shown to induce pro-oxidant events [15,16]. Importantly, δ -ALA-D activity is decreased in CRF, especially in HD treatment [17,18,19].

Zaman et al. [20,21] reported that Al inhibits ALA-D, possibly by binding to –SH groups essential for enzyme activity. It has been postulated that Al binds to thiol groups of allosteric sites and leads to transition into an inactive form of the enzyme [22]. Aluminum toxicity is a complication often associated to dialysis. HD patients may be intoxicated when phosphate binders, saline solutions, heparin or the water used in dialysate preparations are contaminated with aluminum levels [23]. It is well known that haemodialysed patients are exposed to nearly 400 liters of dialysis water weekly.

The aim of this study was to investigate the involvement of -SH oxidation in ALA-D inhibition and its relationship with serum Al levels and lipid peroxidation in HD patients.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

This study was approved by the local Ethics Committee (CEP/CCS/UFSM n° 091/03) and all subjects gave their informed consent prior to the inclusion in the study. The study was carried out on 37 patients with diagnosis of CRF (17 men, 20 women) undergoing regular hemodialysis at Caridade and Casa de Saúde Hospitals, located in Santa Maria, RS, Brazil. No other specific selection criteria were used in order to obtain a representative population of hemodialysis patients. The dialysis sessions lasted 4 hours and were performed three times a week using a cellulose membrane. The control group consisted of 20 healthy volunteers (10 men, 10 women) recruited from Federal University of Santa Maria, RS, Brazil that were not receiving vitamins, were nonsmokers and did not consume alcohol regularly.

2.2. Samples

Blood venous samples (10 ml) were drawn from HD patients and controls and divided in heparinized tubes, EDTA-containing tubes and tubes with no anticoagulant. Plasma-EDTA and serum were obtained by centrifugation at 1,000 x g for 10 minutes at 4°C.

2.3. δ -ALA-D assay

δ -ALA-D activity was assayed in heparinized blood samples according to Sassa [24] by measuring the rate of product formation (porphobilinogen), except that 1 M potassium phosphate buffer, pH 6.8 was used.

2.4. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay

TBARS levels were measured in plasma-EDTA samples as described by Okhawa et al. [25]. Absorbance was measured at 535 nm and TBARS concentration was estimated as μ moles of malondialdehyde equivalents per liter of plasma using tetramethoxypropane as a standard.

2.5. Aluminium assay

Serum Al levels were measured by atomic absorption spectrophotometry, by the method of Bohrer et al. [26].

2.6. Statistical analysis

Statistical computations were performed with Statistica® 6.0 software system (Statsoft Inc., 2001). Data were reported as mean \pm standard deviation (SD) and compared using either Student's t test for independent samples or Mann-Whitney test, depending on the distribution of the variable. ALA-D results without or with DTT were compared by two-way analysis variance (2 patient groups X 2 DTT conditions) followed by Duncan's multiple range test. Spearman rank order correlation was used to evaluate the relationship between pairs of variables. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and discussion

The mean ages of HD and control groups were not significantly different (Table 1). Dialysis time course of HD group ranged from 4 months to 16 years with an average of 52 months (Table 1). HD patients had a significantly higher serum aluminum and TBARS levels when compared with controls (43 and 103% higher, respectively). These findings are in agreement with previous studies that revealed increased oxidative stress and AI levels in HD patients [1,7,27]. Increased TBARS levels indicate oxidative stress and are possibly related to uremia and bioincompatibility with the dialysis system [28].

ALA-D activity is shown in Figure 1. ALA-D activity of control subjects was similar to previous studies [29]. HD patients had lower ALA-D activity when compared with controls ($p < 0.01$). Dithiothreitol (DTT) is a $-SH$ reducing agent that has been used in vitro to prevent and/or revert ALA-D inhibition by oxidizing agents [30]. In this study we investigated the ability of DTT to recover ALA-D activity in the blood of HD patients. ALA-D activity of control group was not significantly different when assayed either with or without DTT, 20.13 ± 4.8 and 22.76 ± 5.7 U/L⁻¹ respectively. However, ALA-D of HD patients was significantly increased when it was assayed with DTT (7.5 ± 4.0 to 12.6 ± 7.3 U/L⁻¹, $p < 0.05$). These results indicate that oxidation of essential thiol groups is involved in ALA-D inhibition in HD patients because DTT was effective to counteract enzyme inhibition. Supporting this hypothesis, a significant and inverse linear relationship was observed between ALA-D activity and TBARS levels ($r = -0.63$, $p < 0.01$; Figure 2). Therefore overproduction of oxidant species due to chronic renal failure and/or hemodialysis that are responsible for the oxidative stress in HD patients [4] is a contributor for oxidation of ALA-D $-SH$ groups.

Although DTT reactivated ALA-D of HD patients, it was still significantly lower than that of controls, as shown in the figure 1, which indicates that mechanisms other than oxidation of –SH groups are possibly involved in enzyme inhibition. The decrease in ALA-D activity that was not reverted by DTT could be related to oxidation of other amino acid residues or to diminished enzyme biosynthesis.

