

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

**O ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES  
HEMODIALISADOS E A INFLUÊNCIA DO  
TRATAMENTO TERAPÊUTICO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Gabriela Cristina Schmitt**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2006**

S355e	<p>Schmitt, Gabriela Cristina, 1980-</p> <p>O estresse oxidativo em pacientes hemodialisados e a influência do tratamento terapêutico / por Gabriela Cristina Schmitt; orientador Solange Cristina Garcia Pomblum. – Santa Maria, 2006. 117 f.: il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2006.</p> <p>1. Análises clínicas 2. Farmácia 3. Estresse oxidativo 4. Insuficiência renal crônica 5. Hemodiálise 6. Anemia 7. Homocisteína I. Pomblum, Solange Cristina Garcia, orient. II. Título</p> <p>CDU: 616.61-008.6</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada por

Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160

Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**O ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES  
HEMODIALISADOS E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO  
TERAPÊUTICO**

**por**

**Gabriela Cristina Schmitt**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do 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.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange Cristina Garcia Pomblum**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2006**

**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

**O ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES HEMODIALISADOS E A  
INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TERAPÊUTICO**

elaborada por

**Gabriela Cristina Schmitt**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Solange Cristina Garcia Pomblum, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Cristina Wayne Nogueira, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

---

**Tatiana Emanuelli, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

Santa Maria, junho de 2006.

**“Para achar água é preciso  
Descer terra adentro,  
Encharcar-se no lodo.  
Mas há os que preferem olhar os céus  
E esperar pelas chuvas...”**

**Oswaldo Vianna Filho**

## ***Dedicação***

***Dedico este trabalho aos meus pais Amauri e Luci,  
meus referenciais de vida e minha fortaleza.***

***A vocês que sempre acreditaram em mim, que por  
vezes abdicaram dos próprios sonhos em nome dos meus,  
que sempre me incentivaram, apoiaram e estiveram ao meu  
lado em todos os momentos desta jornada.***

***Agradeço por todo amor, carinho, apoio, dedicação,  
incentivo, esforço, sacrifício e exemplo de vida.***

***Palavras são pouco para agradecer e expressar  
todo amor e orgulho que sinto por vocês.***

***Também dedico as minhas  
irmãs Patrícia e Andréa.***

***Obrigada por todo amor e carinho, por sempre  
estarem ao meu lado apoiando, incentivando,  
ouvindo, aconselhando e auxiliando.***

***Obrigada por serem estas irmãs maravilhosas.***

***Agradeço também as minhas sobrinhas***

***Eduarda e Valentina e ao meu cunhado Júnior.***

***Obrigada por tudo, por todo amor, carinho e compreensão.***

***Amo muito todos vocês.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua constante presença ao meu lado durante esta jornada.

Agradeço a toda minha família, meu alicerce: pais, irmãs, sobrinhas, cunhado, avó, tios, tias e primos. Obrigada por tudo.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Solange Cristina Garcia Pomblum pelo seu exemplo de dedicação, persistência, força e coragem e principalmente, pela oportunidade de aprendizado e por sua contribuição a minha formação científica.

A professora Dr<sup>ª</sup> Margareth Linde Athayde, minha grande amiga Marga, que por tantas vezes me auxiliou, aconselhou e incentivou. Obrigada por todo carinho, atenção, amizade, força, apoio, acolhimento e pelo seu “ombro amigo” sempre.

A professora e amiga Dr<sup>ª</sup> Simone Gonçalves Cardoso e a amiga Elaide Minatto pelo apoio, atenção, dedicação, carinho, amizade e pelos confortantes abraços.

Aos colegas do laboratório de toxicologia (LATOX) Denise Grotto, Juliana Valentini, Clóvis Paniz, Juniara Cassol, Juliana Vicentini, Rachel Bulcão, Ângela Moro, Lucas Santa Maria, André Valle de Bairros, Silvana Boeira, Sílvia Piva, Mariele Charão, Karen Schott, Pietro de Franceschi, Raquel Tonello, Cristiane Ribeiro, Natália Brucker, Janisse Miranda, Marcos Michels, Fernanda de Almeida, Carmem da Silva e Caren por todo apoio, incentivo, dedicação, colaboração, disponibilidade, esforço e aprendizado que me proporcionaram. Agradeço também por todos os momentos de descontração, pela amizade, carinho, conselhos, sorrisos e compreensão, que sempre foram fundamentais e que fizeram de nós muito mais que simples colegas de laboratório.

Aos grandes amigos e colegas Marcela (Alemoa), Lisiane (Lisi), Sílvia Helena (Silvinha), Denise (Deni), Chana, Ricardo (Tato), Danielle (Lelê), Leandro (Sidóca), Carine, Daniele, Ana Laura, Marcelo, Bianca (Bib's) e Fibe (Fibe), Juliana Vicentini, Juliana Valentini, Rachel e Clóvis agradeço pela amizade, carinho, apoio, incentivo,

atenção, compreensão, conselhos, abraços, sorrisos, lágrimas e pelo sempre “ombro amigo” em tantos momentos, em especial nos nossos incontáveis, indispensáveis e alegres almoços “despressurizantes”.

Agradeço também as minhas companheiras de tantas viagens, onde compartilhamos conhecimentos, aflições, angústias e, sobretudo, alegrias: Cris, Alemoa, Bib’s, Juzinha, Chana e Dani. Também as minhas grandes e sempre amigas Vanessa, Juci, Tati, Fabi, Barth e Micheli por todo apoio e incentivo, mesmo que à distância. A todos vocês, obrigada pela convivência amiga e por estarem sempre ao meu lado durante esta jornada, sempre incentivando e transmitindo força.

As minhas amigas da turma do “Xurras” Mana, Lisa, Débi Beta, Beti, Susi, Lê, Déia, Glau, Bina, Solange e Carô por toda amizade, carinho, apoio, força, abraços, beijos, sorrisos e incentivo em tantos momentos.

Ao Dr. Valdeci Juarez Pomblum por sua atenção, disponibilidade e colaboração em tantos momentos.

Aos professores Dr<sup>a</sup> Denise Bohrer do Nascimento, Dr. Paulo Nascimento e Dr. Leandro Machado de Carvalho por compartilharem seus conhecimentos e disponibilizar a estrutura do Laboratório de Análises Químicas (Lachen) ao nosso grupo de trabalho em tantos momentos. Ainda, a todos os amigos do Lachen, em especial Cristiane, Adrian, Denise, Emilene, Vanessa, Marieli, e Mareni por todo auxílio, aprendizado, disponibilidade e amizade.

A professora Dr<sup>a</sup> Tatiana Emanuelli pela colaboração, auxílio e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Ao Hospital de Caridade Astrogildo de Azevedo e a Casa de Saúde, em especial ao médico Arnaldo e a enfermeira Geni Bürg pela disponibilidade e auxílio. Também aos pacientes e demais pessoas que se dispuseram a participar como voluntários na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), em especial ao Sr. Elehú de Oliveira pela cedência de sua estrutura para realização de algumas análises para o trabalho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM pela colaboração, suporte técnico e amizade.

A Abbott Diagnóstica pela gentil doação de kits para determinação de homocisteína.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela aprendizagem, atenção e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos.

Ao Programa da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar o mestrado.

A CAPES pelo fomento através da concessão da bolsa.

Este espaço também é dedicado àqueles que, mesmo não citados nominalmente, de alguma forma deram a sua contribuição para que este trabalho fosse realizado. A todos, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 Estresse oxidativo.....	23
2.1.1 Oxidantes.....	23
2.1.2 Antioxidantes.....	24
2.1.2.1 Antioxidantes endógenos.....	24
2.1.2.2 Antioxidantes exógenos.....	25
2.1.3 Peroxidação lipídica.....	26
2.2 Estresse oxidativo e hemodiálise.....	28
2.2.1 Insuficiência renal crônica.....	28
2.2.2 Hemodiálise.....	29
2.2.2.1 Perdas nutricionais pela hemodiálise.....	31
2.3 Principais complicações decorrentes da IRC e a terapia medicamentosa.....	32
2.3.1 Doenças cardiovasculares.....	32
2.3.1.1 Aterosclerose.....	32
2.3.1.2 Hiper-homocisteinemia.....	34

2.3.2 Anemia.....	37
2.3.2.1 Terapia com eritropoetina e ferro.....	39
2.3.3 Hipertensão.....	40
2.3.4 Distúrbios no metabolismo do fosfato, do cálcio e da vitamina D.	41
2.3.5 Riscos de hemorragias.....	42
2.4 Reposição nutricional nos pacientes.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 Equipamentos.....	45
3.2 Reagentes.....	46
3.3 Soluções.....	47
3.4 Grupo de estudo.....	48
3.5 Amostra biológica.....	49
3.5.1 Coleta e processamento das amostras.....	49
3.6 Análises realizadas e tratamentos das amostras.....	50
3.6.1 Hemoglobina.....	50
3.6.2 Hematócrito.....	50
3.6.3 Glutathiona reduzida.....	51
3.6.4 TBARS.....	51
3.6.5 Atividade da enzima ALA-D.....	52
3.6.6 Homocisteína.....	53
3.6.7 Metemoglobina.....	53
3.7 Análise estatística.....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1 Coleta de dados.....	55
4.2 Perfil dos participantes.....	55
4.2.1 Distribuição por sexo e idade.....	55
4.2.2 Hábitos de vida.....	56
4.2.2.1 Tabagismo e álcool.....	56
4.2.2.2 Atividade física.....	57

4.3 Etiologia da doença renal.....	58
4.4 Tempo de hemodiálise.....	59
4.5 Co-morbidades na IRC.....	60
4.5.1 Hipertensão e Diabetes.....	60
4.5.2 Anemia.....	64
4.5.2.1 Avaliação hematológica.....	65
4.5.2.2 Análise das possíveis causa da anemia.....	67
4.5.2.3 Conseqüências da anemia renal.....	74
4.6 Avaliação do estresse oxidativo.....	76
4.7 Dosagem da homocisteína.....	83
5. CONCLUSÕES.....	89
6. APÊNDICES.....	91
Apêndice A.....	92
Apêndice B.....	93
Apêndice C.....	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Sistema antioxidante da glutathiona.....	25
Figura 2:	Principais vias do metabolismo da homocisteína.....	36
Figura 3:	Distribuição percentual dos pacientes hemodialisados em relação aos níveis de Hb.....	66
Figura 4:	Distribuição percentual dos pacientes hemodialisados em relação aos níveis de Ht.....	66
Figura 5:	Correlação entre os valores de Hb e Ht nos pacientes hemodialisados.....	67
Figura 6:	Comparação entre a atividade da enzima ALA-D em pacientes hemodialisados e controles com e sem incubação com o agente redutor DTT.....	81
Figura 7:	Distribuição das concentrações de Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ ) nos pacientes hemodialisados e controles.....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Distribuição por sexo e idade dos participantes .....	55
Tabela 2:	Alguns hábitos dos pacientes hemodialisados.....	56
Tabela 3:	Capacidade funcional dos pacientes hemodialisados.....	57
Tabela 4:	Etiologia da insuficiência renal crônica nos pacientes hemodialisados.....	58
Tabela 5:	Tempo do tratamento de hemodiálise dos pacientes.....	60
Tabela 6:	Percentual de pacientes com hipertensão e diabetes mellitus.....	61
Tabela 7:	Medicamentos anti-hipertensivos utilizados pelos pacientes hemodialisados, de forma individual ou associados entre si ou com diuréticos e a respectiva percentagem de usuários.....	62
Tabela 8:	Medicamentos hipoglicemiantes utilizados pelos pacientes hemodialisados e a respectiva percentagem de usuários.....	63
Tabela 9:	Resultados de Hb (g/dl) e Ht (%) dos pacientes hemodialisados e controles, em média $\pm$ desvio padrão.....	65
Tabela 10:	Percentagem de pacientes hemodialisados sob terapia de reposição de vitamina B12 e ácido fólico e seus respectivos tempos de uso.....	73
Tabela 11:	Percentual dos pacientes hemodialisados em relação aos níveis estratificados de Hb.....	76
Tabela 12:	Percentual dos pacientes hemodialisados em relação aos níveis estratificados de Ht.....	76
Tabela 13:	Determinação de TBARS ( $\mu\text{g/l}$ ), GSH eritrocitária ( $\mu\text{mol/g Hb}$ ), atividade da enzima ALA-D ( $\mu\text{mol PBG/h/l}$ ) e MHb (%) em pacientes e controles, em média $\pm$ desvio padrão.....	79
Tabela 14:	Resultados da Hcy plasmática ( $\mu\text{mol/l}$ ) em pacientes hemodialisados e controles, em média $\pm$ desvio padrão.....	84

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALA - Ácido  $\delta$ -aminolevulínico  
ALA-D – Ácido  $\delta$ -aminolevulínico desidratase  
BHT – Hidróxi-tolueno-butilado  
CAT - Catalase  
DAC – Doença arterial coronariana  
DCVs – Doença cardiovascular  
DNA – Ácido desoxiribonucleico  
DTNB – Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)  
DTT - Ditioneitol  
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético  
EPO- Eritropoetina  
ERNS – Espécies reativas de nitrogênio  
EROS – Espécies reativas de oxigênio  
GSH – Glutathiona reduzida  
GSHPx – Glutathiona peroxidase  
GSSG – Glutathiona oxidada  
 $H_3PO_4$  – Ácido  $\sigma$ -fosfórico  
Hb – Hemoglobina  
HCl – Ácido clorídrico  
Hcy – Homocisteína  
HHcy – Hiper-homocisteinemia  
Ht – Hematócrito  
ICSH – International Committee for Standardization in Haematology  
IRC – Insuficiência Renal Crônica  
 $KH_2PO_4$  – Fosfato de potássio monobásico  
 $K_2HPO_4$  – Fosfato de potássio dibásico  
LDL- Lipoproteína de baixa densidade  
LDLox – Lipoproteína de baixa densidade oxidada  
MDA - Malonildialdeído  
MeOH – Metanol  
MHb – Metemoglobina  
MS – Metionina sintase

NaOH – Hidróxido de sódio

PH – Pacientes hemodialisados

PHT - Paratormônio

RLs – Radicais Livres

rHuEPO – Eritropoetina recombinante humana

SBN – Sociedade Brasileira de Nefrologia

SDS – Dodecil sulfato de sódio

Se – Selênio

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SOD – Superóxido dismutase

TCA – Ácido tricloroacético

TCA-HgCl<sub>2</sub> – Cloreto de mercúrio em TCA

TKF-ALA – Tampão fosfato de potássio com ALA

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRIS – Tris (hidroximetilamino)-metano

TSAT – Saturação de transferrina

## **RESUMO**

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

### **O ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES HEMODIALISADOS E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TERAPÊUTICO**

AUTORA: Gabriela Cristina Schmitt  
ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia Pomblum  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de junho de 2006.

O desequilíbrio entre a formação de espécies oxidantes e a atividade dos antioxidantes é denominado estresse oxidativo e está diretamente relacionado à etiologia e/ou progressão de diversas patologias crônicas, dentre as quais a insuficiência renal crônica, aterosclerose e as doenças cardiovasculares. A insuficiência renal crônica pode ser decorrente de uma série de afecções renais que culminam em perda de funcionalidade dos rins, provocando acúmulo de várias substâncias tóxicas no organismo e diversos distúrbios metabólicos. Pacientes com doença renal crônica submetidos à hemodiálise, cuja principal causa de morbimortalidade são as doenças cardiovasculares, estão constantemente sob estresse oxidativo em virtude da própria condição patológica, mas, sobretudo, pelo tratamento hemodialítico, que provoca aumento na formação de espécies reativas e diminuição dos níveis de antioxidantes. Além disso, estes pacientes também apresentam problemas nutricionais e a presença de outras doenças co-mórbidas como a anemia, hipertensão e diabetes que podem contribuir para o elevado estresse oxidativo, acentuado ainda mais pela hiper-homocisteinemia. Contudo, a influência do tratamento terapêutico sobre o estresse oxidativo permanece controversa. Sendo assim, estudos do estresse oxidativo e sua interrelação com a terapia medicamentosa são muito importantes. O objetivo deste estudo foi determinar quais marcadores do estresse encontram-se alterados nos hemodialisados, bem como a influência de medicamentos como eritropoetina, ferro, vitamina B12 e ácido fólico

sobre estes marcadores, sobre os parâmetros hematológicos e hiper-homocisteinemia. Para tal, foram determinadas as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmáticas, glutathiona reduzida (GSH) intra-eritrocitária, atividade sangüínea da enzima ácido  $\delta$ -aminolevulínico desidratase (ALA-D), metemoglobina (MHb), homocisteína (Hcy), hemoglobina (Hb) e hematócrito (Ht) de 36 pacientes hemodialisados (PH) e 20 indivíduos saudáveis (IS), mediante prévio consentimento. Os prontuários médicos de cada paciente foram utilizados para levantamento de dados adicionais como o tratamento medicamentoso. Os resultados encontrados em PH em relação aos IS demonstraram aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) de TBARS plasmático, GSH intra-eritrocitária, MHb sangüínea e de Hcy plasmática, assim como diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade da enzima ALA-D sangüínea, de Hb e Ht. Dessa forma, ficou evidente a ocorrência de estresse oxidativo, alterações no sistema antioxidante, hiper-homocisteinemia e anemia. Todavia, não foram encontradas diferenças significativas nos marcadores do estresse oxidativo analisados quando relacionados ao uso de medicamentos, presença de co-morbidades, hábitos de vida, tempo de hemodiálise e capacidade de realização de atividades simples. Dessa forma, este trabalho demonstrou que, além de alterações em marcadores do estresse oxidativo como TBARS e GSH, também foram encontradas alterações na atividade da enzima ALA-D e na MHb. Ainda, pôde-se supor que alguns medicamentos como eritropoetina, vitamina B12 e ácido fólico podem estar envolvidos no aumento das concentrações de GSH.

Palavras-chave: estresse oxidativo, insuficiência renal crônica, hemodiálise, anemia, homocisteína

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Post-Graduate Course of Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### **OXIDATIVE STRESS IN HEMODIALIZED PATIENTS AND THE INFLUENCE OF THERAPEUTIC TREATMENT**

Author: Gabriela Cristina Schmitt

Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange Cristina Garcia Pomblum

Place and date of defense: Santa Maria, June 23<sup>th</sup>, 2006.

The imbalance between the oxidant species formation and the activity of antioxidants is known as oxidative stress and it is directly related to the etiology and/or the progression of chronic diseases such as chronic renal failure (CRF), atherosclerosis and cardiovascular diseases. The CRF can be the result of variety renal injuries that lead to toxic substances accumulation and metabolic disturbances in the organism. Patients with chronic renal disease on hemodialysis treatment, whose main cause of morbi-mortality is the cardiovascular diseases, are constantly under oxidative stress by the uremic condition, but overall by the hemodialysis treatment, which leads to an increase of reactive species and decrease of antioxidant defenses. Moreover, these patients also present nutritional problems and presence of other comorbidity diseases as anemia, hypertension and diabetes that can contribute to increase the oxidative stress state, accentuated for the hyperhomocysteinemia. However, the influence of the therapeutical treatment on the oxidative stress has still several controversies. Thus, oxidative stress studies and its relationship with medicaments are very important. The aim of this study was to determine which oxidative stress markers were altered in hemodialysis patients, as well as the influence of erythropoietin, iron, vitamin B12 and folic acid on these markers and in the hematologic parameters and hyperhomocysteinemia. Plasmatic TBARS, erythrocytic GSH, ALA-D enzyme activity, methemoglobin (MHb), homocysteine (Hcy), hemoglobin (Hb) and hematocrit (Ht) of 36 hemodialysis patients (HP) and 20 controls (C) were determined with a prior

consent of all subjects. The personal information of each patient was used for additional data as medicaments treatment. The results found in HP in comparison with the C had significant increase ( $p < 0,05$ ) for TBARS, erythrocytic GSH, Mhb, and Hcy, as well as significant decrease ( $p < 0,05$ ) of ALA-D activity, Hb and Ht. So, it was evident the oxidative stress occur, alterations in antioxidants defense, hyperhomocysteinemia and anemia. However, significant differences in the oxidative stress markers had not been found when they were related to the use of medicaments, co-morbidities presence, life style, time of hemodialysis and accomplishment of simple activities. Thus, this work demonstrated that beyond alterations in oxidative stress markers as TBARS and GSH, it was also found alterations in the ALA-D enzyme activity and in the Mhb. Moreover, it was possible to observe that some medicaments as erythropoietin, vitamin B12 and folic acid can be involved in the increase of GSH levels.

Key-words: oxidative stress, chronic renal failure, hemodialysis, anemia, homocysteine.

## **1. INTRODUÇÃO**

Moléculas e átomos que contenham um ou mais elétrons não pareados em sua órbita, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres. Eles são quimicamente muito reativos, com alto poder oxidante, devido a sua configuração eletrônica.

Essas moléculas são essenciais para manutenção de várias funções fisiológicas, mas, quando presentes em altas concentrações, podem induzir danos em diversas biomoléculas como lipídios poliinsaturados, carboidratos, aminoácidos e ácidos nucléicos, com comprometimento ou perda de suas funções, por provocarem sua oxidação.

Para contrabalançar os efeitos oxidantes, o organismo conta com os chamados antioxidantes, que são moléculas de origem endógena ou exógena cuja função é limitar os níveis intracelulares de radicais, impedindo ou reduzindo seus efeitos deletérios.

Entretanto, quando há um desequilíbrio entre os níveis de pró-oxidantes e antioxidantes no organismo, em decorrência da excessiva produção de oxidantes, depleção de antioxidantes ou associação destes dois fatores, ocorre o estresse oxidativo. Uma das suas principais conseqüências é a peroxidação lipídica, que leva a diversos danos celulares e teciduais.

Várias evidências sugerem que o estresse oxidativo está diretamente relacionado à etiologia ou progressão de diversas patologias crônicas, dentre as quais a insuficiência renal crônica (IRC). Esta é originada por diversos tipos de injúrias renais que provocam a perda de funcionalidade dos rins, ocorrendo o acúmulo de várias substâncias no organismo. Com isso, é necessário um tratamento de substituição às funções renais, a hemodiálise, que consiste em um procedimento de filtração extracorpórea do sangue com o objetivo de retirar impurezas e substâncias tóxicas do organismo.

Embora a hemodiálise seja a forma mais viável de aumentar a sobrevivência dos pacientes, ela é responsável pelo aumento do estresse oxidativo, pois durante o procedimento dialítico ocorre, simultaneamente, a geração de uma grande quantidade de espécies reativas, pela interação do sangue com a membrana dialisadora, e perda de antioxidantes pela solubilidade destes no dialisado.

Além disso, fatores como a uremia, problemas nutricionais e a presença de outras doenças co-mórbidas como a anemia, hipertensão e diabetes podem contri-

buir para o elevado estresse oxidativo, ainda acentuado pela hiper-homocisteinemia presente em muitos portadores de IRC.

Desta forma, os danos oxidativos induzidos pela condição de estresse na IRC têm sido relacionados a etiopatogênese ou progressão de outros processos, dentre eles a aterosclerose, as doenças cardiovasculares, o diabetes mellitus, as desordens neurodegenerativas e o câncer. Sabe-se que as doenças cardiovasculares são as principais causas de morbi-mortalidade nos pacientes portadores de IRC, pois apresentam uma incidência 3 vezes maior de doenças cardiovasculares se comparados a indivíduos da mesma idade e sexo da população em geral.

A influência da terapia medicamentosa sobre o estresse oxidativo nestes pacientes continua controversa. Existem relatos que indicam tanto o aumento como a diminuição do estresse oxidativo com a utilização de eritropoetina, bem como resultados contraditórios em relação à influência da utilização do ferro, vitamina B12 e ácido fólico sobre os marcadores do estresse, sendo que os dois últimos medicamentos também estão envolvidos na homocisteinemia.

Assim, estudos que contribuam para um melhor entendimento dos fenômenos fisiopatológicos e bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo em IRC submetidos à hemodiálise e sua possível interrelação com o tratamento terapêutico são muito importantes.

Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar alguns marcadores sanguíneos do estresse oxidativo nos portadores de IRC submetidos à hemodiálise e sua possível correlação com o tratamento medicamentoso, sobretudo com eritropoetina, ferro e suplementação com ácido fólico e vitamina B12, bem como analisar os índices hematológicos dos pacientes para verificar a percentagem de pacientes anêmicos, relacionando os resultados à terapia com eritropoetina, ferro, vitamina B12 e ácido fólico. E verificar, ainda, se a hiper-homocisteinemia nos pacientes hemodialisados se correlaciona com a percentagem de pacientes sob terapia de suplementação vitamínica e a outros marcadores do estresse oxidativo.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes no organismo, causado pela excessiva produção de oxidantes ou depleção dos níveis de antioxidantes (Sies, 1986; McGrath et al., 1995; Descamps-Latscha et al., 2001; Morena et al., 2002).

### 2.1.1 Oxidantes

Os oxidantes são substâncias capazes de reagir rapidamente com diversos compostos e alvos celulares, provocando danos a proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. Os radicais livres (RLs) são agentes oxidantes caracterizados como espécies atômicas ou moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, tornando-as espécies altamente reativas, que agem como eletrófilos (Gillham et al., 1997).

Os RLs se formam normalmente no organismo através da cadeia de transporte de elétrons a nível mitocondrial, bem como da oxidação de ácidos graxos, reações do citocromo P<sub>450</sub> e de células fagocíticas. Algumas enzimas também são capazes de gerar RLs, sob condições normais ou patológicas. Fontes exógenas como tabaco, radiações, luz ultravioleta, solventes e alguns fármacos, dentre outros, também geram RLs (Biesalski, 2002).

