

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

**RETINOL E CAROTENÓIDES EM PACIENTES
HEMODIALISADOS E SEUS REFLEXOS
FISIOPATOLÓGICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Miguel Roehrs

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**RETINOL E CAROTENÓIDES EM PACIENTES
HEMODIALISADOS E SEUS REFLEXOS FISIOPATOLÓGICOS**

por

Miguel Roehrs

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

Orientador: Profa. Dra. Solange Cristina Garcia

Santa Maria, RS, Brasil

2009

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

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

**RETINOL E CAROTENÓIDES EM PACIENTES HEMODIALISADOS E
SEUS REFLEXOS FISIOPATOLÓGICOS**

elaborada por
Miguel Roehrs

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Solange Cristina Garcia, Dra.
(Presidente/Orientador)

Renata Pereira Limberger, Dra. (UFRGS)

Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 20 de janeiro de 2009

Agradecimento especial

A professora **Dr^a Solange Cristina Garcia** pela oportunidade de aprendizado, pela dedicação, paciência e orientação deste trabalho. Também pelo exemplo de perseverança, determinação e garra, sempre estimulando o crescimento profissional, mostrando caminhos, dando apoio e tornando-se uma grande amiga.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por ter me dado muita saúde, paz e tantas oportunidades na vida.

Aos meus pais e meu irmão pelo amor, pela força e por ter me patrocinado nos momentos mais críticos.

A minha namorada pelo amor e pela força quando precisei.

Aos colegas do LATOX: Ângela Maria, André, Clóvis, Marieli, Silvana, Rachel, Juliana Va, Juliana Vi, Fernando, Denise, Gianine, Raquel, Fernanda, Natália, Sílvia e Ana Paula pelo carinho, o convívio amigo, a disponibilidade, o esforço e a aprendizagem que me proporcionaram. Além de todo o suporte técnico na realização de todo o projeto, na coleta das amostras e na realização de todas as análises. A participação de todos vocês foi fundamental.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HUSM e ao diretor Elehú pelo apoio.

Aos professores Ionara Pizzuti, Martha Adaime e Renato Zanella e ao pessoal do LARP que me apoiaram e me incentivaram na minha iniciação científica.

Aos Centros de Hemodiálise do Hospital de Caridade e Casa de Saúde e à seus funcionários, em especial a enfermeira Geni Burg, pelo apoio, atenção dispensada e colaboração com este trabalho.

A todos os pacientes que realizam hemodiálise nestes dois centros, que participaram deste estudo, pela disposição com que nos receberam e pela fundamental contribuição em nosso estudo.

A CAPES/DAAD pelo auxílio a professora Dra. Solange Cristina Garcia na sua visita e realização de algumas análises deste trabalho e em especial ao doutor Michael Wolter do Instituto de de Biologia Química e Nutrição da Alemanha pelo auxílio nas análises.

Às professoras Tatiana Emanuelli, Renata Pereira Limberger e Maria Beatriz Moreto por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Aos professores do programa de pós-graduação em Farmacologia (PPGF), a secretária, aos coordenadores Katia Barreto e Bernardo Baldisseroto sempre solícitos.

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

*“Tempo difícil esse em que estamos,
onde é mais fácil quebrar um átomo
do que um preconceito.”*

Albert Einstein

*Por acaso, surpreendo-me no espelho:
Quem é esse que me olha e é tão mais velho que eu? (...)
Parece meu velho pai - que já morreu! (...)
Nosso olhar duro interroga:
"O que fizeste de mim?" Eu pai? Tu é que me invadiste.
Lentamente, ruga a ruga... Que importa!
Eu sou ainda aquele mesmo menino teimoso de sempre
E os teus planos enfim lá se foram por terra,
Mas sei que vi, um dia - a longa, a inútil guerra!
Vi sorrir nesses cansados olhos um orgulho triste...*

Mario Quintana

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

RETINOL E CAROTENÓIDES EM PACIENTES HEMODIALISADOS E SEUS REFLEXOS FISIOPATOLÓGICOS

AUTOR: MIGUEL ROEHRS

ORIENTADORA: SOLANGE CRISTINA GARCIA

Data e Local de defesa: Santa Maria, 20 de janeiro de 2009.