Increased blood Al level has been suggested as a possible candidate to explain ALA-D inhibition in HD patients [17,22]. However, the involvement of Al in ALA-D inhibition in HD patients is still not clear. Studies with laboratory animals have not detected ALA-D inhibition after acute Al intoxication [31,32,33,34]. Besides, aluminum inhibited ALA-D activity in vitro only at relatively high concentrations, suggesting that the sensitivity of the enzyme to aluminum is low [33,34]. In the present study we found a significant inverse relationship between ALA-D activity and serum aluminum levels ($r = -0.31$, $p < 0.05$; Figure 3). This finding supports the hypothesis that increased Al levels could also underlie ALA-D inhibition in HD patients. Considering the low affinity of aluminum for –SH groups [35] ALA-D inhibition by this metal could be secondary to aluminum-induced oxidative stress, since the correlation between Al and TBARS levels was significantly ($r = 0.29$, $p < 0.05$,) demonstrating the independent effect of these factors on ALA-D activity in HD patients. Several studies have implicated lipid peroxidation as one of the molecular mechanisms of aluminum toxicity in vitro and in vivo [36,37,38,39,40]. Also, aluminum by itself could induce lipid peroxidation and alterations of erythroid cells by a direct action on circulating erythrocytes, causing membrane alterations [41].

Reduced ALA-D activity in HD patients was found to be related to the oxidation of –SH groups essential for enzyme activity. Besides, other mechanisms seem to be involved in enzyme inhibition, since DTT could not completely restore ALA-D activity. Our results suggest that both increased oxidative stress and increased Al levels may have contributed to enzyme inhibition in HD patients.

List of abbreviations

ALA-D, δ -aminolevulinate dehydratase; CRF, chronic renal failure; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylene diaminetetraacetic acid; HD, hemodialysis; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

References

- [1] Himmelfarb J, Hakim RA Oxidative stress in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12:593-598.
- [2] Lucchi L, Bonucchi D, Acerbi MA, et al. Improved biocompatibility by modified cellulosic membranes: the case of hemophan. *Artif Organs* 1989; 13:417-421.
- [3] Morena M, Cristol JP, Bose JY, et al. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:422-427.
- [4] Schmidtmann S, Von Baehr R, Precht K. Free radicals induce increased lysis of red blood cells after haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5:600-603.
- [5] Zachée P, Ferrant A, Daelemans R, et al. Oxidative injury to erythrocytes cell rigidity and splenic hemolysis in hemodialyzed patients before and during erythropoietin treatment. *Nephron* 1993; 65:288-293.
- [6] Cappelli G, Lucchi L, Bonucchi D, et al. Polymorphonuclear oxygen free radical production and complement activation induced by dialysis membranes as assayed in an experimental model. *Blood Purif* 1989; 7:293-300.
- [7] Lucchi L, Cappelli G, Acerbi MA, Spattini A, Lusvarghi E. Oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes and serum opsonic activity in chronic renal failure. *Nephron* 1989; 51:44-50.
- [8] Holmes C.J Hemodialyzer performance: Biological indices. *Artif Organs* 1995; 19:1126-1135.
- [9] Fukuda H, Paredes S, Batlle AM. Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehydratase modified by diethylpyrocarbonate and protected by Zn²⁺ ions. *Comp Biochem Physiol* 1988; 91B:285-291.
- [10] Folmer V, Soares JCM, Rocha JBT. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34:1279-1285.
- [11] Maciel EM, Bolzan RC, Braga AL, Rocha JB. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects δ -aminolevulinic dehydratase from liver, kidney and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 15:441-447.
- [12] Soares JCM, Folmer V, Rocha JBT. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. *Nutrition* 2002; 19:627-632.

- [13] Rocha JBT, Pereira ME, Emanuelli T, Christofari RS, Souza DO. Effects of mercury chloride and lead acetate treatment during the second stage of rapid postnatal brain growth on ALA-D activity brain, liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 1995; 100:27-37.
- [14] Rocha JBT, Tuerlinckx SM, Schetinger MRC, Folmer V. Effects of group 13 metals on porphobilinogen synthase in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 200:169-176.
- [15] Bechara EJH, Medeiros MHG, Monteiro HP, et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyries associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quim Nova* 1993; 16:385-392.
- [16] Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJ. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 1992; 72:226-230.
- [17] Buchet JP, Lauwerys R, Hassoun A, et al. Effect of aluminum on porphyrin metabolism in hemodialyzed patients. *Nephron* 1987; 46:360-363.
- [18] Djordjevic Vb, Strahinjic S, Karacevic D, Mijkovic P, Pavlovic D, Stefanovic V. Erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase measurements in Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 1991; 34:S96-96.
- [19] Fontanellas A, Herrero JA, Coronel F, et al. Effects of recombinant human erythropoietin on porphyrin metabolism in uremic patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:774-779.
- [20] Zaman K, Dabrowski Z, Miszta H, et al. The effect of aluminum on the heme biosynthesis (in vitro) in bone marrow cells in rats. *Folia Haematol* 1990; 117:307-311.
- [21] Zaman K, Zaman W, Siddique H. Hematological and enzymatic results of aluminum intoxication in rats. *Comp Biochem Physiol* 1993; 105:73-76.
- [22] Bernard A, Lauwerys R. Metal-induced alterations of delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 514: 41-47.
- [23] Becaria A, Campbell A, Bondy SC. Aluminum as a toxicant. *Toxicol Ind Health* 2002; 18:309-320.
- [24] Sassa, S. δ -Aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 1982; 28:133-145.