Eles possuem importante papel fisiológico na regulação da resposta imunológica, participando do processo fagocítico de defesa contra infecções e atuando como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose (Halliwell, 1994; Biesalski, 2002).

Dentre os oxidantes mais importantes envolvidos em processos patológicos estão as espécies reativas de oxigênio (EROS) e as de nitrogênio (ERNS). As principais EROS distribuem-se em dois grupos, os radicalares: superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), peroxila ( $ROO^{\bullet}$ ) e alcóxila ( $RO^{\bullet}$ ); e os não-radicalares: oxigênio singlete ( $O_2^{\bullet}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso. Dentre as ERNS incluem-se o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), o óxido nitroso e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), dentre outros (Halliwell, 1994; Gillham et al., 1997; Sies, 1997).

## 2.1.2 Antioxidantes

O organismo dispõe de mecanismos de defesa responsáveis pela proteção dos sistemas biológicos suscetíveis ao ataque oxidativo, os chamados antioxidantes, que atuam impedindo a formação ou prevenindo o ataque dos radicais a seus alvos biológicos (Mafrá et al., 1999).

Eles podem ser de origem endógena ou exógena. Dentre os endógenos incluem-se a glutathiona reduzida (GSH) e as enzimas glutathiona peroxidase (GSHPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Os antioxidantes exógenos provêm da dieta e incluem as vitaminas A, C e E (Sies, 1993; Sies, 1997; Clark, 2002).

### 2.1.2.1 Antioxidantes endógenos

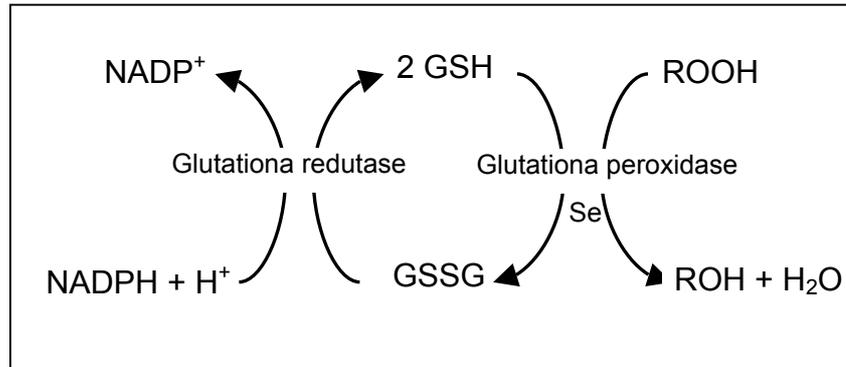
#### *Glutathiona reduzida (GSH)*

A GSH é o principal antioxidante endógeno e pode ser encontrada em vários tecidos biológicos. No sangue, 99,5 % da GSH é intra-eritrocitária, sendo uma pequena porção associada à membrana. Dentre outras funções fisiológicas, ela é seqüestradora de radicais livres (Nozal et al., 1997), detoxificando metabólitos eletrofílicos, não somente como doador imediato de elétrons para neutralizar o  $H_2O_2$  e lipoperóxidos, mas também como um seqüestrador de RLs de oxigênio e nitrogênio (Leichtweis e Ji, 2001).

#### *Glutathiona Peroxidase (GSHPx)*

Outra enzima importante no controle dos peróxidos é a GSHPx, que catalisa a redução do  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos a seus álcoois correspondentes às custas da conversão de GSH em glutathiona oxidada (GSSG), dependendo essencialmente da presença de selênio. Posteriormente, a enzima glutathiona redutase converte a GSSG novamente em GSH na presença de NADPH, regenerando-a para exercer sua função antioxidante (Shan et al., 1990).

A figura 1 apresenta, de modo geral, um esquema do sistema antioxidante da glutathiona e suas enzimas envolvidas.



**Figura 1. Sistema antioxidante da glutatona (Sies et al., 1972).**

### *Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT)*

As células aeróbias são protegidas da ação do  $O_2^{\bullet-}$  e do  $H_2O_2$  pela ação das enzimas SOD e CAT, que convertem o  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  e, posteriormente, o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , respectivamente. O cobre (Cu) e o zinco (Zn) são componentes essenciais da SOD citoplasmática, enquanto que o manganês (Mn) é fundamental para SOD mitocondrial. Já a CAT é dependente de ferro (Gillham et al., 1997, Sies, 1997).

A seguir, no esquema 1, estão representadas as reações envolvendo as enzimas SOD e CAT:

Esquema 1:



#### 2.1.2.2 Antioxidantes exógenos

##### *Vitamina A*

Vitamina A é uma expressão genérica empregada para se referir ao retinol e todos os carotenóides dietéticos que têm atividade biológica de transretinol. Dentre

os carotenóides mais importantes estão o  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, licopeno e luteína. Os carotenóides são seqüestradores do oxigênio. Uma única molécula de retinol ou  $\beta$ -caroteno é capaz de inativar vários radicais oxigênio singlete antes de ser destruída. O  $\beta$ -caroteno também protege do radical peroxila, especialmente em condições de baixa tensão de oxigênio (Gomes et al., 2005).

#### *Vitamina C (Ácido ascórbico)*

A vitamina C combate diretamente RLs de oxigênio e do óxido nítrico e está envolvida na regeneração de  $\alpha$ -tocoferil em  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (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 radicais  $\text{OH}^\bullet$  (Chan, 1993).

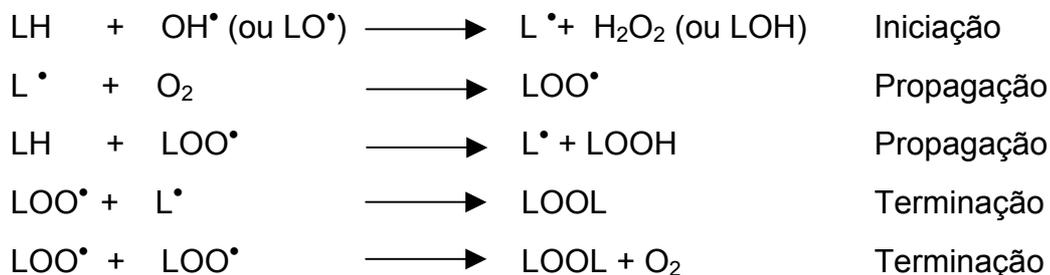
#### *Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)*

A vitamina E tem efeito modulador sobre as respostas inflamatória e imune. Em geral, sua deficiência aumenta os componentes da resposta inflamatória e prejudica a imunidade celular e humoral. Ela converte radicais hidroxila e superóxido em formas menos ativas e pode ser regenerada por mecanismos não enzimáticos, pelo ascorbato, e por mecanismos enzimáticos, pela GSH. Como possui alta lipossolubilidade, distribui-se pelas membranas lipídicas, constituindo-se na principal defesa das mesmas contra as lesões oxidativas (Chan, 1993).

### 2.1.3 Peroxidação lipídica

As membranas das células e organelas contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados e sua fluidez relaciona-se à presença de cadeias insaturadas de fosfolipídios e colesterol. Danos nesta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana. O ataque de algumas espécies reativas aos lipídios das membranas desencadeia um processo chamado peroxidação lipídica, uma das principais conseqüências do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1991).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação, representadas a seguir (Gardès-Albert, 1991 apud Ferreira e Matsubara, 1997):



A reação acima se inicia com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo OH<sup>•</sup> ou pelo LO<sup>•</sup> (radical lipídico alcoxila), com conseqüente formação de L<sup>•</sup> (radical lipídico), que é instável. Na primeira equação de propagação, o L<sup>•</sup> reage rapidamente com o O<sub>2</sub> resultando em LOO<sup>•</sup> (radical lipídico peroxila), que por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o L<sup>•</sup> na segunda equação de propagação. O término da peroxidação lipídica ocorre quando os radicais L<sup>•</sup> e LOO<sup>•</sup>, produzidos nas etapas anteriores, propagam-se até destruírem a si próprios (Gardès-Albert, 1991 apud Ferreira e Matsubara, 1997).

A peroxidação lipídica pode ser catalisada por íons ferro, através da conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos, que iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação (Ferreira e Matsubara, 1997).

O contínuo dano oxidativo leva a destruição de membranas e, por conseqüência, a morte celular. Há perda da seletividade na troca iônica, inativação de enzimas e proteínas de transporte da membrana, liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, como o malonildialdeído, um aldeído com ação tóxica em várias biomoléculas (Hershko, 1989).

A formação de malonildialdeído (MDA) ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (Bonnes e Guérin, 1992).

Assim como na formação de RLs e espécies reativas, a peroxidação lipídica pode ser um processo fisiológico nem sempre prejudicial, capaz de induzir a morte celular. Ela participa da resposta inflamatória liberando ácido araquidônico e, subsequentemente, prostaglandinas e distintos endoperóxidos (Jamieson, 1989). Todavia, a excessiva liberação destes produtos durante o dano oxidativo pode causar edema celular, modificações na permeabilidade vascular e quimiotaxia e danos teciduais (Blake et al., 1987), implicando, por exemplo, na patogênese da aterosclerose (Parthasarathy, 1987; Vagimigli et al., 2003).

## **2.2 Estresse oxidativo e hemodiálise**

O estresse oxidativo tem sido indicado como um importante fator relacionado a várias condições associadas, com frequência, à doença renal em estágio final, incluindo doenças cardiovasculares e infecciosas, anemia, diabetes, distúrbios do sistema nervoso central e periférico, câncer e acelerado envelhecimento (Halliwell, 1994; Hasselwander e Young, 1998; Tetta et al., 1999).

Apesar do tratamento de hemodiálise possibilitar um aumento na sobrevivência de pacientes com insuficiência renal crônica (Drai et al., 2001), este procedimento é responsável pela geração de uma grande quantidade de EROS/ERNS, bem como pela perda de antioxidantes hidrossolúveis e anormalidades no metabolismo de lipídios, contribuindo diretamente para o aumento do estresse oxidativo nestes pacientes, somado a outros fatores como o próprio estado urêmico, que resulta em acúmulo de toxinas no sangue (Drai et al., 2001; Morena et al., 2002).

### **2.2.1 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 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> de superfície corporal por três ou mais meses consecutivos. Este é estimado por meio da depuração da creatinina e o valor normal gira em torno de 110 a 120 ml/min/1,73

m<sup>2</sup> de superfície corporal. O grau da IRC varia de acordo com o índice de filtração glomerular e valores abaixo de 15 ml/min/1,73m<sup>2</sup> já indicam a falência renal (Draibe e Cendoroglo, 2004).

Várias patologias podem originar a IRC e dentre as mais comuns estão à 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, a deficiência imunológica, a tendência a hemorragias, as desordens no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas e vários distúrbios resultantes do acúmulo de toxinas normalmente excretadas pela urina, a chamada síndrome urêmica (Bergström, 1997 apud 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 por transplante renal. Embora o transplante renal seja o tratamento de escolha, há dificuldade para se obter número suficiente de doadores compatíveis para suprir a demanda necessária. Sendo assim, os tratamentos dialíticos continuam sendo a opção mais viável na IRC (Mallick e Gokal, 1999).

### 2.2.2 Hemodiálise

A hemodiálise é um procedimento utilizado para filtração do sangue, por meio de seu bombeamento até um aparelho contendo membranas semipermeáveis, para retirada de impurezas e substâncias tóxicas do organismo. Em seguida, o sangue retorna purificado ao indivíduo (Mallick 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. De acordo com o coeficiente de ultrafiltração da membrana dialisadora utilizada é possível prever o volume de líquido a ser removido por hora de diálise, mas normalmente são utilizadas membranas que resultam em filtrações de 1 l/h (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).

As células sangüíneas e as proteínas maiores são muito grandes para serem filtradas através dos pequenos poros da membrana e permanecem no sangue (Curtis, 1997; Mallik e Gokal, 1999).

Existem diversos tipos de membranas dialisadoras, incluindo as derivadas da celulose (cuprofano, acetato de celulose, hemofan, di e triacetato de celulose) e as membranas de polímeros sintéticos (polissulfona, poliamida, poliacrilonitrila-metalil-sulfonato, policarbonato, polimetilmetacrilato e polietileno-polivinil-álcool) (Varela Lema e Ruano Raviña, 2005).

Geralmente, o paciente é submetido a três seções semanais, com duração de 4 horas cada. Durante o procedimento utiliza-se heparina, de forma intermitente ou infundida continuamente, a fim de evitar a coagulação do sangue no interior do dialisador (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 (Mircescu et al., 2005).

Durante a hemodiálise há uma grande produção de EROS/ERNS, provocando aumento do estresse oxidativo e subsequente peroxidação lipídica (Nguyen-Khoa et al., 2001), sendo que vários fatores estão envolvidos. Dentre eles, destacam-se o procedimento dialítico, incluindo a bioincompatibilidade da membrana e a perda de antioxidantes durante o procedimento (Morena et al., 2000), a possível contaminação do dialisado por endotoxinas (Morena et al., 2002) e o próprio estado urêmico em si, pelo acúmulo de vários solutos no organismo do paciente (Himmelfarb et al., 2002).

A interação do sangue com materiais não biológicos no circuito extracorpóreo durante a hemodiálise leva a ativação de vários sistemas celulares e não celulares, incluindo o sistema de complemento e de coagulação, além de ativar leucócitos polimorfonucleares (PMN), monócitos, linfócitos e plaquetas (Holmes, 1995).

A ativação dos PMN pode ser induzida por vários estímulos e aumenta à atividade secretora, resultando em uma massiva produção de enzimas proteolíticas e RLs de oxigênio (Lucchi et al., 2000). A ativação de leucócitos também promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  e as interleucinas (Descamps-Latscha et al., 1991).

As substâncias liberadas estão diretamente envolvidas na resposta inflamatória e na destruição de agentes estranhos ao organismo. No entanto, quando liberadas em grandes quantidades podem atingir células e tecidos vizinhos e desencadear processos inflamatórios que provocam diversos danos (Lucchi et al., 2000). Esta situação ocorre durante a hemodiálise e a intensidade da resposta inflamatória pode variar de acordo com a membrana dialítica utilizada (Lucchi et al., 1989).

As plaquetas, também ativadas no processo de hemodiálise, liberam fatores de agregação plaquetária que ativam a cascata de coagulação e acabam estimulando a formação de trombos. Há também um aumento na liberação de substâncias produzidas pelas células endoteliais, contribuindo para o desequilíbrio da homeostase vascular (Nurmohamed e Nubé, 2005).

#### 2.2.2.1 Perdas nutricionais pela hemodiálise

Além de produtos indesejáveis ao organismo, outros solutos e substâncias importantes atravessam a membrana, incluindo as que desempenham papel antioxi-

dante. Esta perda parece estar ligada a hidrossolubilidade e ao baixo peso molecular da maioria destas moléculas (Bohm et al., 1997).

A perda de antioxidantes hidrofílicos como a vitamina C e elementos traço provoca anormalidades nas vias de antioxidantes enzimáticos, bem como na atuação de antioxidantes hidrofóbicos como a vitamina E, que essencialmente requer a participação da vitamina C em sua ação (Galli et al., 1999).

A perda de antioxidantes associada ao aumento da produção de EROS/ERNS, decorrente da condição urêmica e da própria hemodiálise, leva ao aumento do estresse oxidativo nestes pacientes (Morena et al., 2002).

## **2.3 Principais complicações decorrentes da IRC e a terapia medicamentosa**

### **2.3.1 Doenças cardiovasculares**

As doenças cardiovasculares (DCVs), cuja principal etiologia é a aterosclerose, são as causas mais comuns de morbi-mortalidade nos pacientes com IRC (Brown et al., 1994). Tanto registros americanos como europeus indicam que cerca de 50% da mortalidade destes pacientes se deve a eventos cardiovasculares (Rostand et al., 1991; Raine et al., 1992).

Jungers et al. (1999) demonstraram que a incidência de acidentes cardiovasculares ateroscleróticos é pelo menos 3 vezes maior em pacientes com IRC quando comparados a indivíduos da mesma idade e sexo da população geral.

#### **2.3.1.1 Aterosclerose**

A aterosclerose é um processo complexo, crônico, multifatorial que se inicia com danos as células endoteliais e culmina na formação de lesões estratificadas na parede arterial. Infiltrações sub-endoteliais de monócitos, proliferação e migração de células musculares lisas, depósito de colesterol e elaboração de matriz extracelular são características de lesões ateroscleróticas (Koning et al., 2003).

As células endoteliais, situadas entre o sangue circulante e a parede dos vasos, funcionam como sensores e tradutores de sinais desta interface e são fundamentais na manutenção da homeostase vascular através da produção de fatores que regulam o tônus vascular, o processo de coagulação, o transporte de lipídios, a

resposta celular proliferativa e o deslocamento de leucócitos (Ross, 1993; Cines et al., 1998).

Evidências crescentes sugerem que vários estímulos pró-aterogênicos como dislipidemias, hiperglicemia, hipertensão, hiper-homocisteinemia, reações inflamatórias vasculares, tabagismo e estresse mecânico levam ao aumento da produção de EROS no endotélio, provocando sua disfunção. O estresse oxidativo resultante ocupa um papel importante como mediador em manifestações patológicas da disfunção endotelial associada com aterosclerose (Ross, 1999).

Aumentos de EROS podem afetar quatro mecanismos fundamentais que contribuem para a aterosclerose: disfunção das células endoteliais, crescimento das células da musculatura vascular lisa, migração de monócitos e oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Alexander, 1995; Berliner e Heinecke, 1996).

Os monócitos migram da corrente sangüínea, se diferenciam em macrófagos e englobam o LDL oxidado (LDLox), adquirindo um aspecto espumoso. Estas células tornam-se ativadas e liberam uma série de substâncias pró-inflamatórias, conduzindo a um estado de inflamação crônica. São liberadas citocinas e quimiocinas que promovem a expressão de moléculas que facilitam a adesão e atraem células de resposta inflamatória e imune como leucócitos, monócitos e linfócitos T e B, principalmente em regiões de fluxo sangüíneo conturbado. Os leucócitos, atraídos pelas moléculas expressas, vão se deslocando do centro da corrente sangüínea e passam a deslizar mais lentamente pela superfície das células endoteliais, aderindo-se à parede dos vasos. Células da musculatura lisa vascular são estimuladas a proliferar e secretam colágeno (Scott, 2004). Além disso, o LDLox inativa diretamente o óxido nítrico, é citotóxico para células endoteliais (Chin et al., 1992) e diminui a atividade do plasminogênio tecidual (Berliner e Heinecke, 1996).

Como conseqüência da proliferação e deposição celular nos vasos, formam-se placas chamadas de ateromas que se desenvolvem de maneira descontínua, acumulando também outros materiais circulantes como lipídios, plaquetas, restos de células mortas e colágeno. O crescimento da placa aterosclerótica acarreta estreitamento progressivo do lúmen vascular, prejudicando o fluxo sangüíneo. Estas placas podem, ainda, se desprender e serem deslocadas pelo fluxo sangüíneo até vasos de menor calibre onde acabam obstruindo totalmente o fluxo, provocando eventos isquêmicos teciduais (Koning et al., 2003; Scott, 2004).

O óxido nítrico, um vasodilatador endógeno, é uma molécula que pode atuar como pró-oxidante ou antioxidante. Suas funções fisiológicas incluem o controle do tônus vascular, inibição da ativação plaquetária, modulação da apoptose e agregação de células inflamatórias. No entanto, ele também pode reagir com o  $O_2^{\bullet-}$  formando  $ONOO^-$ , que é altamente citotóxico. O dano no endotélio vascular é sempre seguido de vasoconstrição, agregação plaquetária e adesão de células inflamatórias, que levam a um aumento na produção de  $NO^{\bullet}$  e, conseqüentemente, formação de  $ONOO^-$  (Shaw et al., 2005).

### 2.3.1.2 Hiper-homocisteinemia

A concentração plasmática ou sérica total de homocisteína (Hcy) situa-se em torno de 5-15  $\mu\text{mol/l}$  em adultos. Concentrações de Hcy superiores a 15  $\mu\text{mol/l}$  caracterizam a hiper-homocisteinemia (HHcy), que pode ser classificada como moderada (16-30  $\mu\text{mol/l}$ ), intermediária (31-100  $\mu\text{mol/l}$ ) ou severa (>100  $\mu\text{mol/l}$ ) (Kang et al., 1992; Hankey e Eikelboom, 1999). Mas, segundo Lee et al. (1999) concentrações de Hcy maiores que 13,9  $\mu\text{mol/l}$  já caracterizam a HHcy.

A HHcy é um fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose tanto na população em geral quanto em pacientes submetidos a hemodiálise (Korzets et al., 2000). Estudos têm sugerido que ela está associada a aumentos nos índices de doença arterial coronariana, derrame cerebral, doenças vasculares oclusivas e trombose venosa profunda (Stampher et al., 1992; Perry et al., 1995; den Heijer et al., 1998a; Stein e McBride, 1998; Tayler et al., 1999).

O mecanismo pelo qual a HHcy predispõe à aterosclerose ainda não está completamente definido. Uma das hipóteses é que podem ocorrer danos nas paredes dos vasos sangüíneos, provavelmente pela geração de radicais livres a partir da oxidação da Hcy (Velury e Howell, 1988). No plasma, ela rapidamente se auto-oxida, formando homocistina, dissulfetos mistos e homocisteína tiolactona (Velury e Howell, 1988; Anderson et al., 1993, Loscalzo, 1996), produzindo potentes espécies reativas de oxigênio que incluem o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio o radical hidroxila. Os efeitos oxidativos das substâncias formadas podem aumentar a oxidação da LDL, causando agregação e aumento da captação de LDL pelos macrófagos, explicando a deposição lipídica nas placas ateromatosas (McCully, 1993).

Acredita-se, também, que o estresse oxidativo gerado pela HHcy decorra da diminuição intracelular da expressão e atividade da GSHPx e da inibição da SOD, dificultando a defesa celular contra os radicais livres (Splaver et al., 2004).

Além disso, sabe-se que a Hcy provoca lesões diretas às células endoteliais da parede arterial com estímulo da resposta de macrófagos e aceleração da aterosclerose. Ela também promove alterações no fenótipo antitrombótico normal do endotélio por agir de diversas formas: inibe a síntese de elementos fundamentais para atividade anticoagulante como o heparan sulfato e trombosmodulina pelas células endoteliais (Nishinaga et al., 1993), diminui a atividade tecidual do plasminogênio, diminui a síntese de células endoteliais pelo estímulo à proliferação das células musculares lisas da parede arterial, inibe a antitrombina III, reduz a ativação da proteína C (Rodgers e Conn, 1990), estimula a expressão do fator V, fator tissular e tromboxanos (Fryer et al., 1993) e inibe a liberação de óxido nítrico como fator de relaxamento e antiagregante plaquetário da parede vascular (McCully, 1993; Biasioli e Schiavon, 2000; Djurie et al., 2000).

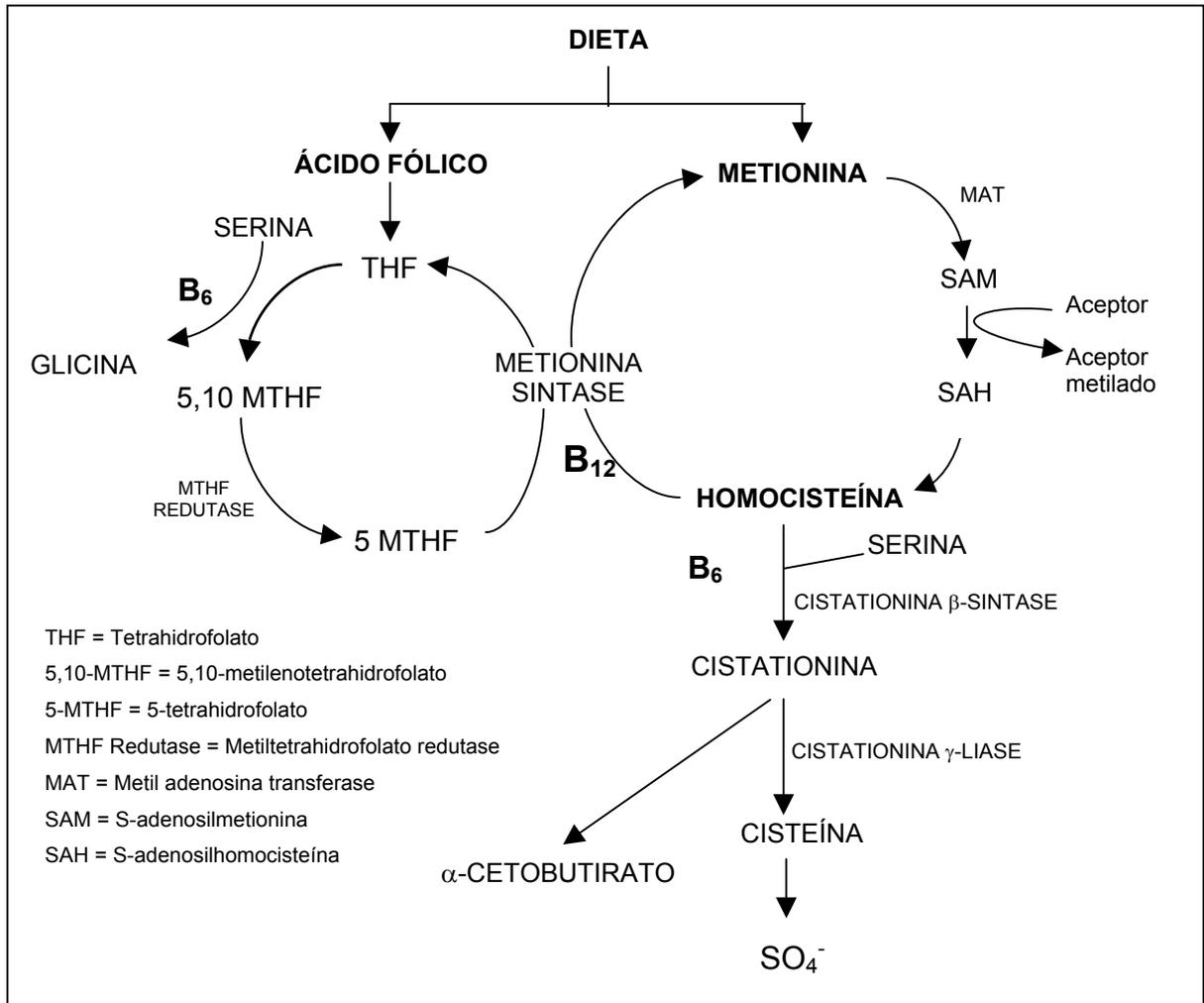
Portanto, os efeitos prejudiciais da HHcy são mediados por suas propriedades aterogênicas e trombogênicas, pré-dispondo a ocorrência de eventos oclusivos coronarianos, cerebrais e periféricos (Biasioli e Schiavon, 2000).