A insuficiência renal crônica (IRC) é uma lenta e progressiva diminuição da função renal sendo um dos principais problemas de saúde pública do nosso país. A hemodiálise é o tratamento padrão aos quais estes pacientes são submetidos. Apesar de aumentar a sobrevida do paciente, ele é incapaz de corrigir totalmente os distúrbios metabólicos. Esse procedimento acaba amplificando o estresse oxidativo muito comum em pacientes com IRC. Esses distúrbios somados ao estresse oxidativo são os principais fatores que podem desencadear o desenvolvimento de doenças vasculares e, sabe-se que estas são as principais causadoras de morbidade e mortalidade nestes pacientes. Por outro lado, é importante estudar a condição micronutricional nestes pacientes, relacionada a vitaminas e carotenóides, uma vez que, substâncias exógenas potencialmente antioxidantes poderiam exercer um papel protetor contra as doenças vasculares. Por isto, a avaliação conjunta dos níveis de algumas vitaminas, carotenóides, parâmetros do estresse oxidativo e ainda parâmetros bioquímicos em pacientes com IRC submetidos ao tratamento de hemodiálise são relevantes. Neste estudo foram quantificados os níveis sanguíneos de vitamina A (retinol), vitamina E (α - e γ - tocoferol), carotenóides (licopeno, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α - e β -caroteno); biomarcadores do estresse oxidativo, como glutathiona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA), atividade das enzimas δ -aminolevulinato desidratase (ALA-D), glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), e alguns parâmetros bioquímicos (uréia, creatinina; perfil lipídico: colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e triglicérides e suas relações) em pacientes com IRC submetidos ao tratamento de hemodiálise (HD) (n=29) e em um grupo de indivíduos saudáveis (grupo controle; n=20). Os níveis de retinol foram significativamente aumentados nos pacientes HD. Dos carotenóides, apenas o licopeno e o α - caroteno apresentaram diminuição significativa nos pacientes. Os níveis de MDA plasmático e GSH eritrocitária e as atividades das enzimas SOD e CAT estavam aumentados nos HD; diferentemente da GPx e da ALA-D que estavam diminuídas. Em relação aos parâmetros bioquímicos, os níveis de uréia e creatinina estavam aumentados, assim como os parâmetros do perfil lipídico (colesterol total, LDL e triglicérides), o colesterol HDL estava diminuído. A relação colesterol total/colesterol HDL e colesterol LDL/colesterol HDL também conhecidos como índice de risco coronariano estavam aumentados cerca de três vezes nos pacientes hemodialisados. Ainda, o retinol apresentou correlação negativa com a enzima ALA-D e correlações positivas com o MDA, SOD e CAT. Os níveis de licopeno

apresentaram correlações negativas com o MDA, colesterol LDL e com a relação colesterol LDL/ colesterol HDL. Através dos resultados obtidos os pacientes HD apresentam algumas desordens em relação a algumas vitaminas, carotenóides e enzimas endógenas. Dentre as vitaminas, o retinol em concentrações elevadas pode ser sugerido como um agente oxidante/pro-oxidante. Dentre os carotenóides, baixas concentrações de licopeno podem representar um fator adicional na aterogênese, pois possui tanto ação antioxidante quanto hipocolesterolêmica.

Palavras chave: carotenóides; retinol; tocoferóis; hemodiálise; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Master dissertation
Graduate Course on Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

RETINOL E CAROTENOIDS IN HEMODIALYSIS PATIENTS AND THEIR FISIOPATHOLOGICAL REFLEXES

AUTHOR: MIGUEL ROEHRS

ADVISER: SOLANGE CRISTINA GARCIA

Date and place of the defense: Santa Maria, January 20, 2009.