- [25] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-358.
- [26] Bohrer D, Nascimento P do, Pomblum SG. Deproteinization of blood serum by acid treatment and microwave irradiation for the determination of aluminium by electrothermic atomic absorption spectrometry. *J Anal Atomic Spectrometry* 1998; 13:365-639.
- [27] Jaffe JA, Liftman C, Glickman JD. Frequency of elevated serum aluminum levels in adult dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005; 46:316-319.
- [28] Morena M, Delbose S, Dupuy AM, Canaud B, Cristol JP. Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int* 2005; 9:37-46.
- [29] Hernández AF, López O, Rodrigo L, et al. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides. Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol Lett* 2005; 159:13-21.
- [30] Gabriel D, Pivetta L, Folmer V, et al. Human erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups. *Cell Biol Inter* 2005; 29:669-674.
- [31] Abdulla M, Svensson S, Haeger-Aronsen B. Antagonistic effects of zinc and aluminum on lead inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Arch Environ Health* 1979; 34:464-469.
- [32] Chmielnicka J, Nasiadek M, Lewandowska-Zyndul E. Effect of aluminium on hematopoiesis after intraperitoneal exposure in rats. *Ecotoxicol Environ Safe* 1995; 33:201-206.
- [36] Chugh SN, Mittal A, Seth S, Chugh K. Lipid peroxidation in acute aluminum phosphide poisoning. *J Assoc Physicians India* 1995; 43:265-266.
- [37] Chugh SN, Arora V, Sharma A, Chugh K. Free radical scavengers and lipid peroxidation in acute aluminum phosphide poisoning. *Indian J Med Res* 1996; 104:190-193.
- [38] Deloncle R, Huguet F, Babin P, Fernandez B, Quellard N, Guillard O. Chronic administration of aluminum L-glutamate in young mature rats: effects on iron levels and lipid peroxidation in selected brain areas. *Toxicol Lett* 1999; 104:65-73.
- [39] Fraga CG, Oteiza PI, Golub MS, Gershwin ME, Keen CL. Effect of aluminum in brain peroxidation. *Toxicol Lett* 1990; 51:213-219.

[40] Yoshino M, Ito M, Haneda M, Tsubouchi R, Murakami K. Prooxidant action of aluminium on-stimulation of iron mediated lipid peroxidation by aluminum. *Biometals* 1999; 12:237-240.

[41] Vittori D, Nesse A, Pérez G, Garbossa G. Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long-term ingestion of aluminum. *J Inorg Biochem* 1999; 76:113-120.

Figure legends

Figure 1. Blood ALA-D activity (U.L^{-1}) in controls and HD patients. Enzyme activity was measured either in the absence or in the presence of 10.5 mM dithiothreitol (DTT). *Significantly different from controls ($p < 0.05$). **Significantly different from controls and from HD patients without DTT ($p < 0.05$).

Figure 2. Correlation between blood ALA-D activity (U.L^{-1}) and plasma TBARS levels ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) in HD patients (open symbols) and control subjects (closed symbols). Spearman correlation coefficient = -0.63 , $p < 0.01$.

Figure 3. Correlation between blood ALA-D activity (U.L^{-1}) and serum AI levels ($\mu\text{g.L}^{-1}$) in HD patients (open symbols) and control subjects (closed symbols). Spearman correlation coefficient = -0.30 , $p < 0.05$.

Table 1

Parameters of the study subjects.

| Parameters | Controls (N=20) | HD patients (N=37) |
|---|--------------------|-----------------------|
| Age (years) | 47.7 ± 7.8 | 54.7 ± 11.0 |
| Duration of dialysis treatment (months) | ----- | 52 ± 41 |
| Aluminum (µg/l) | 15.33 ± 0.75 | 21.90 ± 16.40* |
| TBARS (µmol/l) | 0.59 ± 0.06 | 1.20 ± 0.19* |

Data are expressed as mean ± SD.

* Significantly different from control group (p<0.01).

TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances.