Os níveis sanguíneos de Hcy podem se elevar de 2 a 4 vezes nos pacientes com IRC sob hemodiálise, correlacionando-se com as concentrações séricas de índices de função renal como creatinina e albumina (Kronenberg, 1998).

A explicação fisiopatológica para a ocorrência de HHcy na IRC não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que esteja relacionada à deficiente eliminação renal da Hcy e pela alteração no metabolismo deste aminoácido nas células renais (Van Guldener et al., 2001). Soma-se a isso as deficiências de vitaminas envolvidas no metabolismo da Hcy, como as vitaminas B6, B12 e o ácido fólico. O déficit nutricional dos pacientes, assim como às perdas vitamínicas impostas pelo tratamento dialítico exercem influência direta na concentração destas vitaminas, e, conseqüentemente, nos níveis plasmáticos de Hcy (Nasri e Baradan, 2005).

A homocisteína é um aminoácido formado durante o metabolismo do aminoácido metionina (Finkelstein e Martin, 2000). Possui papel importante dentro das matrizes fisiológicas, mas não é utilizado pelo organismo na constituição protéica (Nekrassova et al., 2003).

O metabolismo da homocisteína é representado a seguir, na figura 2.



**Figura 2 – Principais vias do metabolismo da homocisteína.**

A metionina, através de condensação com ATP via metionina adenosiltransferase, é convertida a S-adenosilmetionina (SAM), desmetilada à S-adenosilhomocisteína (SAH), que através de hidrólise libera adenosina e forma Hcy (Langman e Cole, 1999).

Uma vez formada, a Hcy pode ser metabolizada de duas maneiras: formando metionina pelo ciclo da remetilação ou degradada a cisteína pela via de transsulfuração (Fowler, 1997).

No ciclo da remetilação, a Hcy pode ser regenerada a metionina através de duas reações diferentes. No fígado e rins, parte da Hcy é remetilada pela betaína homocisteína metiltransferase, usando betaína como doadora de grupo metila (Fowler, 1997). Mas na maioria dos outros tecidos ela é regenerada pela ação da enzima metiltetrahidrofolato homocisteína metiltransferase, também denominada

metionina sintase (MS) (Miner et al., 1997; Langman e Cole, 1999). Nesta via há participação de cofatores derivados do complexo vitamínico B, como folatos e vitamina B<sub>12</sub>. O ácido fólico, proveniente da dieta, serve como substrato no ciclo da remetilização. A MS - dependente da vitamina B<sub>12</sub> - catalisa a aquisição de um grupo metila do 5-metiltetrahidrofolato, convertendo-o a tetrahidrofolato, que se condensa com a serina para formar 5,10-metiltetrahidrofolato e glicina. A 5,10-metiltetrahidrofolato redutase converte o 5,10-metiltetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato para completar o ciclo (Welch e Loscalzo, 1998).

Quando a via da remetilização está saturada ou quando a cisteína é necessária, a Hcy seguirá a via de transulfuração onde é irreversivelmente catabolizada. Ela se condensa com a serina formando cistationina em uma reação catalisada pela enzima cistationina-β-sintase utilizando vitamina B<sub>6</sub> como co-fator. A cistationina é subsequentemente hidrolisada via cistationina-γ-liase formando α-cetobutirato e cisteína (Miner et al., 1997). A cisteína é utilizada como precursora da GSH, principal antioxidante multifuncional do organismo, na síntese de proteínas ou metabolizada a sulfato, sendo excretada pela urina (Welch e Loscalzo, 1998).

Se alguma destas vias metabólicas sofrer bloqueio, total ou parcial, há aumento da concentração sanguínea de Hcy, já que este aminoácido não se acumula nas células (Harboe-Gonçalves et al., 2005).

### 2.3.2 Anemia

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a anemia é definida como a diminuição da concentração de hemoglobina circulante a níveis inferiores a 13 g/dl para homens adultos, 12 g/dl para mulheres adultas e de 11 g/dl para gestantes e crianças de seis meses a seis anos (Failace, 2003). É uma alteração muito comum na doença renal crônica, afetando até 90% dos pacientes e um significativo determinante de seu prognóstico e qualidade de vida (Nasri e Baradaran, 2005).

A associação entre anemia e IRC tem sido reconhecida desde o início do século 19 e desde então muito estudada para o melhor entendimento dos aspectos desta complicação urêmica, incluindo causas, conseqüências e tratamentos (Higgins et al., 1977).

As principais conseqüências da anemia renal incluem anormalidades fisiológicas como redução do volume de oxigênio sanguíneo e da tensão do oxigênio

tecidual, levando a sintomas como fadiga, diminuição da capacidade de exercício, redução cognitiva, disfunção sexual e prejuízos no sistema imunológico (Eckardt, 2001).

A diminuição da síntese de eritropoetina (EPO) é o principal mecanismo envolvido na anemia da IRC. A EPO é uma glicoproteína produzida principalmente nos rins, indispensável para a proliferação e diferenciação das células progênitoras e precursoras eritróides (Krantz, 1991).

Entretanto, outros fatores também contribuem para ocorrência da anemia: deficiências de ferro, vitamina B12 e ácido fólico, diminuição do tempo de vida dos eritrócitos, estado inflamatório, toxicidade provocada pelo acúmulo de alumínio e outros metais e o hiperparatireoidismo (Eschbach, 1989; Abensur, 2004).

Outro fator contribuinte, segundo Nasri e Baradan (2005) é a hiper-homocisteinemia. Eles demonstraram haver uma correlação positiva entre os níveis de Hcy e anemia, sugerindo que a HHcy possa intensificar a anemia através dos danos endoteliais que provoca, criando um estado inflamatório com subsequente liberação de diversas citocinas que possuem um efeito supressor sobre a eritropoiese.

A anemia também pode estar relacionada ao estresse oxidativo, pois o ambiente mais oxidante favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas contendo grupamentos tiól (-SH). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções. Esta oxidação é reversível as custas da ação de compostos antioxidantes, como a GSH. A membrana do eritrócito contém grande número de grupos -SH que podem ser oxidados a dissulfetos (de R-SH a R-SSG), levando à desnaturação das proteínas da membrana (Gilbert e Mc Lean, 1990). Neste processo pode ocorrer lesão intracelular, com oxidação da hemoglobina (Hb) a metemoglobina (MHb), que precipita e forma os corpúsculos de Heinz. O componente lipídico da membrana eritrocitária também está sujeito à agressão oxidativa (Rice-Evans e Baysal, 1987; Winterbourn, 1990).

Assim, a associação dos fenômenos da lipoperoxidação, formação de corpúsculos de Heinz e oxidação dos grupos -SH poderão promover a lesão da membrana do eritrócito (Ferreira e Matsubara, 1997), levando a um aumento da rigidez e deformidade destes, o que os torna mais suscetíveis à hemólise (Ongajooth et al., 1996).

A  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D), também chamada de ácido delta aminolevulínico desidratase, é uma enzima diretamente envolvida na síntese do heme, o principal constituinte da hemoglobina. A diminuição da atividade desta pode

provocar distúrbios na síntese da hemoglobina, provocando quadros de anemia. Estudos demonstram a diminuição da atividade desta enzima em pacientes com IRC, especialmente aqueles sob tratamento hemodialítico (Buchet et al., 1987; Djordjevic et al., 1991; Fontanellas et al., 1996). A inibição pode ser induzida por diversos fatores, incluindo metais como chumbo (Guolo et al., 1995) e alumínio (Schetinger et al., 1999) ou ainda por outras substâncias que possam levar a sua oxidação, pois ela possui grupamentos sulfidrílicos ativos (-SH) altamente sensíveis a eventos pró-oxidantes (Gabriel et al., 2005).

Dados da literatura mostram que o aumento dos níveis de hemoglobina e/ou sua normalização traz muitos benefícios aos pacientes hemodialisados, aumentando a qualidade de vida, reduzindo assim as internações hospitalares e a mortalidade (Sunder-Plassmann e Hörl, 2001).

#### 2.3.2.1 Terapia com eritropoetina e ferro

A terapia com eritropoetina humana recombinante (rHuEPO) tem sido um grande avanço no tratamento da anemia de pacientes mantidos sob hemodiálise (Lim et al., 1999). Entretanto, sua efetividade depende de um adequado suporte de ferro, ácido fólico e vitamina B12, que são elementos diretamente envolvidos na eritropoiese. Segundo Lash e Smith (1990) a terapia utilizando apenas rHuEPO pode levar a uma depleção dos estoques de ferro e de ácido fólico. A hiporesponsividade a terapia com rHuEPO também tem sido atribuída aos altos níveis de paratormônio, embora este fato permaneça controverso (Deicher et al., 2004).

A maioria dos pacientes recebe terapia oral ou intravenosa com ferro, de acordo com o grau de deficiência deste elemento. Estudos clínicos demonstraram que o tratamento intensivo intravenoso de ferro não só melhora a eritropoiese, mas também resulta em uma grande redução (em torno de 41%) na demanda de EPO previamente requerida (Fishbane et al., 1995; Sepandj et al., 1996). Este fato promove uma significativa redução de custos na terapia (Sepandj et al., 1996; Sunder-Plassmann e Hörl, 2001) e também traz benefícios diretos ao paciente, pois a EPO, por ação direta, estimula a proliferação de células endoteliais e o aumento da agregação plaquetária, aumentando a pré-disposição a eventos trombóticos e hipertensão (Korzetz et al., 2000).

Contudo, não há um consenso no que diz respeito à dose máxima segura para terapia intravenosa com ferro. Como ele participa da reação de Fenton e leva a formação de radicais hidroxila e outros radicais orgânicos, pode mediar a ocorrência de estresse oxidativo nas células (Stadtman, 1990; Goldstein et al., 1993).

Segundo Cristol et al. (1997) a utilização de vitamina E também poderia contribuir para uma redução na demanda de EPO, além de possuir efeitos protetores diretos contra EROS, sendo de grande valia na prevenção de eventuais efeitos danosos da terapia com ferro.

A vitamina C é capaz de aumentar a absorção intestinal de ferro e a mobilização do ferro estocado para sua utilização na eritropoiese, ajudando a aumentar os níveis de hemoglobina e, permitindo assim, uma diminuição das doses de rHuEPO (Deicher et al., 2004). Além disso, estudos mostraram que a administração intravenosa de vitamina C pode melhorar a resposta ou até mesmo a resistência a terapia com rHuEPO apresentada por alguns pacientes com deficiência de ferro (Sunder-Plassmann e Hörl, 2001).

### 2.3.3 Hipertensão

A hipertensão arterial é comum entre os indivíduos urêmicos. É um dos fatores de risco para o desenvolvimento e progressão da IRC e pode acarretar um acidente vascular cerebral ou insuficiência cardíaca, além de contribuir para o processo aterosclerótico. Ela pode aumentar conforme a função renal vai se deteriorando (Locatelli et al., 2004).

Em pacientes urêmicos submetidos à hemodiálise, a patogênese da hipertensão é multifatorial. A hipervolemia resultante da retenção de sódio e água em decorrência da deficiente capacidade de excreção renal é um dos fatores mais importantes. Mas, a hipertensão também pode resultar da excessiva produção de renina, de um aumento dos níveis do vasoconstritor endotelina-1, acúmulo de inibidores endógenos da síntese de óxido nítrico e de uma redução na formação de vasodilatadores. Outros fatores que também contribuem são o tratamento com eritropoetina por sua capacidade de lesar o endotélio, o aumento intracelular de cálcio em decorrência do hiperparatireoidismo secundário e a perda de elasticidade de artérias calcificadas (Sobotova et al., 1999).

O tratamento compreende a restrição de líquidos e de sódio, cuja principal fonte é o sal, redução de líquido corpóreo pela hemodiálise e tratamento farmacológico com anti-hipertensivos e diuréticos. São utilizadas drogas de todos os grupos, de forma individual ou associadas, sendo que a indicação varia de acordo com sua dialisabilidade, co-morbidades apresentadas pelos pacientes e contra-indicações pessoais. Conforme necessidades individuais são utilizadas drogas de ação central, alfa e beta-bloqueadores, antagonistas dos canais de cálcio, vasodilatadoras diretas, inibidoras da enzima conversora e antagonistas dos receptores da angiotensina II (Sobotova et al., 1999; Praxedes, 2004; Toto, 2005).

Em pacientes que mantêm função renal residual, com pequena diurese, utiliza-se diuréticos como furosemida, que também auxiliam no alívio do edema (Andreucci et al., 1999).

#### 2.3.4 Distúrbios no metabolismo de fosfatos, cálcio e vitamina D

A diminuição sérica de cálcio, a elevação da concentração plasmática de fósforo e falta de vitamina D estimulam a liberação do paratormônio (PTH) que dentre suas funções inclui a liberação óssea de cálcio. Logo, o aumento de PTH contribui de forma importante para o desenvolvimento da osteodistrofia renal, caracterizada clinicamente por dores ósseas generalizadas, fraturas espontâneas em ossos longos, costelas e colapso de vértebras e também para o ocorrência do prurido (Aronson e Thier, 1990).

Em pacientes com IRC há uma redução na formação de 1,25-di-hidroxicolecalciferol (calcitriol), o metabólito ativo da vitamina D, formado na mitocôndria das células do túbulo proximal. Com isso, há uma redução na absorção intestinal de cálcio e um conseqüente aumento na secreção de PTH (Baradaran e Nasri, 2001).

O calcitriol costuma ser utilizado na terapêutica por sua ação inibitória direta sobre a glândula paratireóide, somada a ação indireta de aumento na absorção intestinal de cálcio. Ele também atua diretamente nos osteoblastos, influenciando a formação e mineralização dos ossos (Mallick e Gokal, 1999).

Além disso, o tratamento com calcitriol evidenciou uma melhora na resposta a EPO e, conseqüentemente, na anemia, sugerindo seu efeito indireto via supressão de PTH. Também foi demonstrado um aumento da proliferação e maturação de

células-tronco, sugerindo um efeito direto dos metabólitos da vitamina D (Hörl, 1999).

Parte dos fosfatos é eliminada pela diálise. Entretanto, ligantes de fosfato são necessários, dentre os quais inclui-se o carbonato de cálcio, o acetato de cálcio e o carbonato de magnésio. Os sais de cálcio são os mais utilizados e, além de diminuir a concentração de fosfato, ajudam na reposição de cálcio ao organismo. Porém, se utilizados de forma inadequada podem provocar hipercalcemia, especialmente quando associados ao calcitriol. Os sais de alumínio devem ser evitados porque podem contribuir para um acúmulo deste metal no organismo (Mallick e Gokal, 1999).

### 2.3.5 Riscos de hemorragias

A tendência a hemorragias é uma característica proeminente nos pacientes urêmicos, pois os distúrbios plaquetários associados à terapia com anticoagulantes geram distúrbios na hemostasia. Estes distúrbios podem ser parcialmente corrigidos por um tratamento dialítico efetivo. Entretanto, as técnicas convencionais de hemodiálise utilizam heparina para prevenir a coagulação do sangue durante o circuito extracorpóreo, inibindo a via intrínseca do mecanismo de coagulação (Jassen e Meulen, 1996).

A terapia com ácido acetilsalicílico e cumarínicos é rotineira e visa prevenir a formação de trombos nos pacientes, sobretudo na fístula arteriovenosa (Jassen e Meulen, 1996).

## 2.4 Reposição nutricional nos pacientes

As restrições alimentares associadas à perda nutricional pelo processo de hemodiálise requerem um acompanhamento dietético dos pacientes e na maioria dos casos suplementação polivitamínica.

Várias substâncias têm seu consumo restringido severamente, incluindo sódio, potássio e alimentos ricos em fósforo. A ingestão diária de líquidos é extremamente limitada. A dieta deve permitir uma ingestão calórica controlada, inclusive no que diz respeito às proporções entre proteínas, carboidratos e gorduras, para garantir um balanço nitrogenado adequado (Martins e Riella, 2001).

A necessidade de suplementação é individualizada e depende da avaliação bioquímica e nutricional periódica dos pacientes. Para repor as deficiências, a maioria dos indivíduos necessita suplementação com polivitamínicos e ferro, incluindo, impreterivelmente, vitaminas do complexo B (ácido fólico, vitaminas B12 e B6), vitamina C e cálcio, além de elementos essenciais (Martins e Riella, 2001).

A suplementação com vitaminas do complexo B deve receber especial atenção, visto o envolvimento das mesmas na eritropoiese e no metabolismo da Hcy. As concentrações elevadas de Hcy, potencial fator de risco para aterosclerose, podem ser reduzidas com adequada suplementação.

As vitaminas lipossolúveis usualmente não exigem suplementação, exceto a vitamina D, com indicação individualizada, de acordo com os níveis sanguíneos de cálcio e fósforo (Martins e Riella, 2001). Entretanto, estudos têm mostrado que a suplementação com vitamina E pode ser benéfica, diminuindo o estresse oxidativo e contribuindo para uma redução das doses inicialmente requeridas de rHuEPO (Cristol et al., 1997).

A suplementação com vitaminas deve ser acompanhada para obtenção do efeito terapêutico desejado, pois doses excessivas podem ser prejudiciais. Altas doses de vitamina C podem induzir ao acúmulo de ácido oxálico nos pacientes hemodialisados, potencializando o risco de uma oxalose sistêmica (Pru et al., 1985).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 Equipamentos

- Agitador mecânico Kline modelo 255, Fanem.
- AXSYN TM System, Abbott.
- Balança analítica, Sartorius.
- Banho de ultra-som, Unique.
- Banho Maria 37°C, Fanem.
- Banho Maria 100°C, Nova Ética.
- Bomba de vácuo, Fanem.
- Centrífuga Excelsa Baby modelo 208N, Fanem.
- Centrífuga para micro-hematócrito, Celm.
- Centrífuga refrigerada, Heraus GmbH.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência KNAUER®, modelo WellChrom com bomba quaternária, sistema organizador de solventes, câmara misturadora dinâmica, degaseificador *on line*, injetor manual com alça de amostragem de 20µL, coluna cromatográfica Eurospher-100 C18, 5 µm, 150 x 4 mm integrada à pré-coluna Eurospher-100 C18, 5 µm, 5 x 4 mm, detector espectrofotométrico na região do ultravioleta KNAUER®, sistema informatizado de aquisição de dados com integração e registro através de computador Pentium IV, via EUROCHROM 2000 SOTWARE® basic edition versão 2.05 para Windows.
- Dispensador manual de precisão, Eppendorf.
- Espectrofotômetro Lamba 16, Perkin Elmer.
- Espectrofotômetro semi-automático Labquest, Labtest Diagnóstica S.A.
- Espectrofotômetro Spectronic 21, Bauch & Lomb.
- Freezer -20°C, Prosdócimo.
- Peagâmetro, Metler Toledo.
- Sistema de aquecimento da coluna cromatográfica, HAAKE FJ.
- Sistema de filtração de solventes, Millipore.
- Sistema purificador de água, Millipore.
- Vórtex, Reidolph.

### 3.2 Reagentes

- 4-Dimetilaminobenzaldeído, Vetec.
- Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico), Sigma-Aldrich.
- Ácido acético, Merck.
- Ácido acético glacial, Vetec.
- Ácido clorídrico fumegante, Merck.
- Ácido  $\delta$ -aminolevulínico, Sigma-Aldrich.
- Ácido etileno diamino tetracético, Labtest Diagnóstica.
- Ácido etileno diamino tetracético, Vetec.
- Ácido  $\sigma$ -fosfórico 85%, Merck.
- Ácido perclórico 70%, Vetec.
- Ácido tiobarbitúrico, Spectrum.
- Ácido tricloroacético, Vetec.
- Álcool etílico, Vetec.
- Álcool metílico, Tedia.
- Bicarbonato de sódio, Belga.
- Cianeto de potássio, Vetec.
- Cloreto de mercúrio, Merck.
- Ditiotreitól, Sigma-Aldrich.
- Dodecil sulfato de sódio, Sigma-Aldrich.
- Ferricianeto de potássio, Belga.
- Fosfato de potássio dibásico, Vetec.
- Fosfato de potássio monobásico, Vetec.
- Glutationa (forma reduzida), Sigma-Aldrich.
- Heparina sódica, Eurofarma.
- Hidróxido de sódio, Belga.
- Hidróxi-tolueno-butílico, Sigma-Aldrich.
- Malonildialdeído, Sigma-Aldrich.
- N-acetilcisteína, Sigma-Aldrich.
- Tris (hidroximetil)aminometano, Vetec.
- Triton X-100, Sigma-Aldrich.

### 3.3 Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, obtida através de sistema Milli-Q, resistividade de 18,2 MΩcm, exceto quando especificada a utilização de água destilada e deionizada.

- Ácido acético 12% (v/v).
- Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 10 mM, pH 8,0 ajustado com NaOH 1M.
- Ácido clorídrico (HCl) 1M e 4M.
- Ácido δ-aminolevulínico (ALA) 12 mM.
- Ácido etileno diamino tetracético (EDTA) 0,3 mM.
- Ácido σ-fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 1,4% (v/v), pH 2,0 ajustado com HCl 1M.
- Ácido fosfórico 7M.
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6% (m/v).
- Ácido tricloroacético (TCA) 10 e 15% (m/v).
- Cianeto de potássio 13,3% (m/v).
- Cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) 0,05 M em TCA 10% (m/v) (TCA-HgCl<sub>2</sub>).
- Ditiotreitól (DTT) 97,5 mM.
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1% (m/v).
- Ferricianeto de potássio 5% (m/v) em água destilada.
- Fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,5 M, pH 3,8 ajustado com HCl 1M.
- Fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1M.
- Fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 25 mM, pH 3,8 ajustado com HCl 1M.
- Fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,5M e 1M.
- Hidróxido de sódio (NaOH) 0,5M e 1M.
- Hidróxi-tolueno-butílico (BHT) 10mM em etanol.
- Malonildialdeído (MDA) 0,03 mM.
- Padrão aquoso estoque de glutatona reduzida (GSH) 20mM.
- Reativo de Drabkin: pesou-se 0,05 g de cianeto de potássio, 0,2 g de ferricianeto de potássio, 1,0 g de bicarbonato de sódio e completou-se o volume para 1000 ml com água destilada e deionizada.

- Reativo Pré-Ehrlich: pesou-se 0,7 g de  $\text{HgCl}_2$ , adicionou-se 170 ml de ácido acético glacial, 40 ml de ácido perclórico 70% e completou-se o volume para 220 ml com ácido acético glacial.
- Reativo de Ehrlich: pesou-se 0,5 g de 4-dimetilaminobenzaldeído e dissolveu-se em 27,5 ml de pré-Ehrlich.
- Solução de ácido acético glacial e ácido clorídrico: misturou-se 7,6 ml de ácido acético glacial com 2,3 ml de HCl concentrado e completou-se o volume para 100 ml.
- Solução de cianeto neutralizada: misturou-se uma solução de cianeto de potássio 13,3 % com solução de ácido acético 12% , na proporção de 1: 0,9.
- Solução de ferricianeto tamponada: misturou-se 0,2 ml de solução de ferricianeto 5% com 2,5 ml de tampão fosfato de potássio pH 7,2 e completou-se o volume para 10 ml com água destilada e deionizada.
- Solução tampão fosfato de potássio pH 6,8: misturou-se solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M e solução de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1M até atingir pH 6,8.
- Solução tampão fosfato de potássio pH 7,2: misturou-se soluções de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 M e NaOH 0,5 M até atingir pH 7,2, ajustando o pH com o próprio NaOH.
- Solução tampão fosfato de potássio pH 7,4: misturou-se soluções de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50mM até atingir pH 7,4.
- Solução tampão fosfato – ALA (TKF-ALA): misturou-se 75  $\mu\text{l}$  de solução de tampão fosfato de potássio pH 6,8 com 250  $\mu\text{l}$  de ALA 12 mM.
- Tris-HCl 0,5M, pH 8,9 ajustado com NaOH 1M.
- Triton X-100 10 e 20% (v/v).

### 3.4 Grupo de Estudo

O estudo foi constituído por 56 indivíduos, subdivididos em dois grupos:

- Pacientes hemodialisados (PH): grupo de 36 indivíduos com IRC submetidos ao tratamento regular de hemodiálise, com idade entre 30 e 76 anos.
- Controles: grupo de 20 indivíduos considerados saudáveis para doença renal crônica, com idades entre 30 e 57 anos.