Chronic renal failure (CRF) is a slow and gradual decline of renal function and it constitutes a major public health problem in our country. The haemodialysis treatment is the standard to which these patients are submitted. Despite increasing the survival of the patient, it is unable to fully correct the metabolic disorders. This procedure has amplified oxidative stress, which is very common among patients with CRF. These disorders added to the oxidative stress are the main factors that can trigger the development of vascular diseases. And these are the main cause of morbidity and mortality in these patients. It is also important to study the nutrition condition in these patients, related to vitamins and carotenoids, since exogenous antioxidants could potentially have a protective role against vascular diseases. In this study it was quantified the blood levels of vitamin A (retinol), vitamin E (α - and γ -tocopherol), carotenoids (lycopene, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α - and β -carotene), biomarkers of oxidative stress, as reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), and some biochemical parameters (urea, creatinine, lipid profile : total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides and their relation) in patients with CRF submitted to the treatment of haemodialysis (HD) (n = 29) and a group of healthy subjects (control group, n = 20). The levels of retinol were significantly increased in haemodialysis patients. Among carotenoids, only the α -carotene and lycopene showed a significant decrease in patients. The plasma MDA and erythrocyte GSH levels and the activities of enzymes SOD and CAT were increased in HD, unlike the GPx and ALA-D that were reduced. The biochemical parameters urea and creatinine levels were increased, as observed in the parameters of the lipid profile (total cholesterol, LDL and triglycerides), already the HDL cholesterol was decreased. The total cholesterol / cholesterol HDL and LDL cholesterol / HDL cholesterol also known as coronary risk index were increased about three times in haemodialysis patients. Besides, the retinol showed negative correlation with the enzyme ALA-D and positive correlations with the MDA, SOD and CAT. The levels of lycopene had negative correlations with the MDA, LDL cholesterol and with LDL cholesterol / HDL cholesterol. The results obtained suggest that HD patients have some disorders for some vitamins, carotenoids and endogenous enzymes. Among the vitamins, the retinol appears in high concentrations and act as an oxidant agent / pro-oxidant. Among the carotenoids, the low concentrations of lycopene may represent an additional factor in atherogenesis, since it has antioxidant and hypocholesterolemic activity.

Key Words: carotenoids; retinol; tocopherol; oxidative stress; haemodialysis.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

TABELA 1 - General characteristics of the studied groups (hemodialysis patients and healthy subjects).....	72
TABELA 2 - Activities of antioxidant enzymes and of ALA-D enzyme obtained with and without reductor agent (DTT).....	72

MANUSCRITO I

TABELA 1 - General characteristics of the population studied.....	91
TABELA 2 - Plasma carotenoids and tocopherols concentrations ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) analyzed in hemodialysis patients and healthy subjects.....	91
TABELA 3 - Comparison of lipid profile and relation of coronary risk of hemodialysis patients with the healthy subjects.....	92
TABELA 4 - Biomarkers of oxidative stress analyzed in hemodialysis patients and healthy group.....	93

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

FIGURA 1 - Estrutura da vitamina A e de seus derivados.....	25
FIGURA 2 - Metabolismo do retinol (absorção, armazenamento, transporte e eliminação).....	28
FIGURA 3 - Principais carotenóides encontrados no plasma (luteína, zeaxantina, α - e β – caroteno, β -criptoxantina, licopeno).....	32
FIGURA 4 - Formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) através da redução do oxigênio.....	35
FIGURA 5 - Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima δ -aminolevulinato desidratase, formando o porfobilinogênio (PBG).....	37
FIGURA 6 - Representação simplificada dos sistemas oxidante e antioxidante nas células.....	40
FIGURA 7 - Sistema antioxidante da glutathiona e suas enzimas envolvidas.....	42

ARTIGO I

FIGURA 1 - Demonstrates the significant increase between plasma retinol and MDA levels in hemodialysis patients (n=29) compared to controls (healthy subjects; n=20); being almost three times higher for plasma retinol levels. The Unit of both is $\mu\text{mo.L}^{-1}$	70
FIGURA 2 - Spearman test correlation between plasma retinol and MDA levels (n=49).....	70
FIGURA 3 - Spearman test correlation between plasma retinol levels and blood ALA-D enzyme activity (n=49).....	71