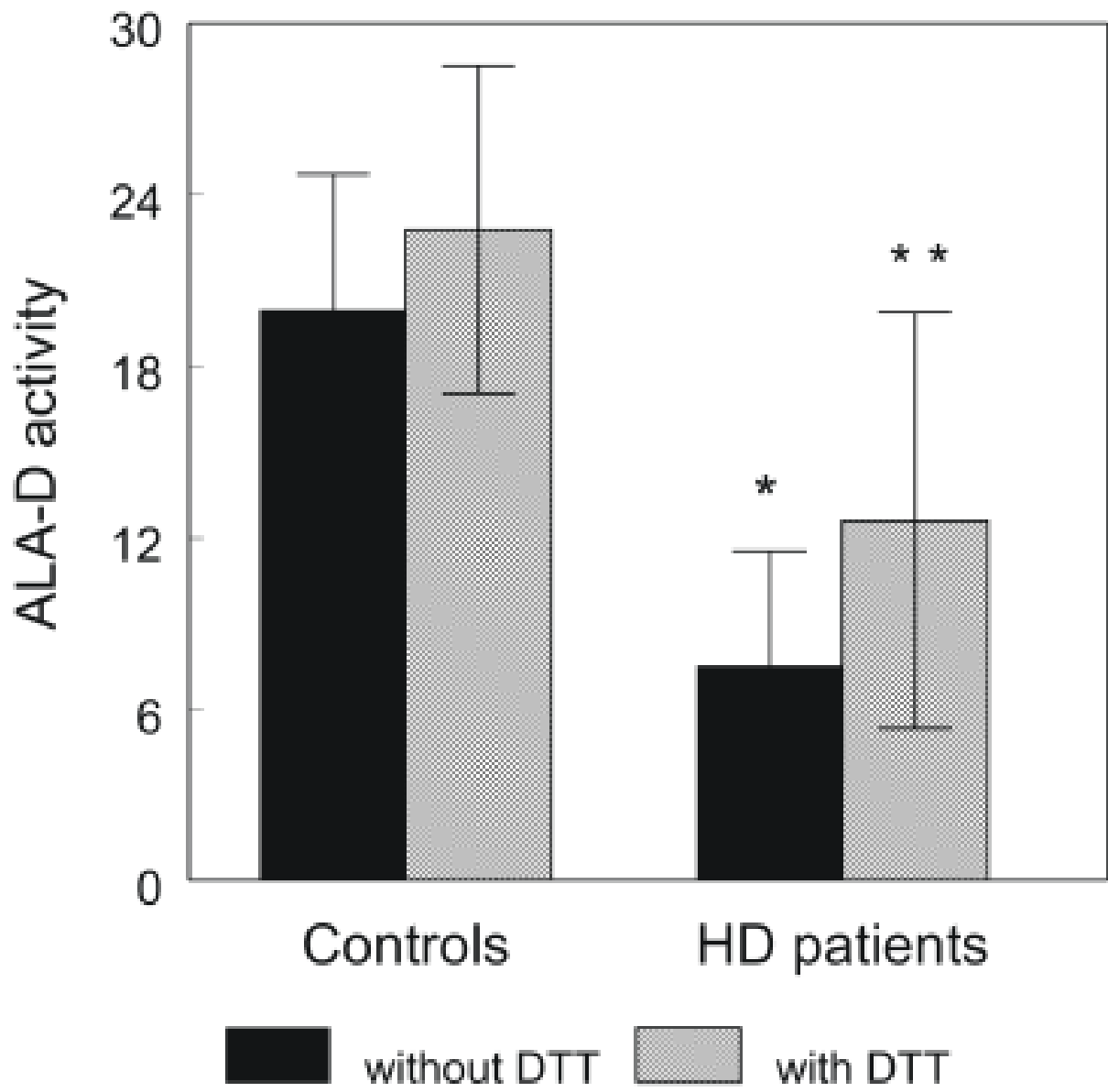


Fig. 1

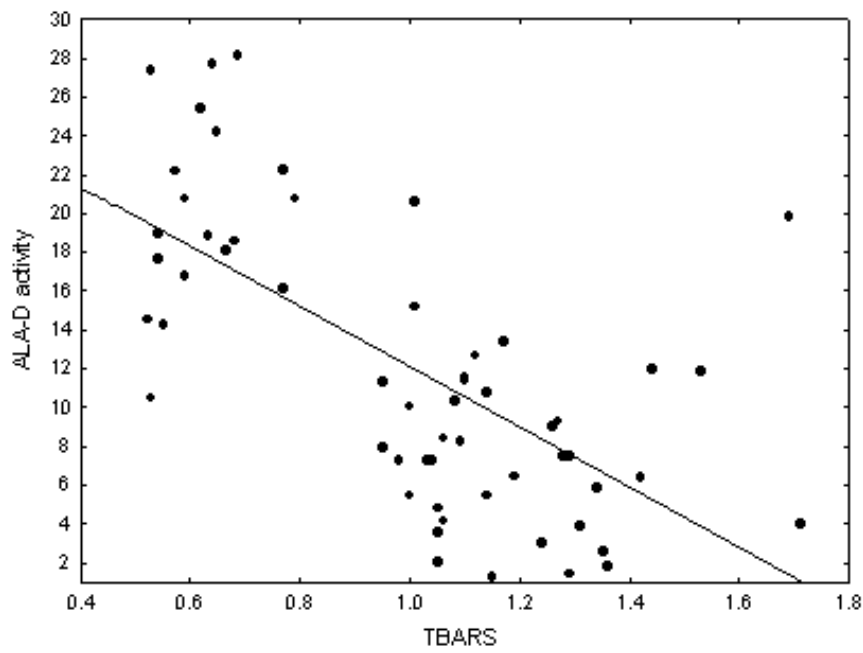


Fig. 2

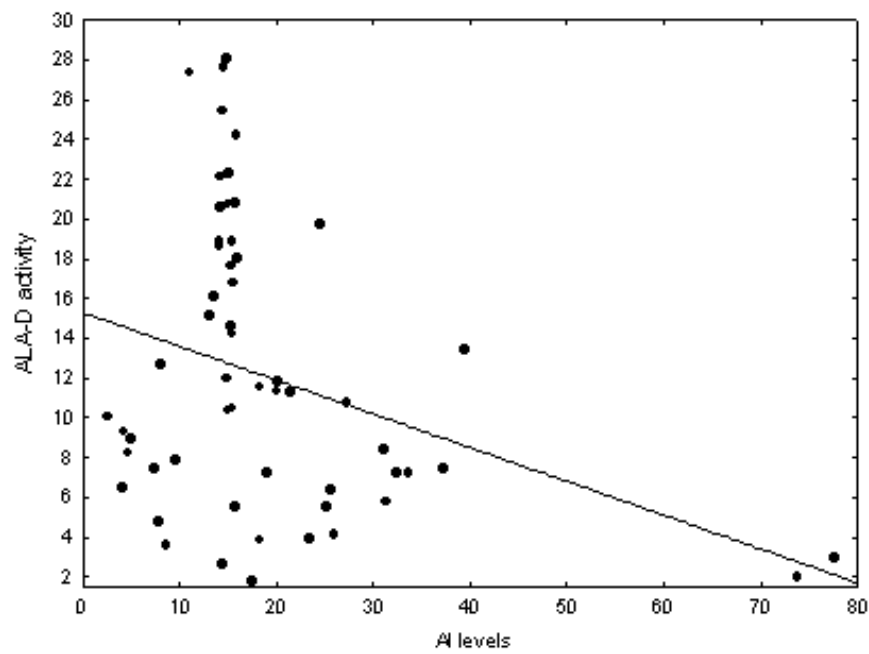


Fig. 3

4 DISCUSSÃO

A δ -ALA-D é uma metaloenzima que requer íons zinco para a sua atividade (Jaffe et al., 1995) e catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas do ácido δ -aminolevulínico (ALA) a porfobilinogênio no passo inicial da biossíntese do grupo heme (Gibson et al., 1955). Por ser também uma enzima que contém grupos sulfidrílicos no sítio ativo, metais como o mercúrio, chumbo e outros compostos que oxidam grupos sulfidrílicos, modificam a sua atividade (Rocha et al., 1995; Goering, 1993; Emanuelli et al., 1996). Em função dessa elevada afinidade das espécies oxidantes por grupos sulfidrílicos da δ -ALA-D, a atividade desta enzima vem sendo considerada um marcador do estresse oxidativo (Gabriel et al., 2004).

Pacientes com insuficiência renal crônica, principalmente os que recebem uma técnica depurativa extrarenal, como a hemodiálise, têm um desequilíbrio do balanço próoxidante/antioxidante (Locatelli et al., 2003; Haugen e Nath., 2003; Himmelfarb e Hakim., 2003; Annuk et al, 2001). Essa situação tem origem multifatorial, como a desnutrição e hipoalbuminemia, o que contribui para uma diminuição dos tióis; o próprio estado urêmico; uso de membranas sintéticas bioincompatíveis e presença de contaminantes na água de diálise usadas durante a terapia. Além disso, fatores de comorbidade, como idade avançada, diabetes, fenômenos inflamatórios, infecciosos e virais também podem contribuir para esse desequilíbrio (Halliwell e Gutteridge., 1990; Himmelfarb et al., 2002). Tudo isso acarreta uma exacerbação do dano celular mediado por radicais livres, os quais estão envolvidos na mortalidade e desenvolvimento de muitas complicações, principalmente cardiovascular e neurológica.

Uma das principais conseqüências do estresse oxidativo é o ataque das espécies reativas ao oxigênio, ocasionando a peroxidação lipídica (Halliwell & Gutteridge.,1991). Os resultados obtidos pela determinação do TBARS mostraram um aumento significativo do mesmo nos pacientes ($p < 0,05$), comprovando a ocorrência de peroxidação lipídica. Esses dados correspondem aos reportados na