Alguns critérios de exclusão foram adotados para os PH, como síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e hepatite. Por outro lado, não foram adotados critérios em relação à faixa etária, tempo de hemodiálise, medicação utilizada, estilo de vida e outras co-morbidades.

Para os controles os critérios de exclusão foram SIDA, hepatite, hipertensão, diabetes mellitus e outras doenças crônicas, tabagismo, utilização de suplementação vitamínica e idade inferior a 30 anos.

Por meio de um termo devidamente assinado, todos os indivíduos consentiram na sua participação livre e espontânea, autorizando a coleta sanguínea e a utilização dos resultados obtidos (APÊNDICE A). Além disso, foram submetidos a um questionário (APÊNDICE B) utilizado como dados adicionais, contendo informações pessoais a respeito de tempo de diálise, co-morbidades, histórico de problemas cardiovasculares, realização de atividades físicas ou laborais e medicação.

Foram realizadas consultas ao prontuário médico de cada paciente para obtenção de dados complementares relevantes, além da confirmação de algumas informações obtidas através do questionário.

### **3.5 Amostra Biológica**

As amostras de sangue dos PH foram obtidas na Casa de Saúde e no Hospital de Caridade Astrogildo de Azevedo, ambos em Santa Maria, RS, sendo que os pacientes selecionados eram submetidos a três sessões semanais de hemodiálise, com duração de 4 horas cada. As amostras dos controles foram obtidas de voluntários do Centro de Ciências da Saúde da UFSM.

#### **3.5.1 Coleta e processamento da amostra**

Foi realizada uma única coleta de 10 ml de sangue da fístula arteriovenosa dos PH, antes da heparinização requerida no procedimento dialítico e uma única coleta de 10 ml por venipuntura periférica dos controles. O sangue obtido foi dividido em tubos contendo anticoagulante EDTA e anticoagulante heparina.

Após a coleta, as amostras foram mantidas em gelo até o seu processamento a fim de minimizar a alteração dos analitos ALA-D, GSH, TBARS e Hcy.

Do sangue coletado com EDTA, foi separado 1 ml para análise do hematócrito e hemoglobina. Os 6 ml restantes foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (3°C) e o plasma imediatamente separado. Parte deste foi congelado a -20°C para análise de Hcy e o remanescente utilizado para análise de TBARS.

Os 3 ml de sangue com heparina foram utilizados na determinação da atividade da ALA-D com e sem DTT e da metemoglobina.

### **3.6 Análises realizadas e tratamento das amostras**

#### *3.6.1 Hemoglobina (Hb)*

Efetuada segundo ICHS (1977) pelo método da cianometemoglobina.

Mediu-se exatamente 5 ml do reativo de Drabkin, acrescentou-se 20 µl de sangue com EDTA, lavando a ponteira na própria solução, misturou-se e aguardou-se por 5 a 10 minutos para desenvolvimento da cor (transformação da Hb em cianometemoglobina). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e quantificou-se a Hb com auxílio de uma equação de reta de calibração, previamente realizada.

O coeficiente de correlação linear obtido na calibração foi  $R^2 = 0,998$  e a equação da reta de calibração foi  $y = 0,0154x + 0,0502$ .

#### *3.6.2 Hematócrito (Ht)*

Realizada através de micro-centrifugação, segundo ICHS (1982).

Preencheu-se um capilar não graduado de 75 mm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro com sangue total em EDTA. Selou-se, por calor, uma das extremidades e centrifugou-se o capilar por 5 minutos a 7000 rpm em centrífuga para micro-hematócrito. Ocorreu a separação da coluna de sangue em eritrócitos e plasma, com uma pequena camada de leucócitos e plaquetas na interface. Realizou-se a leitura da coluna de eritrócitos resultante com auxílio de uma régua escalonada própria para esta finalidade.

### 3.6.3 *Glutathiona reduzida (GSH)*

Através de método desenvolvido por Schott (2005), os eritrócitos obtidos após centrifugação do sangue com EDTA foram submetidos à hemólise com solução de triton x-100 20%, desproteinizados com TCA 15%, centrifugados e o sobrenadante resultante derivatizado com DTNB 10 mM. A quantificação da GSH deu-se por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (330 nm), utilizando  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM (pH 3,83) : MeOH como fase móvel, eluição por gradiente em coluna de fase reversa C18, 5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4 mm acoplada à pré-coluna C18, 5  $\mu\text{m}$ , 5 x 4 mm, mantida sob 39°C, utilizando-se N-acetilcisteína como padrão interno.

A quantificação foi realizada através de uma curva de calibração com equação da reta  $y=29,473x + 0,9369$ ,  $R^2 = 0,9998$ . Sua concentração foi expressa por grama de hemoglobina, utilizando a seguinte equação:

$$\mu\text{mol GSH no sangue total/g Hb} = \frac{\text{mM GSH nos eritrócitos} \times \text{Ht}}{\text{Hb}} \times 100$$

### 3.6.4 *TBARS*

Determinação efetuada segundo método de Ohkawa et al. (1979) modificado.

Pipetou-se 200  $\mu\text{l}$  de plasma com EDTA, acrescentou-se 1100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1,4% pH 2,0, 200  $\mu\text{l}$  de SDS 8,1 %, 20  $\mu\text{l}$  de BHT 10 mM e 500  $\mu\text{l}$  de TBA 0,6 % em tubo preferencialmente com tampa de rosca. Vedou-se os tubos com a tampa (ou com bolinhas de gude, na ausência de tampas). Levou-se a banho Maria a 95°C por uma hora e centrifugou-se os tubos por 15 minutos em rotação de 6000 rpm. Separou-se o sobrenadante em eppendorfes. Se o mesmo não estiver totalmente límpido, centrifuga-los novamente por 5 minutos em 6000 rpm. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro em 553 nm.

A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva de calibração cuja equação da reta obtida foi  $y = 0,0915x - 0,0008$ , com coeficiente de correlação linear  $R^2 = 0,9996$ .

### 3.6.5 Atividade da enzima ALA-D

Realizada segundo método de Sassa (1982) modificado.

Uma alíquota de 400 µl de sangue com heparina foi hemolisada com solução de triton X-100 10% e permaneceu por 30 minutos sob agitação mecânica para completa hemólise. Separou-se 6 tubos de ensaio, dividindo-os em dois grupos, 1 e 2, onde foram determinadas a atividade de enzima ALA-D sem e com ditiotreitol (DTT), respectivamente. O DTT é um agente responsável pela redução dos grupos sulfidrílicos oxidados (inibidos) da enzima.

Aos tubos do grupo 1 acrescentou-se 275 µl de água milli-Q. Nos tubos do grupo 2 pipetou-se 205 µl de água milli-Q e 70 µl de DTT 97,5 mM, sendo que a concentração do mesmo no meio reacional passa a ser de 10,5 mM. Preparou-se um tubo branco com 600µl de água. Levou-se os tubos ao banho termostatizado a 37 °C e acrescentou-se 50µl do sangue inicialmente hemolisado em todos os tubos, inclusive no branco, cronometrando o tempo de pipetagem entre os tubos em intervalos de 15 segundos. Incubou-se por 10 minutos, pipetou-se 325 µl de TKF-ALA com intervalo de 15 segundos entre os tubos, incubando-os por mais uma hora. Interrompou-se a reação pipetando 250 µl de TCA-HgCl<sub>2</sub>. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos em 6.000 rpm. Realizou-se a reação de cor com 300 µl do sobrenadante, 500 µl de água milli-Q e 500 µl de reativo de Ehrlich. Os tubos foram agitados e aguardou-se pelo menos 20 minutos para que a leitura pudesse ser efetuada em espectrofotômetro em 555 nm.

Realizou-se a quantificação utilizando as seguintes equações:

$$\text{Atividade da ALA-D (sem DTT)} = \frac{\text{Abs 1} \times 127.860}{\text{Ht} \times T_{\text{inc}}} \quad \mu\text{mol PBG/h/l}$$

$$\text{Atividade da ALA-D (com DTT)} = \frac{\text{Abs 2} \times 127.860}{\text{Ht} \times T_{\text{inc}}} \quad \mu\text{mol PBG/h/l}$$

Onde:

Abs 1 e Abs 2= absorbâncias dos tubos do grupo 1 e 2, respectivamente.

Ht = hematócrito

127.860 = fator de correção

T<sub>inc</sub>= tempo de incubação do substrato ALA com a amostra

### 3.6.6 Homocisteína (Hcy)

A quantificação da Hcy total foi executada com a utilização de kit comercial AxSYM® Homocisteína, da Abbott Laboratórios do Brasil LTDA, em sistema AxSYM™ System da Abbott, totalmente automatizado. A análise é baseada no método de Imunoensaio de Fluorescência Polarizada (FPIA), utilizando plasma anticoagulado com EDTA. Todos os reagentes necessários à análise foram fornecidos pelo kit, com exceção de calibradores e controles fornecidos separadamente, bem como a solução de limpeza do aparelho.

### 3.6.7 Metemoglobina

Realizada segundo método de Hegesh et al. (1970).

Pipetou-se 0,8 ml de sangue total com heparina, 2,2 ml de água destilada, 1,0 ml de tampão fosfato de potássio pH 7,2 e 1 gota de triton X-100, levando os tubos ao vórtex por 1 minuto. Pipetou-se 3,0 ml desta amostra em uma cubeta (1) e 0,4 ml da amostra com 4,4 ml de ferricianeto de potássio tamponado em outra cubeta (2). Determinou-se as absorvâncias de cada cubeta em 632 nm (A1 e A2). Acrescentou-se 125 µl de solução de cianeto neutralizada na cubeta 1 e 200 µl na cubeta 2. Determinou-se novamente as absorvâncias (A3 e A4).

Realizou-se a quantificação da metemoglobina percentual através da seguinte fórmula:

$$\%MeHb = \frac{(A1-A3)}{12 (A2-A4)} \times 100$$

## 3.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos entre pacientes hemodialisados (n=36) e controles (n=20) foram expressos em média ± desvio padrão e analisados estatisticamente através do teste T de Student para amostras independentes através do software de estatística Statistica® 6.0 (Statsoft Inc., 2001). A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando  $p \leq 0,05$ . Após análise da distribuição das variáveis, os dados foram correlacionados estatisticamente através do coeficiente de Pearson.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As correlações obtidas através da análise estatística dos dados são apresentadas no APÊNDICE C.

#### 4.1 Coleta de dados

Após aplicação do questionário (APÊNDICE B) foi possível traçar um perfil dos pacientes hemodialisados (PH) e dos controles em relação à idade e hábitos de vida.

Também foram realizadas pesquisas ao prontuário médico de cada paciente, verificando-se capacidade funcional dos pacientes, etiologia da IRC, co-morbidades apresentadas, tempo de hemodiálise e medicamentos utilizados, bem como o tempo de uso dos medicamentos mais relevantes.

#### 4.2 Perfil dos participantes

O perfil dos participantes deste estudo compreende uma série de informações relevantes aos resultados dos parâmetros bioquímicos avaliados.

##### 4.2.1 Distribuição por sexo e idade

Primeiramente foi realizada uma análise da distribuição por sexo e da idade, em anos, tanto dos pacientes hemodialisados quanto dos controles, apresentada a seguir na tabela 1.

**TABELA 1 - Distribuição por sexo e idade dos participantes:**

	<i>Pacientes</i>	<i>Controles</i>
<i>Total</i>	36	20
<i>Distribuição por sexo</i>	Homens: 17 Mulheres: 19	Homens: 10 Mulheres: 10
<i>Idade (anos)</i> <i>Média ± desvio padrão</i>	55,18± 11,36	42,6 ± 8,63

## 4.2.2 Hábitos de vida

### 4.2.2.1 Tabagismo e Álcool

Foram pesquisados determinados hábitos de vida, pois alguns contribuem direta ou indiretamente para o aumento do estresse oxidativo ou para alterações de parâmetros bioquímicos avaliados nesta pesquisa.

Na tabela 2 é possível observar hábitos dos pacientes como tabagismo e consumo de álcool, seja diário, esporádico ou nulo. Também foram computados os PH que foram fumantes ou alcoolistas. Todos os controles eram não-fumantes e consumiam álcool esporadicamente.

**TABELA 2 – Alguns hábitos dos pacientes hemodialisados:**

	<i>Diariamente</i>	<i>Esporadicamente</i>	<i>Não</i>	<i>Ex</i>
<b>Fumo</b>	3	-----	13	20
<b>Álcool</b>	3	6	23	4

Percebe-se que 8,3% dos pacientes são fumantes, 36% não fumantes, e 55,5% são ex-fumantes. Nenhum fazia consumo esporádico de cigarro.

O tabagismo é um provável fator associado à hiper-homocisteinemia, pois a nicotina exerce efeitos nocivos sobre a síntese orgânica de piridoxal fosfato, uma forma co-enzimática da vitamina B6. Esta co-enzima participa do metabolismo da Hcy e está diretamente relacionada ao aumento das concentrações deste aminoácido (Nygard et al., 1995). Segundo Vermaak et al. (1990) fumantes apresentam concentrações de piridoxal fosfato significativamente mais baixas que não fumantes.

Além disso, o tabagismo provoca aumento da geração de radicais livres e, conseqüentemente, contribui para a ocorrência de estresse oxidativo e patologias a ele associadas. De acordo com Nielsen et al. (1997) fumantes apresentam níveis de MDA aumentados.

O alcoolismo crônico também já foi associado a elevações das concentrações de Hcy. Acredita-se que este fato se deva ao déficit nutricional apresentado pelos

alcoolistas. Contudo, a influência do consumo de álcool sobre a Hcy permanece incerta (Cravo et al., 1996).

Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos avaliados quando comparados em relação aos hábitos dos pacientes.

#### 4.2.2.2 Atividade física

A tabela 3 apresenta a capacidade funcional para realização de atividades físicas simples ou laborais pelos pacientes, de acordo com informações obtidas nos prontuários médicos.

**TABELA 3 - Capacidade funcional dos pacientes hemodialisados:**

<i>Atividade Física Simples ou Laboral</i>	<i>% de pacientes</i>
<b>Normal</b>	64%
<b>Mínima</b>	36%

Observa-se que 64 % dos pacientes relatam normalidade de sua capacidade de realização de atividades simples, sendo que alguns destes pacientes conseguem, inclusive, manter suas atividades laborais.

Já 36%, cerca de um terço dos pacientes, declaram capacidade mínima para realização destas tarefas. Este fator contribui para o aparecimento de transtornos emocionais nos pacientes, uma vez que a atividade laboral tem um papel fundamental na vida do homem. Quando o indivíduo passa a ter sua vida limitada a uma condição praticamente incapacitante, por fatores alheios à sua vontade, surgem perturbações de identidade e auto-estima, levando a alterações psicológicas que prejudicam a qualidade de vida do paciente (Lara e Sarquis, 2004).

A prática de atividades físicas pode influenciar nas concentrações de Hcy. Segundo Nygard et al. (1995) o sedentarismo está relacionado a HHcy.

No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os pacientes com atividade física normal e mínima para os parâmetros analisados.

### 4.3 Etiologia da doença renal

A falência renal acomete pessoas de todas as idades e se desenvolve como resultado de danos progressivos aos rins, resultantes de diferentes tipos de injúrias. É uma síndrome metabólica decorrente da uma perda progressiva, geralmente lenta, da capacidade excretória renal (Mallick e Gokal, 1999).

A fim de verificar as principais causas que levaram os pacientes em questão a IRC, foi realizado um levantamento a respeito da principal etiologia causadora da sua falência renal. Os resultados são apresentados a seguir na tabela 4.

**TABELA 4 - Etiologia da insuficiência renal crônica nos pacientes:**

<b>ETIOLOGIA</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>% de pacientes</b>
<b>Hipertensão</b>	9	25%
<b>Diabetes mellitus</b>	8	22,2%
<b>Glomerulonefrite crônica</b>	5	13,9%
<b>Incerta</b>	11	30,5%
<b>Outras</b>	3	8,3%

Observou-se que quanto à etiologia da IRC, os resultados da tabela 4 correspondem aos dados da literatura. De acordo com Parmar (2002), o diabetes mellitus e a hipertensão são as duas patologias que mais comumente causam IRC e estão associadas com um alto risco de morte por DCVs.

O diabetes acomete uma grande parte da população que apresenta doenças renais na América do Norte. Um controle mais efetivo da glicose e da pressão sanguínea poderiam reduzir as complicações renais impostas por esta patologia. Tem sido evidenciado que um controle glicêmico pode reduzir a progressão da lesão renal diabética a IRC. O adequado controle da pressão com uma variada gama de agentes anti-hipertensivos em pacientes diabéticos tem se mostrado eficiente em retardar a albuminúria, tanto no diabetes tipo I quanto no tipo II. Recentemente, o bloqueio dos receptores de angiotensina tem demonstrado efeito protetor sobre o rim na nefropatia precoce e na tardia devido ao diabetes do tipo II (Lewis et al., 1993).

A hipertensão é, conhecidamente, tanto uma causa da IRC quanto uma consequência e um importante fator de risco para progressão da doença renal. O controle da pressão é a intervenção terapêutica mais importante para retardar a lesão renal hipertensiva. Vários agentes anti-hipertensivos podem ser utilizados, mas os inibidores da enzima conversora de angiotensina são particularmente efetivos no retardo da insuficiência renal em pacientes com ou sem diabetes (Brenner et al., 1982; Lewis et al., 1993).

Entretanto, em 30,5 % dos pacientes não foi possível diagnosticar a causa exata da IRC e 8,3 % apresentavam outras causas como uropatia obstrutiva, pielonefrite e rim policístico tipo infantil. Sabe-se que a IRC pode ser resultante de várias outras injúrias que provocam uma deterioração significativa e permanente de néfrons funcionantes, culminando em afecções renais que provocam a perda de funcionalidade dos mesmos (Bevilacqua et al., 1995).

#### **4.4 Tempo de hemodiálise**

Os avanços da tecnologia na área de diálise contribuíram substancialmente para o aumento da sobrevida dos pacientes renais crônicos. Entretanto, a permanência por tempo indeterminado em tratamento dialítico pode interferir na qualidade de vida dessa população (Castro et al., 2003). Além disso, o tempo de tratamento dialítico tem sido descrito como fator associado a maior morbidade dos pacientes (Miskulin et al., 2001).

Estudo realizado por Morsch et al. (2005) demonstrou que pacientes com menor tempo de tratamento, menos de um ano, apresentaram tendência a menor gravidade na evolução de co-morbidades.

Em pesquisa realizada por Castro et al. (2003) o tempo de hemodiálise correlacionou-se negativamente com os aspectos emocionais, sugerindo que pacientes com maior tempo de IRC e tratamento dialítico apresentam progressivo comprometimento das relações familiares e sociais.

Neste estudo tentou-se estabelecer correlações entre o tempo de tratamento dialítico e os diversos marcadores analisados. Sendo assim, foi realizado um levantamento do tempo, em meses, que estes pacientes estão submetidos a três sessões semanais de hemodiálise, apresentado na tabela 5, através da coleta de dados via prontuário e questionário.

**TABELA 5 – Tempo do tratamento de hemodiálise nos pacientes:**

	<i>Total</i>	<i>Homens</i>	<i>Mulheres</i>
<b><i>Tempo em meses</i></b> <i>(média ± desvio padrão)</i>	51,68 ± 41,28	35,94 ± 23,83	69,38 ± 49,73

No entanto, não foi possível evidenciar nenhuma correlação significativa entre TBARS, GSH, ALA-D, Hcy e Mhb dos pacientes em relação ao tempo de hemodiálise (apêndice C).

#### **4.5 Co-morbidades na IRC**

A presença de co-morbidades é reconhecida, há vários anos, como um dos mais importantes determinantes da sobrevida e morbidade em pacientes com insuficiência renal crônica sob hemodiálise (Locatelli et al., 1998; Beddhu et al., 2000).

As doenças cardiovasculares representam as co-morbidades mais comuns e as maiores causas de morte na IRC. Entretanto, as co-morbidades não cardiovasculares também possuem um expressivo impacto na sobrevivência dos pacientes.

Os dados a respeito das co-morbidades, de uma forma geral, são escassos, mas mostram que a hipertensão, o diabetes mellitus e as doenças cardiovasculares são as principais co-morbidades apresentadas pelos PH, além de serem fatores desencadeantes de outras desordens. Logo, um controle mais efetivo sobre estas alterações poderia melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes, bem como um melhor entendimento e manejo destas co-morbidades.

##### **4.5.1 Hipertensão e diabetes**

Através de pesquisa ao prontuário médico dos pacientes e dos questionários foi possível verificar quais apresentavam hipertensão e diabetes. Os resultados são apresentados na tabela 6.

**TABELA 6 - Percentual de pacientes com hipertensão e diabetes mellitus:**

	<b>Número de pacientes</b>	<b>% de pacientes</b>
<b>Apenas hipertensão</b>	20	55,6 %
<b>Apenas diabetes mellitus</b>	2	5,5 %
<b>Hipertensão e diabetes mellitus</b>	13	36,1%
<b>Nenhuma destas co-morbidades</b>	1	2,8%

É possível observar que a grande maioria dos pacientes apresenta hipertensão arterial. Verificou-se um percentual de 91,7 % de pacientes hipertensos. E, segundo observado anteriormente na tabela 4, item 4.3, 25% dos pacientes já apresentava hipertensão arterial, sendo esta considerada a etiologia de sua IRC. Sendo assim, 66,7% acabaram desenvolvendo hipertensão ao longo da evolução da doença renal.

Assim como na hipertensão primária, diversos mecanismos podem estar relacionados à patogênese da hipertensão arterial em pacientes urêmicos sob hemodiálise, como por exemplo, a retenção de sódio e água decorrente da prejudicada capacidade de excreção renal, aumento excessivo na atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do nervo simpático, aumento dos níveis do vasoconstritor endotelina-1, acúmulo de inibidores endógenos do óxido nítrico, redução na formação de fatores vasodpressores endógenos, aumento da secreção de paratormônio e tratamento com EPO (Sobotova et al., 1999).

No entanto, parece haver um consenso de que o desenvolvimento da hipertensão nos PH está intimamente relacionado com a hipervolemia resultante dos distúrbios na função excretora renal, provocando acúmulo de água e sódio no organismo. Portanto, a ingestão de sódio e de líquidos é extremamente controlada e limitada (Blaustein, 1996).

A estratégia de tratamento da hipertensão arterial destes pacientes passa, necessariamente, pelo controle do volume extracelular obtido parcialmente pela remoção do excesso de líquido corpóreo durante o procedimento de hemodiálise. Ainda assim, a maioria dos pacientes necessita terapia medicamentosa com anti-hipertensivos e/ou diuréticos, levando a crer que vários outros fatores podem

contribuir para a hipertensão nestes pacientes. Os medicamentos anti-hipertensivos podem ser utilizados de forma isolada ou associados, entre si ou com diuréticos, conforme mostrado na tabela 7. E são utilizados fármacos das mais diversas classes farmacológicas, sendo que sua indicação varia de acordo com necessidades individuais de cada paciente, bem como pela sua dialisabilidade (Praxedes, 2004).

**TABELA 7 – Medicamentos anti-hipertensivos utilizados pelos pacientes hemodialisados, de forma individual ou associados entre si ou com diuréticos e a respectiva percentagem de usuários:**

	<b>Número de pacientes</b>	<b>% de pacientes</b>
<b>Apenas 1 tipo de anti-hipertensivo</b>	8	22,2
<b>2 tipos de anti-hipertensivos</b>	3	8,3
<b>3 tipos de anti-hipertensivos</b>	4	11,1
<b>4 tipos de anti-hipertensivos</b>	1	2,8
<b>1 anti-hipertensivo + diurético</b>	5	13,9
<b>2 anti-hipertensivos + diurético</b>	8	22,2
<b>3 anti-hipertensivos + diurético</b>	4	11,1
<b>Nenhum destes medicamentos</b>	3	8,3

Foi possível verificar que todos os pacientes que relataram hipertensão recebem medicação para o controle da pressão arterial.

Sabe-se, por pesquisa aos prontuários médicos e pelo questionário aplicado aos pacientes, que o controle da hipertensão nos mesmos compreende restrições alimentares que visam diminuir a ingestão de líquidos e sódio, redução do volume de líquido corpóreo pela hemodiálise e tratamento farmacológico, com medicamentos das mais diversas classes: inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) como o captopril e enalapril; inibidoras de ação central como clonidina e metildopa ou de ação periférica tais como alfa e/ou beta-bloqueadores incluindo o propranolol,

atenolol e carvedilol; antagonistas dos canais de cálcio como verapamil, nifedipina e amlodipina e drogas vasodilatadoras diretas.

Na maioria dos casos, há associação de anti-hipertensivos e diurético, bem como a associação de diferentes classes de medicamentos anti-hipertensivos, a fim de proporcionar um controle mais eficaz da pressão arterial na tentativa de reduzir o risco de DCVs e melhorar qualidade de vida do paciente.

Contudo, nem sempre se obtém a resposta terapêutica desejada, seja pela ineficácia dos medicamentos em virtude da gravidade da hipertensão, seja pela não aderência dos pacientes ao tratamento correto em consequência do grande número de medicamentos que devem ingerir ou por não obedecerem às restrições dietéticas impostas.

Em relação a diabetes, também foi realizado um levantamento sobre os medicamentos hipoglicemiantes utilizados, conforme apresentado na tabela 8, para verificar se havia um efetivo controle da glicemia nos pacientes que apresentavam esse distúrbio.