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de aceite para publicação do manuscrito “ The plasma retinol levels as pro-oxidant/oxidant agents in hemodialysis patients ” à Revista <i>Nephrology and Dialysis Transplantation</i>	111
ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – Ácido δ -aminolevulínico
ALA-D – δ -Aminolevulinato desidratase
CAT – Catalase
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio
GSH – Glutathiona reduzida
GPx – Glutathiona peroxidase
GSSG – Glutathiona dissulfeto
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HPLC – Cromatografia líquida de de alta performance
IRC – Insuficiência Renal Crônica
LDL – Lipoproteína de alta densidade
MDA – Malondialdeído
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMS – Organização Mundial da Saúde
ONU – Organização das Nações Unidas
RBP – Proteína carreadora do retinol
RLs – Radicais Livres
ROS – Espécies reativas de oxigênio
-SH – Grupos sulfidrílicos
SOD – Superóxido dismutase
TCA – Ácido tricloroacético
TTR - Transtiretina
UN – Nações Unidas
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	12
LISTA DE ANEXOS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
APRESENTAÇÃO.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Insuficiência renal crônica.....	20
2.2 Hemodiálise.....	21
2.3 Insuficiência renal e distúrbios metabólicos e nutricionais.....	22
2.4 Estresse oxidativo e hemodiálise.....	22
2.5 Vitamina E.....	23
2.6 Retinol.....	24
2.6.1 Absorção.....	25
2.6.2 Transporte.....	26
2.6.3 Armazenamento.....	27
2.6.4 Metabolismo.....	27
2.6.5 Retinol como antioxidante.....	29
2.7 Carotenoides.....	29
2.7.1 Absorção.....	30
2.7.2 Transporte.....	31
2.7.3 Armazenamento.....	32
2.7.4 Metabolismo.....	33
2.7.5 Carotenoides como antioxidantes.....	33
2.8 Radicais livres e espécies reativas.....	34
2.9 Peroxidação lipídica.....	35
2.10 Enzima δ-aminolevulinato desidratase (ALA-D).....	37

2.11 Antioxidantes	38
2.11.1 Superóxido dismutase (SOD).....	39
2.11.2 Catalase (CAT).....	39
2.11.3 Glutaciona Peroxidase (GPx).....	40
2.11.4 Glutaciona reduzida (GSH).....	40
3. RESULTADOS	42
3.1 Artigo I	42
Abstract.....	44
Introduction.....	45
Material and methods.....	46
Results.....	50
Discussion.....	53
References.....	60
3.2 Manuscrito II	73
Abstract.....	75
Introduction.....	76
Material and methods.....	77
Results.....	80
Discussion.....	81
References.....	85
4. Discussão	94
5. Conclusões	98
6. Referências	99
7. Anexos	110

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no ítem artigo e manuscrito. As seções **Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas**, encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens Discussão e Conclusões, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho.

As Referências Bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens **Introdução, Revisão Bibliográfica, Discussão e Conclusões** desta dissertação.

Os artigos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos:

Artigo I – ***Nephrology and Dialysis Transplantation.***

Manuscrito I – ***Clinical Biochemistry.***

O artigo I foi aceito para a publicação, já o manuscrito acima está nos moldes da revista.

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crônica (IRC) é atualmente um dos principais problemas de saúde pública no nosso país (Romão, 2004). Dados projetados para a população brasileira estimam que existam cerca de 1,4 milhão de pessoas com IRC em diferentes estágios (Passos et al., 2003; Romão, 2004). Considerando apenas a população com doença renal terminal, no Brasil temos aproximadamente 60.000 pacientes mantidos em programas crônicos de diálise, com uma incidência crescente de 8% ao ano (Passos et al., 2003; Romão, 2004). A IRC pode ser tratada pela purificação extracorpórea do sangue através de processos dialíticos (hemodiálise ou diálise peritoneal) ou transplante renal. Embora o transplante renal seja o tratamento de escolha, há dificuldades para se obter número suficiente de doadores compatíveis para suprir a demanda necessária. Sendo assim, os tratamentos dialíticos, principalmente, a hemodiálise, continuam sendo a opção mais usada na IRC (Mallick e Gokal, 1999). 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 (Drai et al., 2001).

A doença cardiovascular, apesar de todo o avanço terapêutico e tecnológico, continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com doença renal crônica (Appel, 1991; Attman et al., 1991). Isto se agrava nos pacientes com insuficiência renal terminal em tratamento dialítico, quer por hemodiálise ou diálise peritoneal (Appel, 1991). A mortalidade por doença cardiovascular, nestes pacientes, é 10 a 30 vezes maior do que a população em geral (Levey et al, 1998). Os fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardíaca coronariana aterosclerótica, nestes pacientes, são os tradicionais, como a hipertensão arterial sistêmica, o diabetes mellitus, dislipidemias e hiperhomocisteinemia associados a fatores ditos não tradicionais como níveis séricos de cálcio e fósforo, inflamação e estresse oxidativo, entre outros (Longenecker et al, 2002; Mathur et al, 2002; Prichard, 2003; Gould et al, 1995). O papel dos lipídios na causa da aterosclerose tem sido demonstrado por vários estudos onde o aumento do colesterol total e do LDL, associados à diminuição do HDL

e outras alterações lipídicas têm se constituído em importantes fatores de risco de doença coronariana e morte (Gould et al., 1995; Longenecker et al., 2002; Mathur et al., 2002). A redução de 10% no colesterol sérico total através de intervenção terapêutica pode diminuir o risco de doença cardiovascular em até 15% e da mortalidade em 11% (Gould et al., 1995).