literatura (Dasgupta et al., 1992; Loughrey et al., 1994; Pouchant et al., 1994; Ongajooth et al., 1996; Nguyen-Khoa et al., 2001). Adicionalmente, os níveis de TBARS se correlacionaram negativamente com a atividade da δ -ALA-D ($r=-0,63$).

No presente estudo, verificou-se as alterações na atividade basal da enzima δ -ALA-D em pacientes hemodialisados, bem como sua atividade *in vitro* após incubação com dithiothreitol (DTT), que é um agente redutor usado tanto para reverter, como para prevenir a oxidação dos grupos tiólicos (-SH) da enzima (Gabriel et al., 2005). A atividade da enzima δ -ALA-D em pacientes HD mostrou-se diminuída nesse estudo, de acordo com estudos prévios (Fontanellas et al., 2002; Guolo et al., 1996). Um dado não avaliado em outros trabalhos com pacientes hemodialisados foi a verificação do envolvimento dos grupos -SH, através da restauração da atividade da δ -ALA-D na presença de DTT *in vitro*, onde foi observado um aumento de 66,9% na referida atividade.

Vários fatores podem provocar a inibição da δ -ALA-D em pacientes hemodialisados, e não apenas as espécies reativas que se formam. Por exemplo, a atividade da enzima pode ser inibida pela presença de alumínio (Vieira et al., 2000) ou por outros metais como mercúrio (Rocha et al., 1995), chumbo (Rodrigues et al., 1989), cobre (Nelson et al., 1981), selênio e telúrio (Maciel et al., 2000; Farina et al., 2001).

Porém, a atividade da enzima não foi restaurada pelo DTT aos níveis basais encontrados nos indivíduos saudáveis. Isso faz supor que outros mecanismos poderiam estar envolvidos. Dentre eles, a oxidação de outros aminoácidos não sulfidrílicos, a síntese diminuída dessa enzima, ou ainda outros fatores peculiares à condição urêmica, como o acúmulo de substâncias no organismo que poderiam interferir na atividade enzimática. De acordo com Guolo et al., 1999, a presença de um peptídeo com massa molecular de 56,2 KDa poderia provocar a inibição da atividade da δ -ALA-D em pacientes urêmicos.