**TABELA 8 – Medicamentos hipoglicemiantes utilizados pelos pacientes hemodialisados e a respectiva percentagem de usuários:**

	<b>Número de pacientes</b>	<b>% de pacientes</b>
<b>Insulina</b>	8	22,2%
<b>Apenas hipoglicemiante oral</b>	1	2,8%
<b>Insulina + hipoglicemiante oral</b>	1	2,8%

É possível observar que apenas 10 pacientes fazem uso de medicação hipoglicemiante, embora os prontuários médicos apontassem 15 pacientes com diabetes. Alguns pacientes não necessitam de terapia medicamentosa para controlar os níveis de glicose no sangue, apenas recebem orientações dietéticas que, se seguidas corretamente, conseguem manter níveis adequados de glicose.

Além disso, 13 pacientes apresentam hipertensão e diabetes, tornando-os muito mais suscetíveis a eventos de doenças de origem aterosclerótica, pois estas

duas co-morbidades encontram-se entre os fatores de risco clássicos para as mesmas, assim como ao estresse oxidativo.

#### 4.5.2 Anemia

A anemia, caracterizada pela diminuição da concentração de hemoglobina circulante (Failace, 2003), é uma desordem hematológica que comumente afeta os pacientes com doença renal crônica. É um dos principais fatores que contribui para o aumento da morbi-mortalidade por problemas cardiovasculares na IRC, reduzindo a sobrevida dos pacientes (Baradaran e Nasri, 2001).

A anemia severa está associada à fadiga, disfunção cognitiva e sexual, além de ser um importante fator etiológico no desenvolvimento da hipertrofia ventricular. Logo, possui um significativo impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes em virtude da relativa incapacidade física e mental que provoca (Santoro e Canova, 2005). Some-se a isso o fato de que acaba estigmatizando alguns pacientes por lhes conferir um aspecto doentio devido à palidez cutânea, prejudicando de maneira importante sua recuperação social (Abensur e Alves, 2004).

Portanto, a avaliação hematológica dos pacientes com IRC é um ponto que merece atenção especial durante o tratamento. É necessário um rigoroso e periódico controle das taxas de hemoglobina (Hb) e de hematócrito (Ht), uma vez que a determinação destes índices hematimétricos pode diagnosticar a anemia. Mas, na rotina clínica, recomenda-se também a contagem total de eritrócitos e sua avaliação morfológica, como formas complementares de avaliação e diagnóstico.

Os níveis de Hb recomendados para homens e mulheres devem ser de, no mínimo, 13 g/dl e 12 g/dl respectivamente. Para o Ht são recomendados valores superiores a 39% para homens e 37% para mulheres (Failace, 2003). As diferenças nos níveis médios de Hb e Ht entre homens e mulheres adultos são causados, provavelmente, por diferenças na produção de estrógeno e testosterona que surgem na puberdade, mas que se reduzem após a menopausa (NKF-K/DOQI, 2000).

#### 4.5.2.1 Avaliação hematológica

Dada a importância da avaliação hematológica na IRC, foram realizadas as determinações de Hb e Ht, apresentadas na tabela 9, dos pacientes hemodialisados e controles.

**TABELA 9 – Resultados de Hb (g/dl) e Ht (%) dos pacientes hemodialisados e controles, em média  $\pm$  desvio padrão:**

		<i>Média Geral</i>	<i>Homens</i>	<i>Mulheres</i>
<b>Hb (g/dl)</b>	Controles	13,78 $\pm$ 1,05	14,04 $\pm$ 1,17	13,52 $\pm$ 0,92
	Pacientes	11,35 $\pm$ 2,13 *	11,62 $\pm$ 1,63 *	11,12 $\pm$ 2,66 *
<b>Ht (%)</b>	Controles	43,15 $\pm$ 2,6	43,3 $\pm$ 2,98	43 $\pm$ 2,3
	Pacientes	36,72 $\pm$ 6,77 *	36,94 $\pm$ 4,72 *	36,53 $\pm$ 8,32*

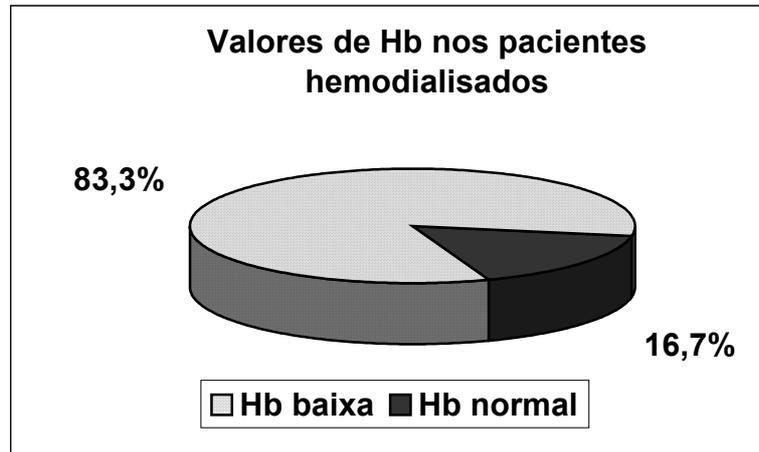
\*  $p < 0,05$  em relação aos controles

Nos hemodialisados, o valor mínimo de Hb foi 6 g/dl e o valor máximo de 16,2 g/dl. Em relação ao Ht, os valores mínimo e máximo foram de 20 e 54 %, respectivamente. Para os controles, ocorreram variações entre 11,6 g/dl e 15,55 g/dl para Hb e entre 38 e 48 % para Ht.

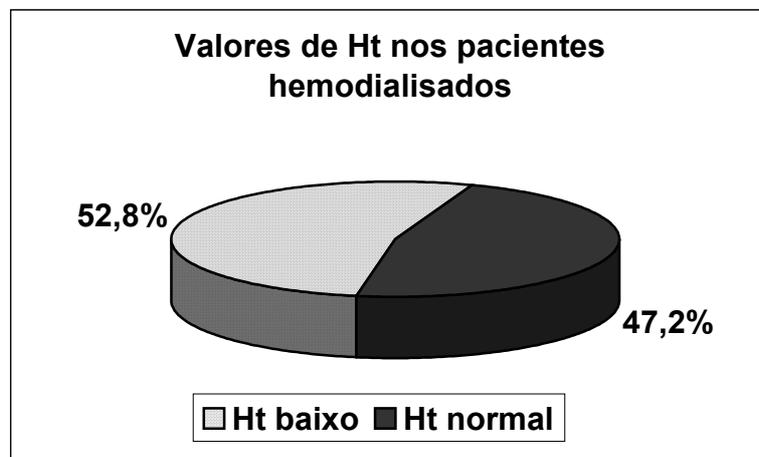
Considerando-se os valores de Hb e Ht para a população normal e saudável, anteriormente mencionados, pode-se inferir que o grupo de controles apresentou concentrações dentro dos padrões de normalidade. Porém, as médias de Hb e Ht do grupo de pacientes foram significativamente menores em relação aos controles ( $p < 0,05$ ) e apresentaram valores abaixo dos níveis considerados normais, tanto na média geral quanto nas médias diferenciadas por sexo.

No entanto, somente através de uma análise individual dos dados hematológicos de cada paciente foi possível estabelecer precisamente o número de indivíduos com valores abaixo da normalidade. Foi possível verificar que 30 pacientes apresentaram taxas de Hb inferiores ao limite mínimo recomendado. Em relação ao Ht, 19 pacientes apresentaram valores abaixo da normalidade.

As figuras 3 e 4 demonstram a real porcentagem de pacientes com taxas de Hb e Ht abaixo do normal. Pode-se concluir que a maioria apresenta Hb baixa, caracterizando a anemia. Já em relação ao Ht, observa-se que mais da metade dos pacientes apresentam valores abaixo da normalidade.



**Figura 3. Distribuição percentual dos pacientes hemodialisados em relação aos níveis de Hb.**

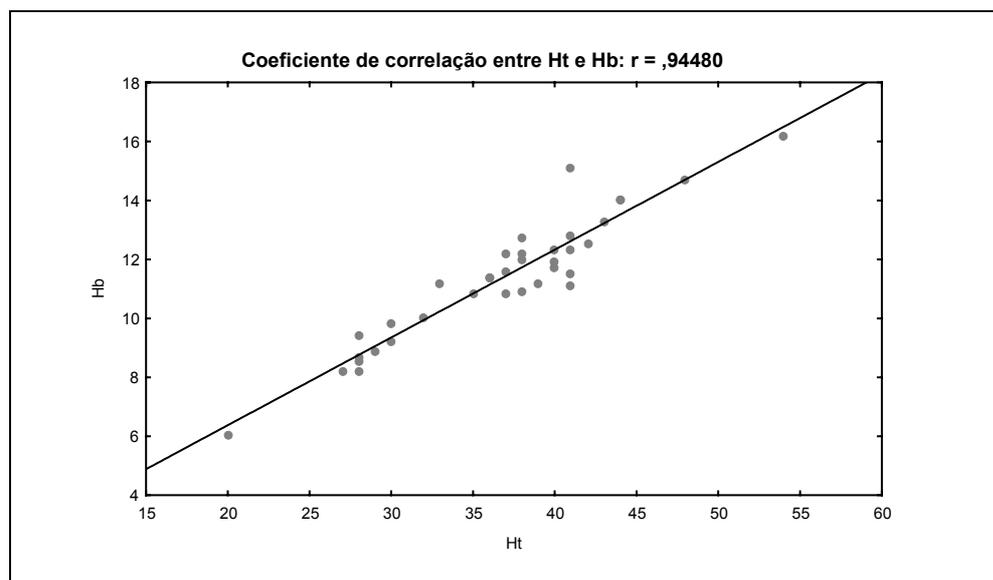


**Figura 4: Distribuição percentual dos pacientes hemodialisados em relação aos níveis de Ht.**

Entretanto, segundo Failace (2003), a determinação do Ht pela técnica de micro-centrifugação é 1 ou 2 pontos percentuais superior ao valor de Ht que se obteria através da utilização de contadores eletrônicos, pois por melhor que seja a micro-centrifugação do sangue, sempre há retenção de uma pequena, mas considerável, quantidade de plasma na coluna de eritrócitos, falseando o resultado para valores

maiores que o real. Já a leitura da Hb pelos contadores eletrônicos é feita através de espectrofotometria, a mesma metodologia utilizada neste trabalho.

Como a técnica de determinação de Ht utilizada neste trabalho se baseia em micro-centrifugação de sangue, os valores de Hb foram considerados mais exatos e confiáveis e, por isso, tomados como parâmetro hematológico principal no diagnóstico da anemia. Contudo, verificou-se uma correlação significativa entre os valores de Hb e Ht dos pacientes, apresentada na figura 5. Mesmo assim, preferiu-se utilizar o valor de Ht apenas como uma forma complementar de avaliação.



**Figura 5 – Correlação entre os valores de Hb e Ht nos pacientes hemodialisados.**

Sendo assim, verificou-se que 83,3% dos pacientes investigados neste estudo apresentavam anemia. Os valores encontrados nesta avaliação hematológica demonstram plena concordância com outros estudos. De acordo com Nasri e Baradan (2005) a anemia é um distúrbio hematológico muito comum em pacientes com IRC submetidos à hemodiálise, podendo afetar até 90 % dos pacientes.

#### 4.5.2.2 Análise das possíveis causas da anemia

A principal causa da anemia nestes pacientes é a deficiente produção renal do hormônio eritropoetina (EPO). Dentre os fatores complementares que podem causar ou contribuir para anemia na IRC incluem-se as deficiências de ferro, ácido

fólico e/ou vitamina B12, perdas sangüíneas decorrentes de causas diversas, hiperparatireoidismo grave, condições inflamatórias agudas e crônicas impostas pela uremia e procedimento dialítico, redução do tempo de vida dos eritrócitos circulantes (Abensur e Alves, 2000; Peco-Antic, 2005) e intoxicação por alumínio (Kaiser e Schwartz, 1985). Estes potenciais fatores de contribuição, caso sejam relevantes, devem ser considerados, apontados e também tratados.

Os pacientes em hemodiálise perdem, geralmente, até 15-25 ml de sangue total em cada sessão dialítica (aproximadamente 60 ml por semana) como resultado da retenção de sangue no dialisador e nas punções venosas para exames de sangue (Longnecker et al., 1974).

A EPO é uma glicoproteína indispensável ao processo de eritropoiese. Estimula a maturação e proliferação de precursores eritróides, promove a adição de ferro para formação de heme e impede a apoptose dos progenitores. O maior sítio de produção de EPO, cerca de 90%, são as células fibroblásticas tipo I no interstício peritubular do córtex renal (Peco-Antic, 2005).

A principal função dos eritrócitos é o transporte de oxigênio a órgãos e tecidos. A hipóxia ativa o fator transcricional hipóxia induzido HIF-1, que promove a expressão do gene da EPO e sua transcrição. Na IRC ocorre uma deficiência do mecanismo que ajusta a produção de EPO e, conseqüentemente, da capacidade sangüínea de transporte de oxigênio devido à destruição de uma sub-população de fibroblastos renais que normalmente produzem EPO e a transformação destes fibroblastos produtores de EPO dentro da matriz produtora de miofibroblastos (Eckardt, 2000).

O gene da eritropoetina foi identificado em 1983 e, a partir de então, foi possível a utilização de seu produto recombinante através de clonagem (Lin et al., 1985) e, desde 1986, a eritropoetina recombinante humana (rHuEPO) é utilizada na prática clínica. Antes, a anemia renal era tratada por meio de transfusões sangüíneas e esteróides anabólicos ou andrógenos, cujo uso foi abolido em função de seus efeitos adversos (Peco-Antic, 2005).

As duas principais rotas de administração de rHuEPO são a intravenosa (IV) e a subcutânea (SC). Devido a uma farmacodinâmica mais favorável, sabe-se que a via SC é mais eficaz que a IV e, portanto, a via preferencial. Apenas a EPO distribuída pela Jansen-Cilag, sob nome comercial Eprex®, não é recomendada em bula por via SC, devido ao surgimento de alguns casos de aplasia pura da série

vermelha, ocasionada por anticorpos neutralizantes anti-eritropoetina, atribuídos pelo fabricante ao emprego subcutâneo da medicação (Abensur e Alves, 2000).

De acordo com as Diretrizes de Condução da anemia na IRC, estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, a dose inicial de EPO é de 80-100 U/ Kg/ semana divididas em 2 a 3 doses semanais quando se emprega a via SC. Já por via IV, a dose recomendada é de 120-180 U/Kg/semana divididas em 3 doses (Abensur e Alves, 2000).

Com o propósito de monitorar a resposta a EPO, deve-se realizar a determinação de Hb e Ht a cada 1 ou 2 semanas no início do tratamento, ajustando as doses até que se obtenha valores-alvo estáveis dos índices hematimétricos. Após, a monitorização de Hb e Ht deve ser feita de 2 a 4 semanas, conforme necessidades individuais. Se o Ht não se elevar em dois pontos após o início da terapia, deve-se aumentar a dose de EPO em 50%. Já se ocorrer um aumento de 8 pontos percentuais por mês ou se o Ht superar o valor-alvo esperado após o início da terapia, deve-se reduzir a dose semanal em 25% (Abensur e Alves, 2000).

Dos 36 pacientes avaliados, constatou-se que 24 deles, sendo 11 mulheres e 13 homens, realizavam terapia com EPO, todos por via subcutânea, na época da coleta das amostras. E, através do prontuário médico de cada paciente foi possível realizar um levantamento a respeito do tempo de terapia de cada um, com intuito de verificar uma possível relação entre o tempo de uso deste medicamento e os parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados. Entretanto, nenhuma correlação significativa foi encontrada entre usuários ou não de EPO ( $p < 0,05$ ).

O tempo médio de tratamento com EPO, em meses, foi de  $32,25 \pm 17,54$ . A maioria dos pacientes recebia terapia com EPO por um tempo bastante considerável, em termos de resposta a anemia. Assim, esperava-se encontrar um menor número de pacientes anêmicos, pois se a principal causa de anemia na IRC é a deficiência de EPO, a maioria dos pacientes recebia tratamento para resolver esta deficiência.

Entretanto, sabe-se que a resposta ao tratamento com EPO depende de uma série de fatores que podem levar a uma resposta terapêutica inadequada. A causa mais comum de hiporesponsividade é atribuída a deficiência de ferro. Mas, pode ocorrer também devido a processos infecciosos ou inflamatórios, deficiência de folato e vitamina B12, perdas sangüíneas, dentre outros (Sunder-Plassmann e Hörl, 2001).

Segundo Lash e Smith (1990) a terapia com rHuEPO requer adequados estoques de ferro, vitamina B12 e ácido fólico para obter máxima efetividade, pois apenas terapia com EPO pode levar a uma deficiência de ferro e um aumento na demanda de ácido fólico, provocando deficiência em seus estoques.

A presença de outros elementos como as vitaminas C, D e E comprovadamente também ajuda a melhorar a resposta ao tratamento com EPO. Foi demonstrado que a administração intravenosa de vitamina C diminui a resistência a EPO nos pacientes hemodialisados com deficiência de ferro (Sunder-Plassmann e Hörl, 2001). Está comprovado que a vitamina C aumenta a absorção intestinal de ferro e a mobilização de ferro dos estoques teciduais, melhorando a eritropoiese (Deicher et al., 2004). Mas, altas doses de vitamina C podem levar ao acúmulo de ácido oxálico nos pacientes e, assim, a uma oxalose sistêmica (Cristol et al., 1997). Um recente seminário a respeito do papel de terapias adjuvantes a EPO recomendou que quando houver suspeita de deficiência de vitamina C no paciente, o mesmo deve receber de 1 a 1,5 g via oral por semana ou 300 mg de vitamina C por via intravenosa três vezes por semana, após cada sessão de diálise (Deicher et al., 2004). Através dos prontuários dos pacientes foi verificado que nenhum recebia terapia suplementar de vitamina C.

A deficiência de vitamina D prejudica a resposta a terapia com EPO. Segundo Hörl (1990) os metabólitos da vitamina D aumentam a maturação e proliferação das células-tronco, sugerindo um efeito direto destes compostos sobre a eritropoiese. Logo, o tratamento do hiperparatireoidismo secundário, com calcitriol, poderia melhorar a resposta a EPO e, dessa forma a anemia, via supressão de PHT. Apenas 5 pacientes usavam calcitriol concomitantemente com EPO, sendo que 4 deles apresentaram valores de Hb abaixo dos valores normais.

A deficiência de ferro é comum em IRC, especialmente nos pacientes em hemodiálise. Vários são os motivos, incluindo-se a perda substancial de sangue pelos freqüentes exames de sangue, pela retenção de sangue nas linhas do dialisador durante o procedimento e pelas perdas sangüíneas via trato gastrintestinal. Além disso, o tratamento com EPO aumenta a taxa de eritropoiese e, por conseguinte, a demanda de ferro. Este fato, quando associado à perda de sangue, resulta na dificuldade de manutenção dos níveis ideais de ferro nos pacientes em hemodiálise, pois a quantidade absorvida não consegue compensar a demanda necessária (NKF-K/DOQI, 2000).

A deficiência de ferro tem sido considerada como o fator mais importante para uma resposta inadequada à terapia com EPO. Além disso, o ferro é uma substância essencial para a síntese de Hb. Conseqüentemente, os pacientes devem ser avaliados cuidadosamente para a disponibilidade de ferro, medindo-se o ferro sérico e a capacidade total de ligação ao ferro (TIBC). O ferro sérico e a saturação de transferrina (TSAT) percentual refletem a quantidade de ferro disponível imediatamente para a síntese de hemoglobina. A ferritina sérica reflete o estoque total de ferro do organismo. Um nível baixo de qualquer um destes índices pode indicar a necessidade de suplementação de ferro para sustentar a eritropoiese. Foi demonstrado que a deficiência de ferro está presente em 25 a 37,5% dos pacientes com anemia causada por IRC (Hutchinson e Jones, 1997) e, se for tratada, pode melhorar ou corrigir a anemia, pelo menos temporariamente (Silverberg et al., 1996).

Os níveis de ferro normalmente armazenados no organismo são 800 a 1200 mg (Council of Food and Nutrition, 1968). Se o Ht inicial for 25% e o Ht ideal for 35%, a quantidade de suplemento de ferro necessária para os pacientes durante os 3 primeiros meses do tratamento com EPO é aproximadamente 1000 mg. Dessa quantia, aproximadamente 400 mg de ferro são necessários simplesmente para substituir a perda de ferro durante os 3 meses de hemodiálise, devido principalmente as perdas sangüíneas. Os outros 600 mg de ferro são necessários para auxiliar a produção de número suficiente de eritrócitos para obter-se o Ht/Hb ideais. Uma vez obtida a relação ideal, aproximadamente 400 a 500 mg de suplemento de ferro serão necessários a cada 3 meses para repor as perdas de ferro e manter níveis de ferro adequados (NKF-K/DOQI, 2000).

A deficiência de ferro pode ser prevenida pela suplementação com ferro, disponível em formulações orais e intravenosas. As formulações orais apresentam maior conveniência em relação à administração, mas geralmente não consegue suprir a demanda necessária a eritropoiese devido a insuficiente absorção gástrintestinal do ferro nos pacientes com IRC. A administração intravenosa é melhor tolerada pela maioria dos pacientes e produz resultados mais eficazes (Allegra et al., 1991; NKF-K/DOQI, 2000; Peco-Antic, 2005). Vários estudos documentaram a falha da suplementação de ferro via oral para manter níveis adequados de ferro nos pacientes em hemodiálise tratados com EPO (Hörl et al., 1990; Allegra et al., 1991; Silverberg et al., 1996).

A absorção inadequada de ferro oral também resulta da não aderência dos pacientes a regimes de ferro oral devido à inconveniência da dosagem (1 hora antes ou 2 horas após as refeições para uma absorção ideal) e dos efeitos colaterais, incluindo irritação gástrica e constipação (NKF-K/DOQI, 2000).

Entretanto, uma pequena percentagem dos pacientes em hemodiálise, assim como muitos pacientes em diálise peritoneal e pré-diálise, conseguem manter níveis de ferro adequados utilizando apenas suplementos de ferro via oral, talvez como resultado da maior absorção de ferro intestinal, menores perdas de sangue, e/ou menor necessidade de EPO (Silverberg et al., 1996).

Segundo Fishbane et al. (1995) o ferro por via intravenosa melhora a resposta a EPO e pode reduzir a dose dessa, se utilizada, para obter e manter a Hb e o Ht ideais em pacientes sob hemodiálise. Além disso, vários estudos demonstraram que, mesmo sem o uso de EPO, os índices hematimétricos podem melhorar significativamente em pacientes tratados com doses freqüentes de ferro IV, mas nem sempre atingindo o nível ideal (Allegra et al., 1991; Silverberg et al., 1996).

O protocolo que o Grupo de Trabalho de Anemia recomenda para administração de ferro IV em pacientes adultos em hemodiálise com deficiência de ferro absoluta é de 100 mg de ferro durante cada sessão de diálise, totalizando 10 doses. Para tratamento de manutenção com ferro e tratamento e prevenção de deficiência de ferro funcional, a recomendação é 25 a 100 mg de ferro IV semanalmente, durante 10 semanas, com medida de TSAT e ferritina sérica duas semanas após a décima dose (Rosenlof et al., 1995). A freqüência de tratamento de ferro IV de manutenção pode ser 3 vezes por semana (em cada sessão de hemodiálise), duas vezes por semana, semanalmente ou a cada duas semanas, desde que seja fornecido de 500 a 1000 mg de ferro em 10 semanas. O nível de ferro de manutenção deve ser monitorado medindo o TSAT e a ferritina sérica a cada 3 meses (NKF-K/DOQI, 2000).

Verificou-se que 26 pacientes submetiam-se a terapia com ferro, sendo que 21 por via intravenosa, enquanto que os outros 5 por via oral. Logo, a maioria recebe a terapia mais adequada.

O ácido fólico e a vitamina B12 são essenciais para se obter síntese ideal de Hb. Então, estoques adequados destas vitaminas são imprescindíveis para uma eritropoiese ideal.

Enquanto que a maior parte da literatura disponível sugere que o tratamento eficaz com EPO não requer suplementação concomitante de vitamina B12 e folato, este último é solúvel em água e as perdas no dialisado podem ultrapassar a ingestão nos pacientes desnutridos (Ono e Hisasue, 1992). Alguns estudos, entretanto, sugerem que a administração concomitante de folato melhora a resposta a EPO (Korsetz et al., 2000).

Verificou-se que a grande maioria dos pacientes recebe terapia de reposição com ácido fólico e vitaminas do complexo B, conforme demonstrado na tabela 10, por longos períodos. Assim, acredita-se que a anemia dos pacientes não é causada por deficiência destas vitaminas, embora seja sabido que pacientes sob tratamento dialítico apresentam perdas vitamínicas pelas carências nutricionais e pelo próprio procedimento de hemodiálise (Bohm et al., 1997; Morena et al., 2002). No entanto, não foi objetivo deste trabalho dosar a vitamina B12 e o ácido fólico sanguíneos. Assim, não foi possível se certificar se havia ou não deficiências destes micronutrientes.

**TABELA 10 – Percentagem de pacientes hemodialisados sob terapia de reposição de vitamina B12 e ácido fólico e seus respectivos tempos de uso:**

	<i>Pacientes (%)</i>	<i>Tempo de uso (meses)</i> <i>Média ± desvio padrão</i>
<b>Ácido Fólico</b>	80,55	46,22 ± 24,31
<b>Complexo B</b>	83,33	44,14 ± 25,68

O hiperparatireoidismo ocorre como consequência da diminuição de produção renal de calcitriol, o metabólito ativo da vitamina D, e pela retenção de fosfatos. Com isso há o desenvolvimento de hiperfosfatemia, hipocalcemia e aumento dos níveis do PHT. Esses mesmos fatores, perdurando por muito tempo, causam a hiperplasia da glândula paratireóide e assim, produção autônoma de PHT (Baradan e Nasri, 2001). O aumento do PHT circulante contribui para a ocorrência de osteodistrofia renal, que comprovadamente provoca refratariedade à resposta ao tratamento com rHuEPO (Besarab et al., 2000; Drueke e Eckardt, 2002).