O estresse oxidativo, um desequilíbrio entre antioxidantes e oxidantes (espécies reativas), é um fator potencialmente importante na mortalidade dos pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) e mediador de muitas complicações, principalmente cardiovascular e neurológica (Locatelli et al., 2003). Frente à ação potencial de espécies reativas, torna-se vital um delicado controle de sua produção e consumo dentro das células, ou seja, um fino balanceamento de sua concentração intra e extra celular. Isso é possível graças à atividade dos antioxidantes que, removendo as substâncias reativas, as mantêm em baixas concentrações (Reilly et al., 1991). Os principais antioxidantes são vitaminas, carotenóides e enzimas endógenas como a glutatona peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). O retinol, a forma de maior circulação da vitamina A no organismo, serve como um precursor metabólico de outros retinóides. Possui grande poder antioxidante (Quadro *et al.*, 2003), porém vários estudos comprovam a ação do retinol, quando em altas concentrações, como um agente oxidante/pró-oxidante (Dal Pizoll et al., 2000).

Assim, objetivou-se neste estudo verificar a condição micronutricional relacionada à potenciais antioxidantes exógenos, como retinol, tocoferóis e carotenóides, em amostras sanguíneas de pacientes submetidos ao tratamento de hemodiálise. E ainda, pesquisar possíveis correlações com o dano oxidativo. Pois sabe-se que estes pacientes possuem distúrbios metabólicos e nutricionais que podem trazer como conseqüência o aumento do risco de doenças vasculares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Insuficiência Renal Crônica (IRC)

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/1,73m² de superfície corporal. O grau da IRC varia de acordo com o índice de filtração glomerular e valores abaixo de 15 ml/min/1,73m² já indicam a falência renal (Draibe e Cendoroglo, 2004).

Várias patologias podem originar a IRC e dentre as mais comuns estão a hipertensão arterial grave, o diabetes mellitus, a glomerulonefrite crônica, a nefropatia túbulo intersticial crônica, os processos renais obstrutivos crônicos e as doenças hereditárias tais como rins policísticos e síndrome de Alport (Warnock, 1997; Mallick e Gokal, 1999; Parmar, 2002; Draibe e Cendoroglo, 2004).

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

A IRC pode ser tratada pela purificação extracorpórea do sangue através de processos dialíticos (hemodiálise ou diálise peritoneal) ou transplante renal. Embora o transplante renal seja o tratamento de escolha, há dificuldades para se obter número suficiente de doadores compatíveis para suprir a demanda necessária. Sendo assim, os

tratamentos dialíticos, principalmente, a hemodiálise continuam sendo a opção mais usada na IRC (Mallick e Gokal, 1999).

2.2 Hemodiálise

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

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

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

O tratamento regular de hemodiálise ameniza parte dos problemas apresentados na IRC e permite uma maior sobrevida ao paciente. Contudo, ele é incapaz de corrigir totalmente os profundos distúrbios metabólicos aos quais os pacientes urêmicos estão

sujeitos. Além disso, esse procedimento amplifica o estresse oxidativo na IRC (Nguyen-Khoa et al., 2001; Morena et al., 2002; Himmelfarb et al., 2002).

2.3 Insuficiências renais e distúrbios metabólicos e nutricionais

A insuficiência renal crônica normalmente está associada a distúrbios metabólicos e nutricionais. A desnutrição está presente em pacientes mantidos sob o tratamento de hemodiálise, sendo que aproximadamente 33% apresentam desnutrição leve a moderada e de 6 a 8% grave (Cuppari et al., 1989; Bergstrom, 1995; Valenzuela et al., 2003). A literatura demonstra a participação de diversos fatores contribuintes para a manifestação da desnutrição na insuficiência renal crônica: ingestão alimentar deficiente, distúrbios hormonais e gastrintestinais, uso de medicamentos, diálise insuficiente e presença de morbididades, como a insuficiência cardíaca e infecções. Além disto, a má nutrição também tem sido associada à inadequada ingestão de proteína, aumento do gasto energético durante o tratamento. Portanto, é de fundamental importância a prevenção da desnutrição ou intervenção apropriada naqueles pacientes que já se apresentam desnutridos. O fornecimento adequado de nutrientes nas diversas etapas do tratamento favorece tanto a manutenção ou recuperação do estado nutricional como a prevenção ou redução da toxicidade urêmica (Chazot et al., 2001).