Como já descrito experimentalmente em outros trabalhos (Navarro et al., 1988; Jaffe et al., 2005), os níveis de alumínio nesse estudo também estiveram significativamente aumentados nos pacientes com IRC sob tratamento de hemodiálise avaliados. Isso acontece em virtude, por exemplo, do deficiente sistema de eliminação renal desse metal, da contaminação pelo Al da água de hemodiálise e concentrados salinos usados, e também do alumínio presente em muitos dos

medicamentos usados por esses pacientes. Além disso, os níveis de Al se correlacionaram negativamente com a atividade da δ -ALA-D nos pacientes HD ($r = -0,3$), demonstrando que o Al poderia reagir com os grupos $-SH$ da mesma, e estar envolvido na sua inibição.

Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo revelaram que há uma inibição da δ -ALA-D em pacientes hemodialisados, e que a inibição dos grupos $-SH$ estão em parte envolvidos na diminuição da atividade enzimática. Além disso, verificou-se uma correlação significativa entre os níveis de Al e TBARS ($r=0,3$). Por outro lado, através da análise de correlação parcial, observou-se que os níveis de TBARS parecem ser os responsáveis pela inibição dos grupos tióis. No entanto, devido à correlação positiva entre Al e TBARS, os níveis de Al estariam envolvidos no aumento do estresse oxidativo, já que a peroxidação lipídica é relacionada com a interação do Al com as células, alterando suas membranas e causando um aumento significativo nos níveis de TBARS (Vittori et al., 1999; Sibmooh et al., 2002). Assim, tanto os níveis de Al, como TBARS contribuem para a inibição da enzima. Todavia, outros estudos para esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na inibição da enzima serão necessários.

5 CONCLUSÕES

⇒ A atividade da δ -ALA-D sangüínea foi demonstrada diminuída nos pacientes hemodialisados.

⇒ Após incubação com DTT, atividade da δ -ALA-D foi significativamente restaurada, indicando o envolvimento dos grupos –SH nessa inibição. No entanto, a atividade não atingiu os níveis encontrados em controles, supondo que outros mecanismos possam estar envolvidos na inibição da δ -ALA-D, somado a oxidação dos grupos tióis.

⇒ O TBARS plasmático se apresentou como o principal envolvido na oxidação dos grupos –SH. No entanto, o AI tem um efeito indireto sobre a δ -ALA-D, já que aumenta o estresse oxidativo, o que foi demonstrado pela correlação positiva entre TBARS e AI.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNUK, M. et al. Oxidative stress in pre-uremic patients. **Clin Nephrol.**, v. 56, p. 308-314, 2001.

ASH, K. O. Trace elements: When essential nutrients become poisonous. **Lab Med.**, v. 26, p. 266-271, 1995.

BARNARD, G.F.; ITOH, R.; HOHBERGER, L.H.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase – Possible role of essential thiol groups. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 8965-8974, 1977.

BARREIRO, O.L.C. 5-Aminolevulinate hydro-lyase from yeast. Isolation and purification. **Biochim. Biophys. Acta**, 139, 479-486, 1967.

BERTHOLF, R.L; WILLIS, M; SAVORY, J. Aluminum. In **Seiler HG, Siegel H. Handbook on toxicity of onorganic compounds**. New York, Marcel Dekker, Inc., p. 56-61, 1987.

BECHARA, E.J.H., MEDEIROS, M.H.G., MONTEIRO, H.P., HERMES-LIMA, M., PEREIRA, B., DEMASI, M., COSTA, C.A., ABDALL, D.S.P., ONUKI, J., WENDEL, C.M.A., MASCI, P.D. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Quim. Nova**, 16, 385-392, 1993.

BEVAN, D. R., BODLAENDER, P., SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn²⁺ for enzyme activity. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n. 5, p. 2030-2035, 1980.

BELLÓ, A. **Dano oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres**. Porto Alegre: Editora Ulbra., p. 15-19, 2002.

BEVILACQUIA, F. et al. **Fisiopatologia Clínica**. 5^o Edição. São Paulo: Atheneu, 1995, p. 401-452.

BOESE, Q.F., SPANO, A.J., LI, J., TIMKO, M.P. δ -Aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 17060-17066, 1991.

BOHRER, D., et al. Drugs as a hidden source of aluminium for chronic renal patients. **Nephrology Dialysis Transplantation.**, v. 22, p. 605-611, 2007.

CANAUD, B., CRISTOL, J., MORENA, M., LERAY-MORAGUES, H., BOSCH, J., VAUSSENAT., F. Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. **Blood Purif.**, v.17, p. 99-106, 1999.

CHAN, A.C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.**, v. 71, p. 725-731, 1993.

CHEN, A. and NEILANDS, J.B. Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 55, p. 1060-1063, 1973.

CHEN, A. and NEILANDS, J.B. The delta-aminolevulinic acid dehydratases: molecular and environmental properties. **Struct. Bonding**, Berlin, 29, 123-169, 1976.

CURTIS, J.J. Tratamento da Insuficiência Renal Irreversível. **Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p. 622-631.

DASGUPTA, A.; HUSSAIN, S.; AHMAD, S. Increase lipid peroxidation in patients on maintenance hemodialysis. **Nephron.**, v. 60, n. 1, p. 56-59, 1992.

DENT, A.J., BEYERSMANN, D., BLOCK, C., HASNAIN, S.S. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. **Biochemistry**, 29, 7822-7828, 1990.

DI PAOLO, N., et al. Uremia, dialysis and aluminium. **Int J Artf Organs.**, v. 20, p. 547-552, 1997.