Uma variedade de mecanismos patofisiológicos foram propostos para explicar o papel do hiperparatireoidismo na anemia e resistência a rHuEPO, entre eles o efeito tóxico direto do PHT na proliferação de precursores dos eritrócitos na medula, o antagonismo ao efeito da EPO endógena e exógena, a redução da eritropoiese pela deficiência de calcitriol e efeito direto do PHT na liberação de EPO e na produção, sobrevivência e perda de eritrócitos (Besarab et al., 2000; Drueke, 2001). Contudo, o estudo destes mecanismos tem obtido resultados discrepantes, possivelmente porque o hiperparatireoidismo desempenha papel minoritário na anemia, mascarado por outros fatores de maior impacto (Drueke e Eckardt, 2002). Estudos mais recentes sugerem que o PHT, quando em concentrações excessivas, interfere na eritropoiese normal pela baixa regulação dos receptores de EPO nas células progenitoras na medula óssea (Sikole, 2000). Na IRC este efeito é ainda mais pronunciado pela deficiente produção de EPO.

O tratamento do hiperparatireoidismo com vitamina D, mais especificamente com seu metabólito ativo calcitriol, poderia ter um papel importante no aumento da maturação dos eritrócitos ou nos efeitos da terapia com rHuEPO (Baradan e Nasri, 2001).

Dos 36 pacientes deste estudo, apenas 8 faziam uso de calcitriol, isto é, 22,2%. Entretanto, nenhuma correlação significativa entre os índices hematimétricos dos pacientes e o uso de calcitriol foi encontrada, levando a crer que o hiperparatireoidismo é apenas um dos fatores contribuintes para anemia, mas não ocupa papel de destaque como agente causador desta desordem hematológica.

#### 4.5.2.3 Conseqüências da anemia renal

As principais conseqüências da anemia renal incluem anormalidades fisiológicas tais como decréscimo da quantidade de oxigênio sanguíneo e da tensão de oxigênio tecidual, que resultam em sintomas como fadiga, redução da capacidade de exercício, disfunções cognitivas, sexuais e do sistema imunológico (Eckardt, 2001).

A diminuição do aporte de oxigênio induz a utilização de mecanismos cardiovasculares adaptativos, na tentativa de manter um adequado suporte tecidual de oxigênio. No entanto, esses processos levam ao desenvolvimento de hipertrofia e dilatação do ventrículo esquerdo e isquemia miocárdica, que são fatores de risco

para desenvolvimento de doenças cardiovasculares e morte (Klang et al, 1996; Mann, 1999).

Logo, uma melhora na condição anêmica poderia diminuir os riscos cardiovasculares e, assim, aumentar a sobrevivência dos pacientes (Schärer et al., 1993; Kuriyama et al., 1997). Além disso, existem evidências crescentes de que o aumento e ou normalização das taxas de Hb poderia melhorar consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes, beneficiando-os em vários aspectos.

Entretanto, segundo Besarab et al. (1998) os resultados obtidos até hoje com a adoção desta medida são inconsistentes e contraditórios. Ao invés de promover uma melhora do estado geral pode, de maneira inversa, aumentar os riscos de eventos trombóticos, em especial na fístula arteriovenosa, de hipertensão arterial e aumento das chances de eventos cardiovasculares diversos (Laupacis, 1991; Besarab et al., 1998; Valderrabano, 2001). Além disso, a melhora hematológica implica, também, em aumento nas despesas com a terapia, já que a rHuEPO é um medicamento de alto custo e fundamental para o tratamento (Valderrabano et al., 2001).

Portanto, ainda não existe um consenso a respeito deste assunto. Alguns pesquisadores defendem a idéia da total correção das taxas de Hb, enquanto que outros recomendam apenas a correção parcial. Percebe-se que este tema continua sob constante debate, na busca da terapia mais adequada e que garanta os maiores benefícios aos pacientes.

A Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) recomendava, até recentemente, que os níveis de Hb e Ht fossem mantidos em torno de 10 g/dl e 30 %, respectivamente. Mas, atualmente ela preconiza a manutenção destes índices entre 11 e 12 g/dl para Hb e entre 33 e 36% de Ht. Observa-se que a SBN não indica a normalização dos índices hematimétricos por falta de evidências comprobatórias a respeito da segurança destes procedimentos (Abensur e Alves, 2000).

As duas instituições de saúde responsáveis pelo tratamento dos pacientes com IRC em questão neste trabalho seguem as determinações preconizadas pela SBN, isto é, propõem a correção parcial da anemia até que os níveis de Hb e Ht alcancem os valores indicados anteriormente.

Sendo assim, é necessária uma re-análise dos índices hematimétricos para que se possa avaliar quantos indivíduos encontram-se dentro ou fora dos limites especificados e, dessa forma, tentar estabelecer uma correlação entre a eficácia tera-

pêutica e os resultados clínicos obtidos para cada paciente. Os resultados são apresentados a seguir, nas tabelas 11 e 12.

**TABELA 11 – Percentual dos pacientes hemodialisados em relação aos níveis estratificados de Hb:**

<b>Hb (g/dl)</b>	<b>&lt; 11</b>	<b>11- 12</b>	<b>&gt; 12</b>
<b>Mulheres</b>	25%	13,8%	13,8%
<b>Homens</b>	8,3%	16,6%	22,2%
<b>Total de Pacientes</b>	<b>33,3%</b>	<b>30,5%</b>	<b>36,11%</b>

**TABELA 12 – Percentual dos pacientes hemodialisados em relação aos níveis estratificados de Ht:**

<b>Ht (%)</b>	<b>&lt;33</b>	<b>33 - 36</b>	<b>&gt; 36</b>
<b>Mulheres</b>	19,5%	2,8%	30,5%
<b>Homens</b>	8,3%	11,1%	27,8%
<b>Total de pacientes</b>	<b>27,8%</b>	<b>13,9%</b>	<b>58,3%</b>

Através destes dados é possível observar que a maior parte dos pacientes apresenta valores inferiores ou superiores aos que são preconizados, ou seja, a maioria encontra-se fora da faixa de concentração ideal. Em relação à Hb, menos de um terço dos pacientes possui concentrações entre 11 e 12 g/dl. Dessa forma, é possível inferir que a maioria destes pacientes encontra-se em níveis de risco maior para ocorrência de eventos trombóticos e cardiovasculares, mesmo possuindo um adequado acompanhamento terapêutico.

#### **4.6 Avaliação do estresse oxidativo**

Várias evidências têm indicado que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS/ERNS) estão envolvidas na toxicidade urêmica dos pacientes com doença renal crônica em estágio final, sobretudo os pacientes submetidos à hemodiálise (Lim et al., 1999; Morena et al., 2002). Além disso, estes pacientes estão constante e cronicamente expostos ao estresse oxidativo resultante da interação de

neutrófilos e outros componentes sangüíneos com as membranas dialíticas, produzindo grandes quantidades de EROS/ERNS (Himmelfarb et al., 1991) ou ainda pela perda de antioxidantes através do procedimento dialítico e em consequência de problemas nutricionais (Bohm et al., 1997; Galli et al., 1999).

Esse fato é demonstrado em estudos que comprovam, por exemplo, o aumento das concentrações plasmáticas e eritrocitárias de MDA, o principal produto da peroxidação lipídica, em pacientes sob hemodiálise (Dasgupta et al., 1992; Loughrey et al., 1994; Peuchant et al., 1994), assim como a redução dos níveis de antioxidantes como a GSHPx (Ceballos-Picot et al., 1996), a vitamina C (Loughrey et al., 1994) e a vitamina E (Peuchant et al., 1994). Estes estudos evidenciaram o aumento do estresse oxidativo em pacientes hemodialisados, seja pelo aumento da peroxidação lipídica via espécies reativas, seja pelo decréscimo dos níveis de antioxidantes.

Estando o estresse oxidativo diretamente relacionado a vários processos patológicos como aterosclerose – e, por conseguinte, a doenças cardio e cerebrovasculares -, infecções, diabetes, câncer, anemia, dentre outros (Halliwell, 1994; Hasselwander e Young, 1998; Tetta et al., 1999), ele contribui diretamente para o aumento da morbi-mortalidade dos pacientes com IRC sob hemodiálise (Ward e McLeish, 2003). Dessa forma, a avaliação do estresse oxidativo nestes pacientes torna-se totalmente justificável.

A detecção direta das EROS/ERNS em sistemas biológicos é dificultada por suas concentrações extremamente baixas (da ordem de  $10^{-11}$ M) e por suas altas velocidades de reação, chegando a ponto de as taxas de produção serem iguais às taxas de reação com biomoléculas (Floyd, 1990). Entretanto, é possível quantificá-las por meio de ressonância para-magnética, mas o custo e outras limitações desta técnica dificultam seu uso rotineiro (Ferreira e Matsubara, 1997).

Os métodos mais utilizados para determinar o estresse oxidativo são aqueles que medem de forma indireta as EROS/ERNS, isto é, medindo-se as lesões oxidativas provocadas, a formação de produtos resultantes da peroxidação lipídica ou mensurando a concentração de compostos antioxidantes (Ferreira e Matsubara, 1997; Urso e Clarkson, 2003).

O MDA é comumente determinado pela reação de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Este método é um dos mais utilizados para avaliar a peroxidação lipídica no organismo (Kohen e Niska, 2002). Mesmo não sendo total-

mente específico para o MDA, esse método o tem como principal molécula reagente ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (Janero, 1990) que após reação, forma uma coloração rósea facilmente mensurável por espectrofotometria (Kohen e Niska, 2002). Logo, o resultado obtido fornece uma idéia do grau de peroxidação lipídica ocorrida.

A determinação da glutathiona sangüínea pode fornecer importantes informações bioquímicas do balanço oxidante-antioxidante no organismo e, ao mesmo tempo, permitir correlações clínico-laboratoriais com processos patológicos nos quais a sua quantificação pode ser um indicador indireto dos níveis de peroxidação lipídica. Sendo assim, sua mensuração em pacientes com IRC sob hemodiálise pode contribuir de forma direta para o entendimento do estresse oxidativo nestes pacientes.

A ALA-D é uma enzima dependente de zinco que participa da biossíntese do grupo heme, sendo essencial a todos os organismos aeróbios. Além disso, ela requer, impreterivelmente, grupos tiólicos reduzidos para exercer sua atividade enzimática (Fukuda et al., 1988). Por conta desta característica, ela tem sido sugerida como um marcador do estresse oxidativo, uma vez que seus grupos sulfidrílicos ativos (-SH) são altamente sensíveis a oxidantes ou situações associadas a excessiva produção de radicais livres (Emanuelli et al., 1996; Maciel et al., 2000; Folmer et al., 2002; Soares et al., 2002, Nogueira et al., 2003b), que prejudicam sua atividade (Rodrigues et al., 1989; Rocha et al., 1993, 1995, 2004; Farina et al., 2001). A inibição de seus grupos sulfidrílicos leva a inibição da enzima e, assim, a distúrbios na síntese do heme, bem como ao acúmulo de alguns intermediários da rota de síntese, que podem induzir eventos pró-oxidantes (Pereira et al., 1992; Bechara et al., 1993; Emanuelli et al., 2001).

A hemoglobina (Hb) é uma ferriproteína que se liga, de forma reversível, ao oxigênio. É responsável pelo transporte do mesmo aos tecidos e pelo transporte do CO<sub>2</sub> aos pulmões, mantendo sempre o ferro em seu estado ferroso (Fe<sup>+2</sup>), uma condição necessária a sua função. No processo de ligação ao oxigênio, a hemoglobina forma oxihemoglobina, que torna-se um complexo denominado superoxi-ferriheme (Fe<sup>+3</sup> O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e quando libera o oxigênio no tecido, o ferro presente no heme é restaurado ao seu estado ferroso (Fe<sup>+2</sup>). Entretanto, baixos níveis de oxigênio e a presença de superóxido resulta na oxidação da Hb a metemoglobina (MHb), onde o ferro se apresenta na forma de Fe<sup>+3</sup>, sendo incapaz de carrear o oxigênio (Coleman, 2000).

Sabe-se que a membrana dos eritrócitos possui uma quantidade considerável de grupos tiólicos que podem sofrer oxidação levar a desnaturação das proteínas da membrana. Neste processo pode ocorrer oxidação da Hb a MHb (Rice-Evans et al., 1987; Winterbourn, 1990).

Sendo assim, foram determinados parâmetros como TBARS, GSH eritrocitária, atividade da enzima ALA-D e metemoglobinemia percentual com o intuito de avaliar o estresse oxidativo nos pacientes hemodialisados. Os resultados são apresentados a seguir na tabela 13.

**TABELA 13 – Determinação de TBARS ( $\mu\text{g/l}$ ), GSH eritrocitária ( $\mu\text{mol/g Hb}$ ), atividade da enzima ALA-D ( $\mu\text{mol PBG/h/l}$ ) e MHb (%) em pacientes e controles, em média  $\pm$  desvio padrão:**

		<i>Média Geral</i>	<i>Homens</i>	<i>Mulheres</i>
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{g/l}$ )	Controles	0,66 $\pm$ 0,14	0,74 $\pm$ 0,16	0,59 $\pm$ 0,16
	Pacientes	1,19 $\pm$ 0,19 *	1,18 $\pm$ 0,20 *	1,21 $\pm$ 0,20 *
<b>GSH</b> ( $\mu\text{mol/g Hb}$ )	Controles	5,75 $\pm$ 1,36	4,79 $\pm$ 0,96	6,71 $\pm$ 0,97
	Pacientes	8,21 $\pm$ 1,79 *	7,80 $\pm$ 1,89 *	8,58 $\pm$ 1,65 *
<b>ALA-D</b> ( $\mu\text{molPBG/h/l}$ )	Controles	20,13 $\pm$ 4,82	21,83 $\pm$ 3,59	18,53 $\pm$ 5,45
	Pacientes	7,55 $\pm$ 4,08 *	8,76 $\pm$ 4,25 *	6,46 $\pm$ 3,71 *
<b>MHb</b> (%)	Controles	0,49 $\pm$ 0,14	0,48 $\pm$ 0,19	0,50 $\pm$ 0,07
	Pacientes	0,62 $\pm$ 0,18 *	0,61 $\pm$ 0,17 *	0,63 $\pm$ 0,20 *

\*  $p < 0,05$  em relação aos controles

Os resultados obtidos pela determinação do TBARS mostram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do mesmo nos pacientes, comprovando a ocorrência de peroxidação lipídica. Estes dados correspondem aos reportados na literatura por vários trabalhos (Dasgupta et al., 1992; Loughrey et al., 1994; Peuchant et al., 1994; Ongajooth et al., 1996; Ong-Awyooth et al., 1997; Nguyen-Khoa et al., 2001).

Os resultados da GSH demonstram haver um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) deste tiól nos eritrócitos dos pacientes, sendo condizentes com resultados encontrados por outros autores (Mimic-Oka et al., 1988; Mimic-Oka et al., 1992; Jacobson e Moldeus, 1994; Lucchi et al., 2005) embora alguns trabalhos relatem uma significativa redução nas concentrações de GSH nos hemodialisados (Vanella et al., 1983; Ceballos-Picot et al., 1996; Nguyen-Khoa et al., 2001; Ozden et al., 2002) ou níveis normais da mesma (Smith e Berkseth, 1990).

Usualmente, a GSH é o mais importante e abundante composto tiólico celular e é um antioxidante que protege as células contra os efeitos deletérios de EROS e outros compostos tóxicos (Lim et al., 1999). Por conta dessas suas importantes funções, Lucchi et al. (2005) sugerem que o aumento das concentrações eritrocitárias da GSH seja uma resposta ao aumento do estresse oxidativo. Por meio de um mecanismo adaptativo ao estresse oxidativo ocorreria um aumento da produção de GSH, na tentativa de compensar os danos que o mesmo provoca nos eritrócitos. O aumento também poderia estar relacionado a utilização de suplementação com ferro pelos pacientes, uma vez que encontrou-se uma correlação positiva significativa ( $p < 0,05$ ) entre a GSH e o ferro ( $r = 0,35$ ).

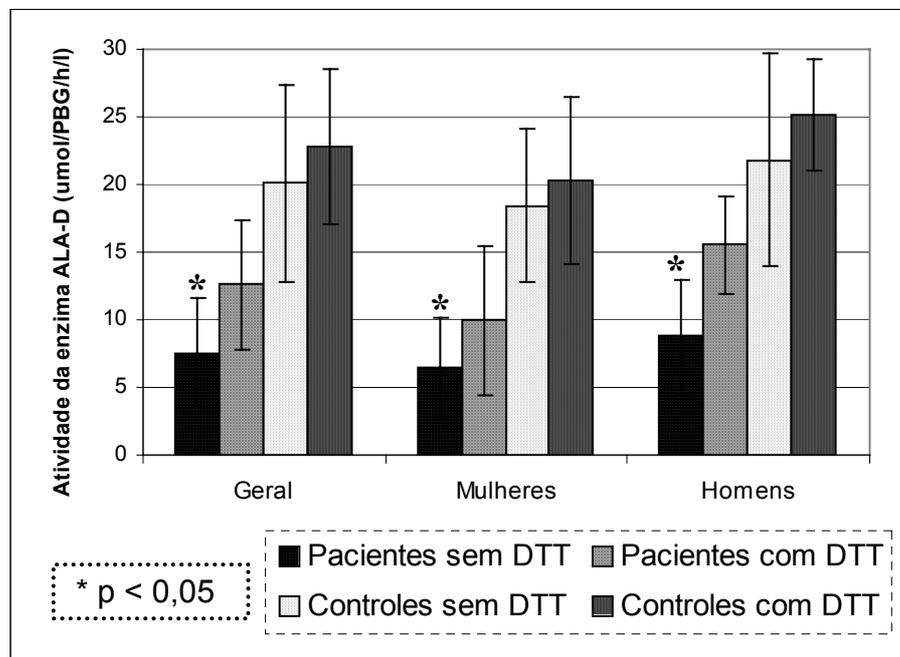
Já os estudos que relatam uma diminuição das concentrações deste tiól sugerem que sua depleção se dá em consequência da diminuição da síntese de GSH e/ou de um aumento do seu consumo e de sua degradação pelo fato de seus precursores (glicina, glutamato e cisteína) estarem em quantidades elevadas ou normais no plasma dos pacientes (Ceballos-Picot et al., 1996).

Portanto, os níveis de glutathiona eritrocitária nos pacientes hemodialisados ainda são muito contraditórios e conflitantes. São necessários mais estudos elucidativos a respeito deste assunto, pois tanto o real *status* de sua concentração quanto às explicações para seu aumento ou diminuição ainda não estão esclarecidos em se tratando de pacientes com IRC submetidos à hemodiálise.

De fato, sabe-se que há um grande aumento na formação de espécies reativas tanto na uremia quanto no procedimento dialítico e no tratamento dos pacientes, conforme já demonstrado (Himmelfarb et al., 1991; Luciak e Trznadel, 1991; Loughrey et al., 1994).

Em relação a ALA-D, é possível observar que a atividade da enzima nos pacientes está significativamente diminuída em relação aos controles ( $p < 0,05$ ), conforme resultados já relatados na literatura (Guolo et al., 1999).

O ditiotreitól (DTT) é um composto sulfidrílico capaz de prevenir ou reverter a inibição dos grupos tiólicos através de sua habilidade em reduzir os grupos –SH oxidados da enzima (Nogueira et al., 2003c; Gabriel et al., 2005). Baseados nessa propriedade, vários estudos *in vitro* foram realizados, em animais de laboratório, para demonstrar a capacidade de reversão do DTT sobre a inibição da atividade da enzima (Vieira et al., 2000; Nogueira et al., 2003c; Gabriel et al., 2005). A tentativa de reverter à inibição da enzima em pacientes hemodialisados foi realizada simultaneamente à determinação da atividade enzimática e os resultados obtidos são apresentados na figura 6.



**Figura 6. Comparação entre a atividade da enzima ALA-D em pacientes hemodialisados e controles com e sem incubação com o agente redutor DTT.**

Após a reativação com DTT, a atividade média da enzima foi de  $12,6 \pm 7,27$   $\mu\text{mol PBG/h/L}$ , sendo de  $15,57 \pm 7,85$   $\mu\text{mol PBG/h/L}$  nos homens e  $9,93 \pm 5,67$   $\mu\text{mol PBG/h/L}$  nas mulheres. Já nos IS, as médias foram de  $26,76 \pm 5,72$   $\mu\text{mol PBG/h/L}$  no geral e  $25,21 \pm 4,12$  e  $20,31 \pm 6,23$   $\mu\text{mol PBG/h/L}$  em homens e mulheres, respectivamente.

Observou-se um aumento de 66,9% na atividade da enzima quando avaliada em presença de DTT. Mesmo sendo considerado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ),

ainda assim a atividade da enzima não foi considerada normal, se comparada à atividade dos controles.

Esse fato nos leva a crer que vários fatores podem provocar a inibição da ALA-D em pacientes hemodialisados, e não apenas as espécies reativas que se formam. Sabe-se que a atividade da ALA-D pode ser inibida pela presença de alumínio (Vieira et al., 2000) e outros metais como mercúrio (Rocha et al., 1995; Nogueira et al., 2002a), chumbo (Rodrigues et al., 1989), cobre (Nelson et al., 1981), selênio e telúrio (Maciel et al., 2000; Farina et al., 2001). Já foi demonstrado experimentalmente que o alumínio encontra-se em níveis aumentados em pacientes com IRC sob hemodiálise (Navarro et al., 1988; Jaffe et al., 2005), em virtude, por exemplo, da contaminação da água utilizada na preparação das soluções dialíticas (Navarro et al., 1988), acumulando-se no organismo por sua deficiente eliminação (Parkinson et al., 1981).

Outra hipótese seria a diminuição da atividade da enzima em decorrência da deficiência de zinco, um elemento essencial para a funcionalidade da mesma. Embora esse metal não tenha sido quantificado neste trabalho, existem relatos de que há deficiências do Zn em pacientes com nefropatias crônicas devido a um aumento de sua excreção fecal ou diminuição de sua absorção (Kimmel et al., 1988; Mahajan et al., 1989), mas esse fato ainda é controverso, pois alguns trabalhos que determinaram este metal em pacientes hemodialisados encontraram valores semelhantes, sem diferença significativa em relação aos controles (Cabral et al., 2005).

O fato de a atividade da enzima não ter sido totalmente restaurada pelo DDT nos faz supor que outros mecanismos poderiam estar envolvidos na diminuição de sua atividade, incluindo diminuição de sua síntese ou inibição de outros grupamentos da enzima, os grupamentos não tiólicos, ou ainda por outros fatores peculiares a 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 aproximada de 56,2 kD poderia provocar a inibição da atividade da ALA-D em pacientes urêmicos.

Em relação à determinação de metemoglobina, os resultados encontrados nos pacientes são significativamente mais elevados ( $p < 0,05$ ) que dos controles, demonstrando haver uma maior oxidação irreversível da hemoglobina a metemoglobina nestes pacientes. Este fato é corroborado pela significativa correlação negativa entre a Mhb com a Hb e com o Ht. Atribui-se o aumento da Mhb nos pacientes,

supostamente, ao aumento do estresse oxidativo a que estes estão sujeitos e, por conseguinte, a um maior índice de lesão nas membranas dos eritrócitos e lesões intracelulares, que levam a oxidação da Hb à MHb (Winterbourn, 1990), embora não tenha sido evidenciado nenhuma correlação significativa entre MHb e TBARS. Apesar de evidenciado um aumento na metemoglobinemia dos pacientes, os valores encontrados permanecem dentro dos limites referenciais de normalidade, que aceita valores de até 1,5% de MHb.

#### **4.7 Dosagem da homocisteína**

A homocisteína (ácido 2-amino-4-mercaptobutírico) é um aminoácido não-essencial formado exclusivamente durante o metabolismo da metionina, um aminoácido essencial oriundo de proteínas da dieta e um componente importante do sistema orgânico de transferência de grupos metila (Miner et al., 1997).

Em humanos, de 15 a 20 mmol de Hcy são sintetizados diariamente, mas grande parte é convertida em cisteína, sob controle enzimático da cistationina  $\beta$ -sintase, ou em metionina, principalmente por ação da enzima metionina sintase. Dessa forma, os níveis plasmáticos de Hcy se mantêm regulados, em concentrações basais que variam de 5 a 15  $\mu\text{mol/l}$ , com níveis médios de 10  $\mu\text{mol/l}$ . Mas concentrações acima de 15  $\mu\text{mol/l}$  caracterizam a hiper-homocisteinemia (Kang et al., 1992; Hankey e Eikelboom, 1999).

Em 1969, McCully constatou a presença de aterosclerose grave e trombose arterial extensa durante a autópsia de 2 crianças que apresentavam elevadas concentrações de Hcy plasmática e homocistinúria. Com base em suas observações, propôs que a HHcy poderia causar doença vascular aterosclerótica (McCully, 1969). Sua teoria foi inicialmente ignorada, porém, durante os últimos anos, a hipótese de associação entre HHcy e doenças vasculares ateroscleróticas cresceu exponencialmente, fundamentada em estudos que evidenciaram nitidamente os efeitos aterogênicos e trombóticos da HHcy, sugerindo que esta condição aumenta os riscos de doenças arteriais coronarianas, derrame cerebral, doenças vasculares oclusivas e trombose venosa profunda (Stampher et al., 1992; Perry et al., 1995; den Heijer et al., 1998a; Stein e McBride, 1998; Tayler et al., 1999).