DRAI, J. et al. Oxidants and antioxidants in long-term haemodialysis patients. **II Farmaco.**, v.56, n. 5-7, p. 463-465, 2001.

DRAIBE, S., CENDEROGLO, M. Epidemiologia da insuficiência renal crônica (IRC) no Brasil. **International Brazilian Journal of Urology.**, v.29, n. 2, p. 3-6, 2004.

ELLENHORN, J.M., BARCELOUX, D.G. Medical toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning. **Elsiever Science Publishers.**, p. 1009-1012, 1998.

EMANUELLI, T., ROCHA, J.B.T., PEREIRA, M.E., PORCIUNCULA, L.O., MORSCH, V.M., MARTINS, A.F., SOUZA, D.O.G. Effect of mercury chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol. Toxicol.**, 79, 136-143, 1996.

FARINA, M. et al. Effects of aluminum sulfate on erythropoiesis in rats. **Toxicology Letters.**, v. 132, p. 131-139, 2002.

FINELLI, V.N.; MURHTY, L.; PEIRANO, W.B.; PETERING, H.G. Delta-aminolevulinate dehydratase, a zinc dependent enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 60, 1418-1424, 1974.

FOLMER, V.; SOARES, J.C.M.; ROCHA, J.B.T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. **Int J Biochem Cell Biol.**, 34: 1279-1285, 2002.

FUMERON, C et al. Effects of oral vitamin C supplementation on oxidative stress and inflammation status in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation.**, v.20, n.9, p. 1874-1879, 2005.

GABRIEL, D et al. Human erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups. **Cell Biol Inter** ., v. 29, p. 669-674, 2005.

MACIEL, E.M. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially effects δ -aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**., v. 14, n. 6, p. 310-319, 2000.

MARTIN, B. R. Chemistry of aluminum. In: De Broe, M; Coburn, J.W, eds. Aluminum and renal failure. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**., p. 7-26, 1990.

GALLI, F.; RONCO, C. Oxidant stress in hemodialysis. **Nephron**., 84, 1-5, 2000.

GIBSON, K.D., NEUBERGER, A., SCOTT, J.J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, 61, 618-628, 1955.

GOERING, P.L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, 14, 45-60, 1993.

GOMES, M.M.; SAUNDERS, C.; ACCIOLY, E. Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**., v.5, n. 3, p. 275-282, 2005.

GONÇALVES, T.L. et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. **Clinical Biochemistry**., v. 38, p. 1071-1075, 2005.

GURER, H.; ERCAL, N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? **Free Radical Biology & Medicine**. v. 29, p. 927-945, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human diseases curiosity, cause or consequence? **The Lancet**., 344, 721-724, 1994.

HALLIWELL, B et al. The antioxidants of human extra-cellular fluids. **Arch Biochem Biophys**., v. 280, p. 1-8, 1990.

HAUGEN, E.; NATH, K.A. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. **Blood Purif.**, v. 17, p. 58-65, 1999.

HIMMELFARB, J., LAZARUS, M., HAKIM, R. Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis. **American Journal of Kidney Diseases.**, v.17,n. 3, p. 271-276, 1991.

HIMMELFARB, J.; STENVINKEL, P.; IKIZLER, T.A.; HAKIM, R.M. The elephant in uremia : oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. **Kidney Int.**, v. 62, p. 1524-1538, 2002.

HIMMELFARB, J.; HAKIM, R. Oxidative stress in uremia. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, v. 12, p. 593-598, 2003.

JAFFE, E.K. The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism. **Bioorg. Chem.**, 32, 316-25, 2004.

LEICHTWEIS, S.; JI, L.L. Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. **Acta Physiology Scandinavian**, 179, 1-10, 2001.

LEE, Y.K. et al. Homocysteine and atherosclerosis in patients on chronic hemodialysis. **Journal of Korean Medical Science.**, v.14, n. 2, p. 193-198, 1999.

LOCATELLI, F., CANAUD, B., ECKARDT, K.U., STENVINKEL, P., WANNER, C., ZOCCALI, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 18, p. 1272-1280, 2003.

LOUGHREY, C.M. et al. Oxidative stress in haemodialysis. **The Quarterly Journal of Medicine.**, v. 87, p. 679-683, 1994.

McGRATH, L.T. et al. Oxidative stress in erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. **Clinica Chimica Acta.**, v. 235, p. 179-188, 1995.

MACIEL, E.M. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially effects δ -aminolevulinic dehydratase from liver, kidney and brain of mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.**, v. 14, n. 6, p. 310-319, 2000.

MARTIN, B. R. Chemistry of aluminum. In: De Broe, M; Cobum, J.W, eds. Aluminum and renal failure. **Dordrecht: Kliwer Academic Publishers.**, p. 7-26, 1990.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P., COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição de Campinas.**, v. 12, n. 3, p. 205-212, 1999.

MALLICK, N.P., GOKAL, R. Haemodialysis. **The Lancet.**, v. 353, p. 737-742, 1999.

MORENA, M., CRISTOL, J.P., CANAUD, B. Why hemodialysis patients are in a prooxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance. **Blood Purif.**, V. 18, P. 191-199, 2000.

MORENA, M et al. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation.**, v. 17, p. 422-427, 2002.

NAVARRO, J.A.; PARRA, O. E.; ROMERO, R.A. Aluminum determination in whole blood, dialysis solution, and tap water samples from Maracaibo dialysis units (Venezuela) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease.**, v. 2, n. 1, p. 3-8, 1988.

NELSON, H.M; UGHES, M.A; MEREDITH, P.A. Zinc, copper and delta aminolevulinic acid dehydratase in vitro and in vivo. **Toxicology.**, v. 21, n. 2, p. 261-266, 1981.

NGUYEN – KHOA, T. et al. Oxidative stress and Haemodialysis: Role of inflammation and duration of dialysis treatment. **Nephrology Dialysis and Transplantation.**, v. 16, p. 335-340, 2001.

NOZAL, M.J. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column

derivatization with 5-5' dithiobis (2 nitrobenzoic acid). **Journal of Chromatography A.**, 778, 347-353, 1997.

ONGAJOOTH, L. et al. Role of lipid peroxidation, trace elements and antioxidants enzymes in chronic renal disease patients. **Journal of the Medical Association of Thailand.**, v. 79, n.12, p. 791-800, 1996.

OTEIZA, P. I. et al. 5-A minolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Archives of Biochemic and Biophysics.*, v. 316, p. 607-611, 1995.

PARMAR, M. Chronic renal disease. **British Medical Journal-BMI.**, v. 325, p. 85-90, 2002.

PEREIRA, B., CURI, R., KOKUBUN, E., BECHARA, J.H. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **J. Appl. Physiol.**, 72, 226-230, 1992.

PEUCHANT, E. et al. Lipoperoxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing hemodialysis: vitamin A, E and iron status. **Free Radical Biology & Medicine.**, v. 16, n. 3, p. 339-346, 1994.

REILLY, P.M., SCHILLER, H.J., BULKLEY, G.B. Reactive oxygen metabolites in shock. **Scientific American Inc.**, v. 8, p. 1-28, 1991.

ROCHA, J.B.T., PEREIRA, M.E., EMANUELLI, T., CHRISTOFARI, R.S., SOUZA, D.O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology**, 100, 27-37, 1995.

SASSA, S., FUJITA, H., KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: Kotyk, A. Skoda, J. Paces, V., Kostka, V. (Eds.), **Highlights of Modern Biochemistry**, VSP, Utrecht, 1, 329-338, 1989.

SCHAUMBURG, A., SCHNEIDER-POETSH, A.A.W., ECKERSKORN, C. Characterization of plastic 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D, EC 4.2.1.24) from

spinach (*Spinacia oleracea* L.) by sequencing and comparison with non plant ALA-D enzymes. **Z. Naturforsch.**, 45C, 77-84, 1991.

SCHETINGER, M.R.C. et al. Effects of aluminum chloride on the kinetics of rat cortex synaptosomal ATP diphosphohydrolase. **Biological Trace Element Research.**, v. 50, p. 209-219, 1995.

ZATTA, P. et al. Different effects of aluminum upon anhydrases and Na⁺/K⁺ ATPase activities in rat. **Neuroscience Letters**, v. 197, p. 65-68, 1995.

SHIBATA, H. and OCHIAI, H. Purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase from radish cotyledons. **Plant Cell Physiol.**, 18, 421-429, 1977.

SIGNORINI, J.L.; SIGNORINI, S.L. Atividade física e radicais livres: Pathogenetic and Clinical implications. **American Journal of Kidney Diseases.**, v. 37(4), 2001.

SOUTHRN, P.A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. Chemical nature and biologic reactions. **Mayo Clin Proc.**, v. 63, p. 381-389, 1998.

SOARES, J.C.M., FOLMER, V., ROCHA, J.B.T. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. **Nutrition.**, 19, 627-632, 2002

SOMMER, R. and BEYERSMANN, D. Zinc and cadmium in 5-aminolevulinic acid dehydratase. Equilibrium, kinetic, and 113Cd-nmr-studies. **J. Inorg. Biochem.**, 20, 131-145, 1984.

SPENCER, P. and JORDAN, P.M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, 300, 373-381, 1994.

SPENCER, P. and JORDAN, P.M. Characterization of the two 5-aminolevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, 305, 151-158, 1995.

TAMAI, H., SHIOI, Y., SASSA, T. Purification and characterization of delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*. **Plant Cell Physiol.**, 20 (2), 435-444, 1979.

TIMBRELL, J.A. **Principles of biochemical toxicology**. Second edition. Washington DC: Taylor e Francis London, 1991.

TSUKAMOTO, I., YOSHINAGA, T., SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochim. Biophys. Acta**, 12, 167-78, 1979.

WARDLE, E.N. Cellular oxidative processes in relation to renal disease. **Am J Nephrol.**, v.25, p. 13-22, 2005.

WARNOCK, D.G. Insuficiência Renal Crônica. **Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p. 614-622.

VAZIRI, N.D. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension.**, v.13, p. 93-99, 2004.

VIEIRA, V. L. et al. Effect of aluminum on δ – aminolevulinic acid dehydratase from mouse blood. **Toxicology Letters.**, v. 117, n. 1-2, p. 45-52, 2000. VITTORI, D; NESSE, A; PÉREZ, G; GARBOSSA, G. Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long-term ingestion of aluminum. **J Inorg Biochem.**, v. 76, p. 113-120, 1999.

VITTORI, D., NESSE, A., PÉREZ., G. et al. Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long-term ingestion of aluminum. **J Inorg Biochem** 1999; 76:113-120.