Estudos epidemiológicos sugerem que níveis elevados de Hcy, mesmo que moderados, aumentam o risco para doenças cardiovasculares, independentemente

de fatores de risco clássicos como níveis elevados de colesterol total e LDL, baixos níveis de HDL, hipertensão arterial, tabagismo, diabetes mellitus e obesidade (Berenson et al. 1998; Washington, 1999). Logo, a HHcy têm sido considerada um fator de risco independente para aterosclerose em pacientes com IRC submetidos a hemodiálise (Bachmann et al., 1995).

Os resultados da determinação da Hcy nos pacientes hemodialisados e controles são apresentados a seguir, na tabela 14.

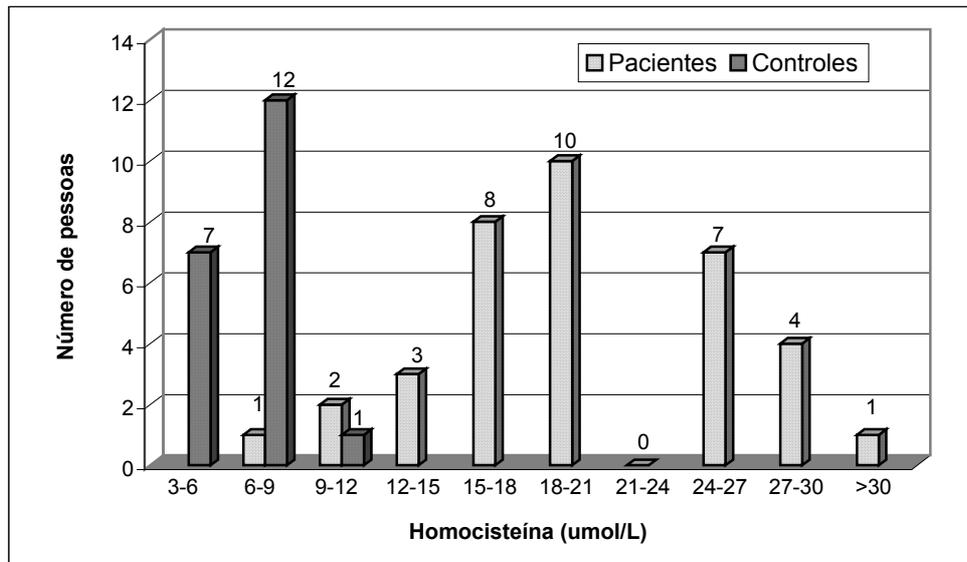
**TABELA 14 - Resultados da Hcy plasmática ( $\mu\text{mol/l}$ ) em pacientes hemodialisados e controles, em média  $\pm$  desvio padrão:**

	<i>Média Geral</i>	<i>Homens</i>	<i>Mulheres</i>
<b>Controles</b>	6,77 $\pm$ 1,53	7,22 $\pm$ 1,47	6,31 $\pm$ 1,52
<b>Pacientes</b>	20 $\pm$ 5,87*	21,47 $\pm$ 4,61*	18,69 $\pm$ 6,66*

\*  $p < 0,05$  em relação aos controles

É possível observar que os pacientes apresentaram concentrações plasmáticas de Hcy significativamente mais elevadas que os indivíduos saudáveis ( $p < 0,05$ ), tanto se comparadas às médias gerais quanto às médias diferenciadas por sexo em cada grupo. Observa-se que a concentração plasmática de Hcy nos pacientes foi aproximadamente 3 vezes maior, mantendo-se um aumento proporcional médio de 2,96 vezes, tanto na média geral quanto nas médias por sexo.

Pode-se inferir que, de maneira geral, os pacientes apresentam hiper-homocisteinemia. A distribuição estratificada dos níveis de Hcy, tanto dos 36 pacientes quanto dos 20 controles, é apresentada na figura 7.



**Figura 7 - Distribuição das concentrações de Hcy (µmol/l) nos pacientes hemodialisados e controles.**

Considerando-se como HHcy concentrações plasmáticas de Hcy > 15 µmol/l é possível observar que 30 pacientes, isto é, 83,33% apresentam HHcy. A faixa de Hcy que concentra o maior número de pacientes é a de 18 a 21 µmol/l. Já o grupo controle encontra-se totalmente dentro da faixa de normalidade, com todos indivíduos apresentando concentrações inferiores a 10 µmol/l.

Vários estudos têm encontrado altos níveis de Hcy em todas as fases da doença: não dialítica (Jungers et al., 1999), dialítica (Bachmann et al., 1995) e pós-transplante (Machado et al., 2000).

A HHcy pode ocorrer como resultado de desordens hereditárias das principais enzimas, bem como de deficiências nutricionais de co-fatores vitamínicos, envolvidos no metabolismo da Hcy. Ainda, podem resultar de doenças, fatores fisiológicos, medicamentos ou de hábitos de vida (Refsum et al., 1998; Eikelboom et al., 1999). Entretanto, o mecanismo para ocorrência de HHcy na IRC ainda não está totalmente elucidado (Boston e Lathrop, 1997).

Nos pacientes com IRC, o aumento das concentrações plasmáticas de Hcy é atribuído, geralmente, à redução da função renal. Algumas teorias, de maneira oposta, propõem que são os aumentos de Hcy que causam insuficiência renal, entretanto, têm sido questionadas por resultarem de estudos sem relevância, sugerindo que a Hcy plasmática não é um significativo preditor de declínio na função renal em todos os casos (Sarnak et al., 2002). Além disso, também se baseiam em

observações de que a falência renal não é uma característica comum aos pacientes com homocistinúria, um termo aplicado a um grupo de deficiências enzimáticas em que os níveis de Hcy encontram-se suficientemente aumentados para provocar sua elevada excreção urinária (McCully, 1969).

Segundo Van Guldener (2005) como a IRC está estreitamente correlacionada aos níveis plasmáticos de Hcy seria lógico presumir que a Hcy é filtrada e excretada normalmente pelos rins e que diminuições da função renal levariam a distúrbios neste processo. Entretanto, apenas uma pequena quantidade de Hcy é normalmente encontrada na urina, sendo a taxa de filtração menor que 1%. Cerca de 99% são reabsorvidas pelas células tubulares e subseqüentemente metabolizados. Sendo assim, uma redução da função excretora renal não explicaria a HHcy na IRC.

A capacidade do rim em captar e metabolizar a Hcy é evidenciada pela habilidade do mesmo em filtrar moléculas pequenas, pela baixa concentração urinária deste aminoácido, pela presença de carreadores tubulares específicos e de todas as enzimas necessárias ao metabolismo da Hcy neste órgão (Blom e Vriese, 2002).

Um estudo a respeito da cinética da Hcy em pacientes hemodialisados encontrou uma redução de 70% na depuração total de Hcy, relacionada ao prejuízo na captação e no metabolismo renal deste aminoácido, sugerindo que a HHcy não resulta de um aumento de sua liberação celular para o plasma, mas sim de sua prejudicada remoção do compartimento plasmático devido a disfunção renal (Guttormsen et al., 1997).

Ainda não foram elucidadas as vias metabólicas da Hcy em que ocorrem interferências da doença renal. Um estudo realizado por Van Guldener et al. (1999) utilizou isótopos estáveis para pesquisar o metabolismo renal da Hcy em hemodialisados. Foi demonstrado que as vias de remetilação e transmetilação (formação de Hcy a partir da metionina) estão significativamente diminuídas, quando comparadas às de indivíduos saudáveis. A via de transulfuração não pareceu estar afetada, levando os autores a sugerir que distúrbios na via da remetilação é um fator importante para explicar a HHcy na IRC e que, provavelmente, a deficiência e/ou resistência ao folato e vitamina B12 estejam envolvidas.

Entretanto, segundo Allen et al. (1993) as concentrações séricas de folato, vitamina B12 e vitamina B6 geralmente encontram-se em níveis normais em pacientes renais, enquanto que a serina, um aminoácido necessário à transulfuração e também ao ciclo do folato – indispensável para remetilação da Hcy – está em níveis

diminuídos. Já a betaína, também envolvida na doação de metilas para remetilação da Hcy, apresenta níveis normais, bem como seu produto demetilado, a dimetilglicina. Estas observações podem ajudar a explicar as alterações do metabolismo renal da Hcy.

Existem numerosos relatos de HHcy em indivíduos com deficiência nutricional de vitaminas B6, B12 e folatos, assim como correlação negativa entre os níveis séricos das mesmas e valores plasmáticos de Hcy (Selhub et al., 1993; Verhoef et al., 1996). Selhub et al. (1993) afirmam que concentrações séricas inadequadas de uma ou mais vitaminas do complexo B são fatores contribuintes para aproximadamente dois terços de todos os casos de HHcy. A suplementação com uma, essencialmente folato, ou diferentes combinações de vitaminas B6, B12 e folato têm alcançado êxito na redução dos níveis plasmáticos de Hcy (Den Heijer et al., 1998b).

Entretanto, pacientes com IRC geralmente apresentam quantidades adequadas de folatos e vitaminas B12 e B6, embora haja relatos de deficiências sub-clínicas de vitamina B12. Portanto, deficiências destas vitaminas não são apontadas como fator principal na patogênese da HHcy na insuficiência renal. Segundo Van Guldener (2005) pacientes com HHcy tratados com altas doses de multivitamínicos não tiveram suas concentrações plasmáticas de Hcy normalizadas. Como o tratamento com ácido fólico (mesmo em altas doses) não reverteu a HHcy na insuficiência renal, surgiram hipóteses de alteração no metabolismo dos folatos por inibição da sua captação intestinal e/ou celular ou por prejuízos na conversão do folato em sua forma ativa. Entretanto, Ghandour et al. (2002) demonstraram não haver melhora na HHcy de pacientes com IRC quando comparadas a administração intravenosa de compostos ativos de folato e tratamento oral com ácido fólico sintético.

Outra hipótese sugerida no envolvimento da HHcy é a própria condição urêmica a qual os pacientes estão submetidos, que resulta em um acúmulo anormal de substâncias que podem estar interferindo no metabolismo extra-renal da Hcy. Acredita-se que pode haver a presença de enzimas inibitórias e/ou menor quantidade de co-fatores e substratos essenciais ao metabolismo (Dennis e Robinson, 1996).

Apesar de não terem sido determinadas as concentrações séricas de folatos e vitaminas B12 e B6, realizou-se um levantamento a respeito da utilização de suplementação vitamínica com os mesmos pelos pacientes, bem como o seu respectivo tempo de utilização, em meses. Foi possível observar que 80,5% dos pacientes era submetida à terapia com ácido fólico, por um tempo médio de  $46,22 \pm 24,31$  meses.

O complexo B, um suplemento vitamínico que contém as vitaminas B12 e B6, dentre outras, era utilizado por 83,3% dos pacientes hemodialisados, por  $44,14 \pm 25,68$  meses. Ainda, 72,2% utilizavam os dois medicamentos de forma concomitante.

Portanto, a probabilidade da HHcy ser originada por deficiências vitamínicas é muito reduzida, mas não totalmente excluída. Sabe-se que na rotina clínica destes pacientes, a determinação sérica destas vitaminas não é realizada e, sendo assim, pode haver deficiências que contribuam para os aumentos da Hcy plasmática.

A dosagem de ácido fólico e complexo B é regulada de acordo com observações hematológicas mensais de cada pacientes. Periodicamente são determinados hematócrito, hemoglobina e contagem total de eritrócitos, que são fundamentais para monitorização da eritropoiese. Como nestes pacientes estas vitaminas são utilizadas unicamente com finalidade eritropoética, sua prescrição é regulada de acordo com a resposta hematológica de cada um e adequadas conforme necessidades individuais.

Além disso, a conclusão de que nestes pacientes não há relação entre a HHcy e estas vitaminas é baseada em observações estatísticas, que demonstraram não haver correlações significativas entre a utilização ou não destes medicamentos e a HHcy apresentada pelos pacientes, nem mesmo se relacionados os tempos de utilização dos medicamentos.

Também foi investigada a influência de fatores fisiológicos como sexo e idade e hábitos de vida como tabagismo, alcoolismo e atividades físicas. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada quando comparadas as concentrações plasmáticas de Hcy dos pacientes em relação aos fatores mencionados.

## **5. CONCLUSÕES**

De acordo com resultados obtidos, pôde-se verificar que grande parte dos pacientes hemodialisados avaliados neste trabalho apresentam co-morbidades importantes como hipertensão, diabetes mellitus e anemia e, de acordo com as concentrações de Hb, boa parte dos pacientes apresentou valores considerados de risco para ocorrência de eventos cardiovasculares, segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia.

A determinação de marcadores do estresse oxidativo demonstrou aumento significativo no TBARS plasmático, GSH eritrocitária e MHB sangüínea dos pacientes hemodialisados, bem como diminuição significativa da atividade sangüínea da enzima ALA-D e aumento significativo na reativação da atividade enzimática após incubação com DTT.

Também foi possível verificar hiper-homocisteinemia na maior parte dos pacientes hemodialisados, provavelmente por mecanismos não relacionados à suplementação vitamínica com ácido fólico e vitaminas do complexo B.

Nenhuma correlação significativa entre o tempo de hemodiálise, presença de co-morbidades, capacidade de realização de atividades físicas simples ou hábitos dos pacientes foi encontrada quando relacionados aos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo ou homocisteinemia.

O papel de medicamentos como eritropoetina, ferro, vitamina B12 e ácido fólico não pôde ser totalmente esclarecido. Nenhuma diferença significativa nos marcadores do estresse foi evidenciada quando relacionados ao uso ou não destes medicamentos.

Portanto, o que se sabe é que há aumento do estresse oxidativo e este fato compromete diretamente a qualidade de vida e aumenta a morbi-mortalidade destes pacientes, embora recebam acompanhamento médico, assim como o tratamento medicamentoso. Talvez, a instituição de medidas terapêuticas simples como suplementação com vitaminas E e C e um melhor acompanhamento nutricional poderiam melhorar o quadro geral dos pacientes e diminuir os altos índices de mortalidade, que são de 10 a 20 vezes maiores em pacientes com IRC que na população em geral.

## **6. APÊNDICES**

## APÊNDICE A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,....., fui convidado(a) pela profa. Dra. Solange Cristina Garcia Pomblum a fazer parte de um trabalho científico intitulado "Estudo do estresse oxidativo em pacientes submetidos ao tratamento de hemodiálise e sua inter-relação com os níveis eritrocitários de glutathione". Fui esclarecido que minha participação é de livre e espontânea vontade e que caso aceite, será realizada apenas uma coleta de 10 ml de sangue venoso, com o mínimo de risco já conhecido para esta técnica. Estou ciente de que nada receberei e nem pagarei em troca, assim como poderei desistir de fazer parte do trabalho a qualquer momento. Fui esclarecido também que esses exames têm por objetivo colaborar para um possível acompanhamento do estresse oxidativo em pessoas submetidas ao tratamento de hemodiálise.

Santa Maria, 30 de setembro de 2004.

---

Assinatura do paciente ou responsável

**APÊNDICE B****QUESTIONÁRIO**

Data:...../...../.....

NOME:.....

PRONTUÁRIO (N°):.....

Grupo: ( ) Estudo ( ) Controle

Sexo: ( ) F ( ) M

Idade:.....

Precedentes familiares para doenças vasculares: ( ) Sim ( ) Não

Tempo de hemodiálise:.....

Tabagismo: ( ) Fumante ( ) Não fumante ( ) Ex-fumante

Uso de álcool: Diariamente: ( ) Sim ( ) Não

Esporadicamente: ( ) Sim ( ) Não

Diabetes: ( ) Sim ( ) Não

Pressão alta: ( ) Sim ( ) Não

Medicamento antihipertensivo:.....

Dislipidemia: ( ) Sim ( ) Não

Creatinina sérica:.....

Eritropoetina: ( ) Sim ( ) Não

Exercícios físicos: ( ) Sim ( ) Não. Frequência: .....

Multivitaminas: ( ) Sim ( ) Não. Qual: .....

Ácido Fólico: ( ) Sim ( ) Não

Vitamina B<sub>12</sub>: ( ) Sim ( ) Não

Vitamina C: ( ) Sim ( ) Não

Vitamina E: ( ) Sim ( ) Não

Outros medicamentos: .....

.....

OBS:.....

---

 Responsável pela coleta dos dados

## APÊNDICE C

Correlações (coeficiente de Pearson) obtidas através de análise estatística dos dados.

	TH	IDADE	GSH	TBARS	Hcy	Ht	Hb	MHb	ALA-D SEM DTT	ALA-D COM DTT
TH	1,0000	0,1030	0,1268	0,0971	0,1686	0,2147	0,1590	-0,2207	<b>0,3439</b>	0,2978
	p=----	p=0,550	p=0,461	p=0,573	p=0,326	p=0,209	p=0,354	p=0,196	<b>p=0,040</b>	p=0,078
IDADE	0,1030	1,0000	<b>-0,3730</b>	0,0301	-0,0911	0,1706	0,2462	0,0158	-0,1545	0,0322
	p=0,550	p=----	<b>p=0,025</b>	p=0,862	p=0,597	p=0,320	p=0,148	p=0,927	p=0,368	p=0,852
GSH	-0,2192	<b>-0,3730</b>	1,0000	0,1595	0,2125	0,0274	-0,0965	0,0463	0,3133	0,1262
	p=0,199	<b>p=0,025</b>	p=----	p=0,353	p=0,213	p=0,874	p=0,576	p=0,789	p=0,063	p=0,463
TBARS	-0,0876	0,0301	0,1595	1,0000	0,0415	-0,0221	-0,0271	0,0558	0,1275	0,1994
	p=0,612	p=0,862	p=0,353	p=----	p=0,810	p=0,898	p=0,875	p=0,747	p=0,459	p=0,244
Hcy	0,2390	-0,0911	0,2125	0,0415	1,0000	-0,0164	-0,0139	0,1247	-0,0614	-0,041
	p=0,160	p=0,597	p=0,213	p=0,810	p=----	p=0,924	p=0,936	p=0,469	p=0,722	p=0,812
Ht	0,0310	0,1706	0,0274	-0,0221	-0,0164	1,0000	<b>0,9448</b>	<b>-0,3690</b>	-0,2626	-0,2006
	p=0,857	p=0,320	p=0,874	p=0,898	p=0,924	p=----	<b>p=0,000</b>	<b>p=0,027</b>	p=0,122	p=0,241
Hb	0,1190	0,2462	-0,0965	0,0271	-0,0139	<b>0,9448</b>	1,0000	<b>-0,3638</b>	-0,1965	-0,0913
	p=0,489	p=0,148	p=0,576	p=0,875	p=0,936	<b>p=0,000</b>	p=----	<b>p=0,029</b>	p=0,251	p=0,596
MHb	-0,704	0,0158	0,0463	0,0558	0,1247	<b>-0,3690</b>	<b>-0,3638</b>	1,0000	-0,1597	-0,0919
	p=0,683	p=0,927	p=0,789	p=0,747	p=0,469	<b>p=0,027</b>	<b>p=0,029</b>	p=----	p=0,352	p=0,594
ALA-D SEM DTT	0,2846	-0,1545	0,3133	0,1275	-0,0614	-0,2626	-0,1965	-0,1597	1,0000	0,8859
	p=0,093	p=0,368	p=0,063	p=0,459	p=0,722	p=0,122	p=0,251	p=0,352	p=----	p=0,000
ALA-D COM DTT	<b>0,3923</b>	0,0322	0,1262	0,1994	-0,041	-0,2006	-0,0913	-0,0919	<b>0,8859</b>	1,0000
	<b>p=0,018</b>	p=0,852	p=0,463	p=0,244	p=0,812	p=0,241	p=0,596	p=0,594	<b>p=0,000</b>	p=----
TCB	<b>0,6098</b>	0,2173	-0,1120	-0,0703	0,2728	0,1195	0,1056	-0,3664	0,1635	0,0059
	<b>p=0,004</b>	p=0,358	p=0,638	p=0,768	p=0,245	p=0,616	p=0,658	p=0,112	p=0,491	p=0,980
TAF	<b>0,6168</b>	0,2265	-0,1161	-0,0712	0,2677	0,1199	0,1067	-0,3741	0	0,0114
	<b>p=0</b>	p=0,337	p=0,626	p=0,766	p=0,254	p=0,614	p=0,654	p=0,104	p=0	p=0,962
TEPO	0,2001	0,1820	0,2956	0,1262	0,3219	0,2808	0,2387	-0,1071	0,226	-0,0619
	p=0,398	p=0,443	p=0,206	p=0,596	p=0,166	p=0,230	p=0,311	p=0,653	p=0,925	p=0,796

TH = Tempo de hemodiálise

GSH = Glutathiona reduzida

TBARS = Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

Hcy = Homocisteína

Ht = Hematócrito

Hb = Hemoglobina

MHb = Metemoglobina

ALA-D = Ácido delta aminolevulínico desidratase

DTT = Dithiothreitol

TCB = Tempo de uso de complexo B

TAF = tempo de uso de ácido f

TEPO = tempo de eritropoetina

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABENSUR, H.; ALVES, M. A. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Nefrologia para a condução da anemia na insuficiência renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 22, n. 5, p. 1-3, 2000.

ABENSUR, H. Anemia da doença renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 3, p. 26-28, 2004.

ALEXANDER, R. W. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. **Hypertension**, v. 25, p. 155-161, 1995.

ALLEGRA, V.; MENGOZZI, G.; VASILE, A. Iron deficiency in maintenance hemodialysis patients: assessment of diagnosis criteria and of three different iron treatments. **Nephron**, v. 57, n. 2, p. 175-182, 1991.

ALLEN, R. H. et al. Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. **Metabolism**, v. 42, n. 11, p. 1448-1460, 1993.

ANDERSON, A. et al. Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1590-1597, 1993.

ANDREUCCI, M. et al. Diuretics in renal failure. **Mineral and Electrolyte Metabolism**, v. 25, n. 1-2, p. 32-38, 1999.

ARONSON, P. S.; THIER, S. O. Os rins. In: SMITH JR, L. H.; THIER, S. O. **Fisiopatologia – Os princípios biológicos da doença**. São Paulo: Panamericana, 1990, p. 604-693.

BACHMANN, J. et al. Hyperhomocyst(e)inemia and the risk for vascular disease in hemodialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, p. 121-125, 1995.

BARADAN, A.; NASRI, H. Intensification of anemia by secondary hyperparathyroidism in hemodialysis patients. **Medical Journal of Islamic Academy of Sciences**, v. 14, n. 4, p. 161-166, 2001.

BECHARA, E. J. H. et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyries associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Química Nova**, v. 16, p. 385-392, 1993.

BEDDHU, S. et al. A simple comorbidity scale predicts clinical outcomes and costs in dialysis patients. **American Journal of Medicine**, v. 108, n. 8, p. 609-613, 2000.

BERENSON, G. S. et al. The Bogalusa Heart Study – Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 23, p. 1650-1656, 1998.

BERLINER, J. A.; HEINECKE, J. W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 5, p. 707-727, 1996.

BESARAB, A. et al. The effects of normal versus low treated hematocrit values in hemodialysis patients with cardiac disease with erythropoietin. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 584-590, 1998.

BESARAB, A. et al. Optimization of epoetin therapy with intravenous iron therapy in hemodialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 3, p. 530-538, 2000.

BEVILACQUA, F. et al. **Fisiopatologia Clínica**. 5ª edição. São Paulo: Atheneu, 1995, p. 401-452.

BIASIOLI, S.; SCHIAVON, R. Homocysteine as a cardiovascular risk factor. **Blood Purification**, v. 18, n. 3, p. 177-182, 2000.

BIESALSKI, H. K. Free radical theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, n. 1, p. 5-10, 2002.

BLAKE, D. R.; RALLEN, R. E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems – a review oriented to inflammatory processes. **British Medical Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 371-385, 1987.

BLAUNSTEIN, M. P. Endogenous ouabain: role in the pathogenesis of hypertension. **Kidney International**, v. 49, n. 6, p. 1748-1753, 1996.

BLOM, H. J.; DE VRIESE, S. Why are homocysteine levels increased in kidney failure? A metabolic approach. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, n. 5, p. 262-268, 2002.

BOHM, V. et al. Vitamin C status of patients with chronic renal failure dialysis patients and patients after renal transplantation. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 4, p. 262-266, 1997.

BONNES, T.; GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.

BOSTON, A. G.; LATHROP, L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal failure: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. **Kidney International**, v. 52, n. 1, p. 10-20, 1997.

BRENNER, B. M.; MEYER, T. W.; HOSTETTER, T. H. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 307, n. 11, p. 652-659, 1982.

BROWN, J. H. et al. Comparative mortality from cardiovascular disease in patients with chronic renal failure. **Nephrology and Dialysis Transplantation**, v. 9, n. 8, p. 1136-1142, 1994.

BUCHET, J. P. et al. Effect of aluminum on porphyrin metabolism in hemodialyzed patients. **Nephron**, v. 46, n. 4, p. 360-363, 1987.

CABRAL, P. C.; DINIZ, A. S.; ARRUDA, I. K. G. Vitamin A and zinc status in patients on maintenance haemodialysis. **Nephrology**, v. 10, n. 5, p. 459-463, 2005.

CASTRO, M. et al. Qualidade de vida de pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise avaliada através do instrumento genérico SF-36. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 3, p. 245-249, 2003.

CEBALLOS-PICOT, I. et al. Glutathione antioxidants system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 6, p. 845-853, 1996.

CHAN, A. C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 725-731, 1993.

CHIN, J. H.; AZHAR, S.; HOFFMAN, B. B. Inactivation of endothelium-derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 1, p. 10-18, 1992.

CINES, D. B. et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, v. 91, n. 10, p. 3527-3561, 1998.

CLARK, S. F. The biochemistry of antioxidants revisited. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 17, n. 1, p. 5-17, 2002.

COLEMAN, M. D. Use of in vitro methaemoglobin generation to study antioxidant status in the diabetic erythrocyte. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 10, p. 1409-1416, 2000.

COUNCIL ON FOOD AND NUTRITION, COMMITTEE ON IRON DEFICIENCY: Iron deficiency in the United States. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 203, p. 119-124, 1968.

CRAVO, M. L. et al. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B12, and vitamin B6 status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 220-224, 1996.

CRISTOL, J.-P. et al. Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 12, p. 2312-2317, 1997.

CURTIS, J. J. Tratamento da Insuficiência Renal Irreversível. In: BENNETT, J. C.; PLUM, F. **Cecil 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.

DEICHER, R. et al. Vitamin C level and response to erythropoietin in patients on maintenance hemodialysis. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 19, p. 2319-2324, 2004.

DEN HEIJER, M. et al. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 80, n. 8, p. 847-877, 1998a.

DEN HEIJER, M. et al. Vitamin supplementation reduces blood homocysteine levels: a controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy volunteers. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 18, n. 3, p. 356-361, 1998b.

DENNIS, V.; ROBINSON, K. Homocysteinemia and vascular disease. **Kidney International**, v. 50, p. 11-17, 1996.

DESCAMPS-LATSCHA, B. et al. Establishing the relationship between complement activation and stimulation of phagocyte oxidative metabolism in hemodialyzed patients: a randomized prospective study. **Nephron**, v. 59, n. 2, p. 279-285, 1991.

DJORDJEVIC, V. B. et al. Erythrocyte delta-aminolevulinatase measurements in Balkan endemic nephropathy. **Kidney International**, v. 34, p. S93-96, 1991.

DJURIE, D.; MITROVIC, C.; WISOTZKI, R. Homocysteine and atherosclerosis: established risk factor or new illusion? **American Journal of Therapeutics**, v. 7, n. 6, p. 381-387, 2000.

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.

DRUEKE, T. Hypo-responsiveness to recombinant human erythropoietin. **Nephrology and Dialysis Transplantation**, v. 16, supp. 7, p. 25-28, 2001.

DRUEKE, T.; ECKARDT, K.-U. Role of secondary hyperparathyroidism in erythropoietin resistance of chronic renal failure patients. **Nephrology and Dialysis Transplantation**, v. 17, p. 28-31, 2002.

ECKARDT, K.-U. Pathophysiology of renal anemia. **Clinical Nephrology**, v. 53, p. 2-8, 2000.

ECKARDT, K.-U. Anaemia in end-stage renal disease: pathophysiological considerations. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 16, n. 7, p. 2-8, 2001.

EIKELBOOM, J. W. et al. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. **Annals of Internal Medicine**, v. 131, p. 363-375, 1999.

EMANUELLI, T. et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase from brain, liver, and kidney of adult mice. **Pharmacology & Toxicology**, v. 79, n. 3, p. 136-143, 1996.

EMANUELLI, T. et al. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 3, p. 213-218, 2001.

ESCHBACH, J. W. The anemia of chronic renal failure: pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin. **Kidney International**, v. 35, p. 134-148, 1989.

FAILACE, R. **Hemograma – Manual de Interpretação**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 298 p.

FARINA, M. et al. Selenoxides inhibit  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicology Letters**, v. 119, n. 1, p. 27-37, 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FINKELSTEIN, J. D.; MARTIN, J. Homocysteine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, n. 4, p. 385-389, 2000.

FISHBANE, S.; FREI, G. L.; MAESAKA, J. Reduction of recombinant human erythropoietin doses by the use of chronic intravenous iron supplementation. **American Journal of Kidney Disease**, v. 26, n. 1, p. 41-46, 1995.

FLOYD, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB Journal**, v. 4, p. 2587-2597, 1990.

FOLMER, V. et al. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 10, p. 1279-1285, 2002.

FONTANELLAS, A. et al. Effects of recombinant human erythropoietin on porphyrin metabolism in uremic patients on hemodialysis. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 7, p. 774-779, 1996.

FOWLER, B. Disorders of homocysteine metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 20, n. 2, p. 270-285, 1997.

FRYER, R. H. et al. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 13, p. 1327-1333, 1993.

FUKUDA, H.; PAREDES, S.; BATLE, A. M. Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehydratase modified by diethylpyrocarbonate and protected by  $Zn^{2+}$  ions. **Comparative Biochemistry and Physiology B – Biochemistry & Molecular Biology**, v. 91B, n. 2, p. 285-291, 1988.

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  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups. **Cell Biology International**, v. 29, n. 8, p. 669-674, 2005.

GALLI, F.; CANESTRARI, F.; BUONCRISTIANI, U. Biological effects of oxidative stress in hemodialysis: the possible roles of vitamin E. **Blood Purification**, v. 17, p. 79-94, 1999.

GHANDOUR, H. et al. Distribution of plasma folate forms in hemodialysis patients receiving high daily doses of L-folinic or folic acid. **Kidney International**, v. 62, p. 2246-2249, 2002.

GILBERT, H. F.; Mc LEAN, V. M. Molecular and cellular aspects of thiol-dissulfide exchange. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 63, p. 69-172, 1990.

GILLHAN, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. **Will's: Biochemical basis of medicine**. Butterworth- Heinemann, London, 1997, p. 343-354.

GOLDSTEIN, S.; MEYERSTEIN, D.; CZAPSKI, G. The Fenton reagents. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15, n. 4, p. 435-445, 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.

GUOLO, M. et al. Altered 5-aminolevulinic acid metabolism leading to pseudoporphyria in hemodialyzed patients. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 28, n. 3, p. 311-317, 1995.

GUOLO, M. et al. Inhibition of erythrocyte aminolevulinatase by a 56.2-Kd peptide from uremic plasma. **Experimental Nephrology**, v. 7, n. 3, p. 236-241, 1999.

GUTTORMSEN, A. B. et al. Kinetics basis of Hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. **Kidney International**, v. 52, n. 2, p. 495-502, 1997.

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

HANKEY, G. J.; EIKELBOOM, J. W. Homocysteine and vascular disease. **The Lancet**, v. 354, p. 407-413, 1999.

HARBOE-GONÇALVES, L.; VAZ, L. S.; BUZZI, M. Associação entre níveis plasmáticos de homocisteína e acidente vascular cerebral isquêmico. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 1, p. 97-103, 2005.

HASSELWANDER, O.; YOUNG, I. S. Oxidative stress in chronic renal failure. **Free Radical Research**, v. 29, n. 1, p. 1-11, 1998.

HEGESH, E. et al. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 30, n. 3, p. 679-682, 1970.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, n. 4, p. 277-285, 1989.

HIGGINS, M. R. et al. Anemia in hemodialysis patients. **Archives of Internal Medicine**, v. 137, n. 2, p. 172-176, 1977.

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. et al. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. **Kidney International**, v. 62, n. 5, p. 1524-1538, 2002.

HOLMES, C. J. Hemodialyser performance: Biological indices. **Artificial Organs**, v. 19, n. 11, p. 1126-1135, 1995.

HÖRL, W. H. et al. Iron status of dialysis patients under rHuEPO therapy. **Contributions to Nephrology**, v. 87, p. 78-86, 1990.

HÖRL, W. H. Is there a role for adjuvant therapy in patients being treated with epoetin? **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 14, suppl 2, p. 50-60, 1999.

HUTCHINSON, F.; JONES, W. J. A cost-effectiveness analysis of anemia screening before erythropoietin in patients with end-stage renal disease. **American Journal of Kidney Disease**, v. 29, n. 5, p. 651-670, 1997.

ICSH. **International Committee for Standardization in Haematology**. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2: 1977) and specifications for international haemoglobinocyanide reference preparation (ICSH Standard EP 6/3: 1977). **Journal Clinical Pathology**, v. 31, p. 139-143, 1978.

ICSH. **International Committee for Standardization in Haematology**. Selected methods for the determination of the packed cell volume. In: van Assendelf OW & England JM, eds. *Advances in Hematological Methods: the blood count*, 1982.

JACOBSON, S. H.; MOLDEUS, P. Whole blood, plasma and red blood cell glutathione and cysteine in patients with kidney disease and during hemodialysis. **Clinical Nephrology**, v. 42, n. 3, p. 189-192, 1994.

JAFFE, J. A.; LIFTMAN, C.; GLICKMAN, J. D. Frequency of elevated serum aluminum in adult dialysis patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 46, n. 2, p. 316-319, 2005.

JAMIESON, D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 7, n. 1, p. 87-108, 1989.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, n. 6, p. 515-540, 1990.

JANSSEN, M. J. F. M.; VAN DER MEULEN, J. The bleeding risk in chronic haemodialysis: preventive strategies in high-risk patients. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 48, n. 5, p. 198-207, 1996.

JUNGERS, P. et al. Incidence of atherosclerotic arterial occlusive accidents in predialysis and dialysis patients: a multicentric study in the Ile de France district. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 14, p. 898-902, 1999.

KAISER, L.; SCHWARTZ, K. A. Aluminum-induced anemia. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 6, n. 5, p. 348-352, 1985.

KANG, S.-S.; WONG, P. W. K.; MALINOW, M. R. Hyperhomocist(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 12, p. 279-298, 1992.

KIMMEL, P. L. Zinc balance in combined zinc deficiency in uremia. **Kidney International**, v. 33, n. 6, p. 1091-1099, 1988.

KLANG, B.; BJORVELL, H.; CLYNE, N. Quality of life in predialytic uremic patients. **Quality of Life Research**, v. 5, n. 1, p. 109-116, 1996.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.

KONING, A. B. L. et al. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 431-441, 2003.

KORZETS, A. et al. Erythropoietin, folic acid deficiency and hyperhomocysteinemia: is there possible relationship in chronically hemodialyzed patients? **Clinical Nephrology**, v. 53, n. 1, p. 48-54, 2000.

KRANTZ, S. B. Erythropoietin. **Blood**, v. 77, n. 3, p. 419-434, 1991.

KRONENBERG, F. Homocysteine lipoprotein and fibrinogen: metabolic risk factors for cardiovascular complications of chronic renal disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 7, n. 3, p. 271-278, 1998.

KURIYAMA, S. et al. Reversal of anemia by erythropoietin therapy retards the progression of chronic renal failure especially in non diabetic patients. **Nephron**, v. 77, n. 2, p. 176-185, 1997.

LANGMAN, L. L.; COLE, D. E. C. Homocysteine: cholesterol of the 90s? **Clinica Chimica Acta**, v. 286, p. 63-80, 1999.

LARA, E. A.; SARQUIS, L. M. M. O paciente renal crônico e sua relação com o trabalho. **Cogitare Enfermagem**, v. 9, n. 2, p. 99-106, 2004.

LASH, J.; SMITH, E. C. Is folate supplementation necessary in dialysis patients? **International Journal of Artificial Organs**, v. 13, n. 12, p. 785-786, 1990.

LAUPACIS, A. A. A randomized double-blind study of recombinant human erythropoietin in anaemic hemodialysis patients. Canadian Erythropoietin Study Group. **Transplantation Proceedings**, v. 23, n. 2, p. 1825-1826, 1991.

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

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

LEWIS, E. et al. The effect of angiotensin converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 20, p. 1456-1462, 1993.

LIM, P.-S. et al. Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 14, p. 2680-2687, 1999.

LIN, F. K. et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 7580-7584, 1985.

LOCATELLI, F.; VECCHIO, L. D.; MANZONI, C. Morbidity and mortality on maintenance haemodialysis. **Nephron**, v. 80, n. 3, p. 380-400, 1998.

LOCATELLI, F. et al. Hypertension and cardiovascular risk assessment in dialysis patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 19, p. 1058-1068, 2004.

LONGNECKER, R. E.; GOFFINET, J. A.; HENDLER, E. D. Blood loss during maintenance hemodialysis. **Transactions - American Society for Artificial Internal Organs**, v. 20, p. 29-34, 1974.

LOSCALZO, J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 1, p. 5-7, 1996.

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

LUCCHI, L. et al. Improved biocompatibility by modified cellulose membranes: The case of hemophan. **Artificial Organs**, v. 13, n. 5, p. 417-421, 1989.

LUCCHI, L. et al. Influence of different hemodialysis membranes on red blood cell susceptibility to oxidative stress. **Artificial Organs**, v. 24, n. 1, p. 1-6, 2000.

LUCCHI, L. et al. Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments. **Artificial Organs**, v. 29, n. 1, 2005.

LUCIAK, M.; TRZNADEL, K. Free oxygen species metabolism during hemodialysis with different membranes. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 6, suppl. 3, p. 66-70, 1991.

MACHADO, D. J. B. et al. Hyperhomocyst(e)inemia in chronic stable renal transplant patients. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 55, n. 5, p. 161-168, 2000.

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

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.

MAHAJAN, S. K. et al. Factors underlying abnormal zinc metabolism in uremia. **Kidney International**, v. 36, p. S269-S273, 1989.

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

MANN, J. F. What are the short-term and long-term consequences of anaemia in CRF patients? **Nephrology and Dialysis Transplantation**, v. 14, suppl. 2, p. 29-36, 1999.

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

McCULLY, K. S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. **American Journal of Pathology**, v. 56, n. 1, p. 111-128, 1969.

McCULLY, K. S. Chemical pathology of homocysteine – Atherogenesis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 23, n. 6, p. 477-493, 1993.

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.

MIMIC-OKA, J.; DUKANOVIC, L.; MARKOVIC, B. Erythrocyte and plasma Glutathione levels in patients with chronic renal insufficiency. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 39, n. 1, p. 48-54, 1988.

MIMIC-OKA, J. et al. Glutathione and its associated enzymes in peripheral blood cells in different stages of chronic renal insufficiency. **Amino Acids**, v. 2, n. 3, p. 215-225, 1992.

MINER, S. E. S.; EVROVSKI, J.; COLE, D. E. C. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. **Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 189-201, 1997.

MIRCESCU, G. et al. Global assessment of serum antioxidants status in hemodialysis patients. **Journal of Nephrology**, v. 18, p. 599-605, 2005.

MISKULIN, D. C. et al. Comorbidity assessment using in the index of coexistent disease in a multicenter clinical trial. **Kidney International**, v. 60, n. 4, p. 1498-1510, 2001.

MORENA, M.; CRISTOL, J-P.; CANAUD, B. Why haemodialysis patients are in a prooxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance. **Blood Purification**, 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.

MORSCH, C.; GONÇALVES, L. F.; BARROS, E. Índice de gravidade da doença renal, indicadores assistenciais e mortalidade em pacientes em hemodiálise. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 296-300, 2005.

NASRI, H.; BARADAN, A. Association of serum homocysteine with anemia in maintenance hemodialysis patients. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4, n. 6, p. 414-417, 2005.

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.

NEKRASSOVA, O.; LAWRENCE, N. S.; COMPTON, R. G. Analytical determination of homocysteine: a review. **Talanta**, v. 60, p. 1085-1095, 2003.

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. 3, 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.

NIELSEN, F. et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 1209-1214, 1997.

NISHINAGA, M.; OZAWA, T.; SHIMADA, K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 3, p.1381-1386, 1993.

NKF-K/DOQI. Clinical practice guidelines for anemia of chronic kidney disease: update 2000. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 37, p. 128-238, 2000.

NOGUEIRA, C. W. et al. 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury – and cadmium-induced inhibition of  $\delta$ -aminolevulinatase. **Toxicology**, v. 184, n. 2-3, p. 85-95, 2003a.

NOGUEIRA, C. W. et al. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, v. 183, n. 1-3, p. 29-37, 2003b.

NOGUEIRA, C. W. et al. Organochalcogens effects on  $\delta$ -aminolevulinatase dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology**, v. 191, n. 2-3, p. 169-178, 2003c.

NOZAL, M. J. et al. 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**, v. 778, n. 1-2, p. 347-353, 1997.

NURMOHAMED, S. A.; NUBÉ, M. J. Reverse epidemiology: paradoxical observations in haemodialysis patients. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 63, n. 10, p. 376-381, 2005.

NYGARD, O. et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile – The Hordaland homocysteine study. **JAMA – The Journal of the American Medical Association**, v. 274, n. 19, p. 1526-1533, 1995.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

ONG-AWYOOOTH, L. et al. Reduced free radical scavengers and chronic renal failure. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 80, n. 2, p. 101-108, 1997.

ONGAJOOOTH, 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.

ONO, K.; HISASUE, Y. Is folate supplementation necessary in hemodialysis patients on erythropoietin therapy? **Clinical Nephrology**, v. 38, n. 5, p. 290-292, 1992.

OZDEN, M. et al. Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 269-273, 2002.

PARKINSON, I. S.; WARD, M. K.; KERR, D. N. S. Dialysis encephalopathy, bone disease and anaemia: the aluminium intoxication syndrome during regular haemodialysis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 34, n. 11, p. 1285-1294, 1981.

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

PARTHASARATHY, S. Oxidation of low-density lipoprotein by thiol compounds leads to its recognition by the acetyl LDL receptor. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 917, n. 2, p. 337-340, 1987.

PECO-ANTIC, A. Management of renal anemia. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 47, p. 19-27, 2005.

PEREIRA, B. et al. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 1, p. 226-230, 1992.

PERRY, I. J. et al. Prospective study of serum total concentration and risk of stroke in middle-aged British men. **The Lancet**, v. 346, p. 1395-1398, 1995.

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.

PRAXEDES, J. N. Diretrizes sobre hipertensão arterial e uso de anti-hipertensivos na doença renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 3, p. 44-46, 2004.

PRU, C.; EATON, J.; KJELLSTRAND, C. Vitamin C intoxication and hyperoxalemia in chronic hemodialysis oxalosis. **Arthritis Rheum**, v. 29, p. 112-116, 1985.

RAINE, A. E. G. et al. Report on management of renal failure in Europe, XXII. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 7, n. 2, p. 7-35, 1992.

REFSUM, H. et al. Homocysteine and cardiovascular disease. **Annual Review of Medicine**, v. 49, n. 1, p. 31-62, 1998.

RICE-EVANS, C.; BAYSAL, E. Iron-mediate oxidative stress in erythrocytes. **Biochemical Journal**, v. 244, n. 1, p. 191-196, 1987.

ROCHA, J. B. T. et al. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (E.C .4.2.1.2.4) of suckling rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, n. 10, p. 1077-1083, 1993.

ROCHA, J. B. T. et al. 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**, v. 100, n. 1-3, p. 27-37, 1995.

ROCHA, J. B. T. et al. Effects of group 13 metals on porphobilinogen synthase in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 200, n. 3, p. 169-176, 2004.

RODGERS, G. M.; CONN, M. T. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. **Blood**, v. 75, n. 4, p. 895-901, 1990.

RODRIGUES, A. L.; BELLINASSO, M. L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (pisces, Pimelodidae). **Comparative Biochemistry and Physiology B – Biochemistry & Molecular Biology**, v. 94B, n. 1, p. 65-69, 1989.

ROSENLOF, K. et al. Iron availability is transiently improved by intravenous iron medication in patients on chronic hemodialysis. **Clinical Nephrology**, v. 43, n. 4, p. 249-255, 1995.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. **Nature**, v. 362, p. 801-809, 1993.

ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 115-126, 1999.

ROSTAND, S. G. et al. Cardiovascular complications in renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 2, p. 1053-1062, 1991.

SANTORO, A.; CANOVA, C. Anemia and erythropoietin treatment in chronic kidney disease. **Minerva Urologica e Nefrologica**, v. 57, n. 1, p. 23-31, 2005.

SARNAK, M. J. et al. Homocysteine, cysteine, and B vitamins as predictors of kidney disease progression. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 40, n. 5, p. 932-939, 2002.

SASSA, S.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v. 28, n. 2-3, p. 133-145, 1982.

SCHÄRER, K. et al. Treatment of renal anemia by subcutaneous erythropoietin in children with preterminal chronic renal failure. **Acta Paediatric**, v. 82, p. 953-958, 1993.

SCHETINGER, M. R. C. et al. Effects of aluminum sulfate on delta-aminolevulinic acid dehydratase from kidney, brain, and liver of adult mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 6, p. 761-766, 1999.

SCHOTT, K. L. **Quantificação da glutatona reduzida em eritrócitos humanos por cromatografia líquida de alta eficiência-UV: validação e aplicação**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 14, n. 3, p. 271-279, 2004.

SELHUB, J. et al. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 270, n. 22, p. 2693-2698, 1993.

SEPANDJ, F. et al. Economical appraisal of maintenance parenteral iron administration in treatment of anaemia in chronic hemodialysis patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 11, p. 319-322, 1996.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.

SHAW, C. A. et al. Nitric oxide and the resolution of inflammation: implications for atherosclerosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 67-71, 2005.

SIES, H. et al. Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides. **FEBS Letters**, v. 27, n. 1, p. 171-175, 1972.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie**, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 213-219, 1993.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SIKOLE, A. Pathogenesis of anemia in hyperparathyroidism. **Medical Hypotheses**, v. 54, n. 2, p. 236-238, 2000.

SILVERBERG, D. S. et al. Intravenous iron supplementation for the treatment of the anemia of moderate to severe chronic renal failure patients not receiving dialysis. **American Journal of Kidney Disease**, v. 27, n. 2, p. 324-328, 1996.

SMITH, C. L.; BERKSETH, R. O. Sensitivity of erythrocytes to oxidant stress in uremia. **American Journal of Nephrology**, v. 10, n. 1, p. 61-68, 1990.

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

SOBOTOVA, D. et al. Hypertension in hemodialyzed uremic patients. **Vnitřní Lékarství**, v. 11, p. 641-644, 1999.

SPLAVER, A.; LAMAS, G. A.; HENNEKENS, C. H. Homocysteine and cardiovascular disease: Biological mechanisms, observational epidemiology, and the need for randomized trials. **American Heart Journal**, v. 148, n. 1, p. 34-40, 2004.

STADTMAN, E. R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 315-325, 1990.

STAMPFER, M. J. et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. **Journal of the American Medical Association**, v. 268, n. 7, p. 877-881, 1992.

STEIN, J. H.; McBRIDE, P. E. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 158, n. 12, p. 1301-1306, 1998.

SUNDER-PLOSSMANN, G.; HÖRL, W. Novel aspects of erythropoietin response in renal failure patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 16, n. 5, p. 40-44, 2001.

TAYLER, L. M. Prospective blinded study of the relationship between plasma homocysteine and progression of symptomatic peripheral arterial disease. **Journal of Vascular Surgery**, v. 29, p. 8-19, 1999.

TETTA, C. et al. An overview of hemodialysis and oxidative stress. **Blood Purification**, v. 17, n. 2-3, p. 118-126, 1999.

TOTO, R. D. Treatment of hypertension in chronic kidney disease. **Seminars in Nephrology**, v. 25, n. 6, p. 435-439, 2005.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 41-54, 2003.

VAGIMIGLI, M. et al. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 40, p. 255-261, 2003.

VALDERRABANO, F.; JOFRE, R.; LOPEZ-GOMEZ, J. M. Quality of life in end-stage renal disease patients. **American Journal of Kidney Disease**, v. 38, n. 3, p. 443-464, 2001.

VANELLA, A. et al. Superoxide dismutase activity and reduced glutathione content in erythrocytes of uremic patients on chronic dialysis. **Acta Haematologica**, v. 70, n. 5, p. 312-315, 1983.

VAN GULDENER, C. et al. Homocysteine and methionine metabolism in ESRD: a stable isotope study. **Kidney International**, v. 56, n. 3, p. 1064-1071, 1999.

VAN GULDENER, C.; STAM, F.; STEHOUWER, C. D. A. Homocysteine metabolism in renal failure. **Kidney International**, v. 59, s. 7, p. S234-S237, 2001.

VAN GULDENER, C. Homocysteine and the kidney. **Current Drug Metabolism**, v. 6, n. 1, p. 23-26, 2005.

VARELA LEMA, L.; RUANO RAVINÃ, A. **Efectividad y seguridad de las diferentes variantes de hemodiálisis y hemodiafiltración**. Santiago de Compostela. Serviço Galego de Saúde, Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia, Serie Avaliación de Tecnoloxías. Informe de avaliación: INF 2005/3, 2005.

VELURY, S.; HOWELL, S. B. Measurement of plasma thiols after derivatization with monobromobimane. **Journal of Chromatography**, v. 424, n. 1, p. 141-146, 1988.

VERHOEF, P. et al. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12 and folate. **American Journal of Epidemiology**, v. 143, n. 9, p. 845-859, 1996.

VERMAAK, W. J. et al. Vitamin B6 status and cigarette smoking. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 1058-1061, 1990.

VIEIRA, V. L. P. et al. Effect of aluminum on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase from mouse blood. **Toxicology Letters**, v. 117, n. 1-2, p. 45-52, 2000.

WARD, R. A.; McLEISH, K. R. Oxidative stress in hemodialysis patients: what are the determining factors? **Artificial Organs**, v. 27, n. 3, p. 230-236, 2003.

WARNOCK, D. G. Insuficiência Renal Crônica. In: BENNETT, J. C.; PLUM, F. **Cecil Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p. 614-622.

WASHINGTON, R. L. Interventions to reduce cardiovascular risk factors in children and adolescents. **American Family Physician**, v. 59, n. 8, p. 2211-2218, 1999.

WELCH, G. N.; LOSCALZO, J. Homocysteine and atherothrombosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 15, p. 1042-1050, 1998.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 264-272, 1990.