2.4 Estresse oxidativo e hemodiálise

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

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

2.5 Vitamina E (tocoferóis)

Vitamina E é uma descrição genérica para quatro diferentes tocoferóis e quatro diferentes tocotrienóis. A forma predominante no plasma e que apresenta atividade biológica é o α -tocoferol (Mayne, 2003).

A vitamina E apresenta ação antioxidante, transformando radicais hidroxila e superóxido em formas menos ativas e pode ser regenerada por mecanismos não enzimáticos, pela vitamina C, 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).

Estudos apontam a vitamina E como o mais importante antioxidante endógeno para a lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Bonithon-Kopp et al., 1997; Stampfer e Rimm, 1995) e quando há depleção de antioxidantes na molécula de colesterol LDL, ocorre peroxidação lipídica em cadeia, de modo que a presença de antioxidantes nessa lipoproteína retarda o início deste processo (Mosca et al., 1997). Sua deficiência tem sido associada a um aumento da viscosidade das plaquetas do sangue, predispondo à formação de coágulos potencialmente fatais (Bonithon-Kopp et al., 1997; Stampfer e Rimm, 1995).

Assim, a vitamina E previne doenças ateroscleróticas não somente por seu efeito antioxidante, mas também por seu efeito inibidor sobre a proliferação de células do músculo liso e sobre a adesão e agregação plaquetária (Harris et al., 2002). Além disso, ela 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 (Chan, 1993). Experimentos com animais mostraram que a suplementação com vitamina E aumenta a resistência contra infecções e recentes experiências clínicas também sugerem que a vitamina E reduz o risco de infecções respiratórias (Meydani et al., 2005).

2.6 Vitamina A (Retinol)

A vitamina A, também conhecida pela designação de retinol é um álcool primário, polietilênico e lipossolúvel, apresentando grande capacidade reativa. Essa vitamina é instável aos processos oxidativos e a temperaturas acima de 34°C (Coward, 1927). O termo vitamina A é empregado atualmente para designar todos os derivados de beta-ionona que possuam atividade biológica de retinol, exceto os carotenóides. O termo retinóide se refere ao retinol ou aos seus derivados de ocorrência natural e análogos sintéticos, mostrados na figura 1, que não apresentam necessariamente, atividade semelhante à do retinol (Silveira, 1996).

Os carotenóides são um grupo composto por mais de 400 substâncias diferentes, de ocorrência natural, sintetizados por uma grande variedade de microorganismos fotossintéticos e vegetais. O seu precursor comum, o fitoeno, um hidrocarboneto de 40 carbonos, é convertido em compostos mais insaturados α , β , γ e δ -carotenos. Aproximadamente 50 carotenóides possuem ação biológica de vitamina A. Destes, o de maior atividade *in vivo* é o β -caroteno, um dímero do retinol. A transformação de β -caroteno em retinol é um importante processo no metabolismo dos animais, visto que os compostos carotenóides são biologicamente ativos após sua transformação em retinol, sendo seu teor no sangue em torno de 10,4 $\mu\text{mol/L}$ (Silveira, 1996). O ácido retinóico, um metabólito do retinol, no qual o grupo álcool sofreu oxidação, apesar de ser mais potente que o retinol na promoção da diferenciação e crescimento do tecido epitelial na deficiência da vitamina A, não apresenta a mesma eficiência na restauração da visão ou das funções reprodutivas. Adicionalmente, observa-se que muitos dos derivados retinóides, entretanto, falham em suas funções por ligarem-se a proteínas específicas que os transportam para os tecidos, onde permanecem inativos (Mahan e Stump, 2000). A deficiência primária de vitamina A

resulta da ingestão inadequada de vitamina A pré-formada (retinol) e carotenóides. Deficiências secundárias resultam de má-absorção devido à insuficiência dietética de lipídios, insuficiência pancreática ou biliar e de transporte prejudicado devido a abetalipoproteinemia, doença hepática, desnutrição protéico-calórica ou deficiência de zinco (Mahan e Stump, 2000; Vannucchi, 1991; Booth et al., 1992).

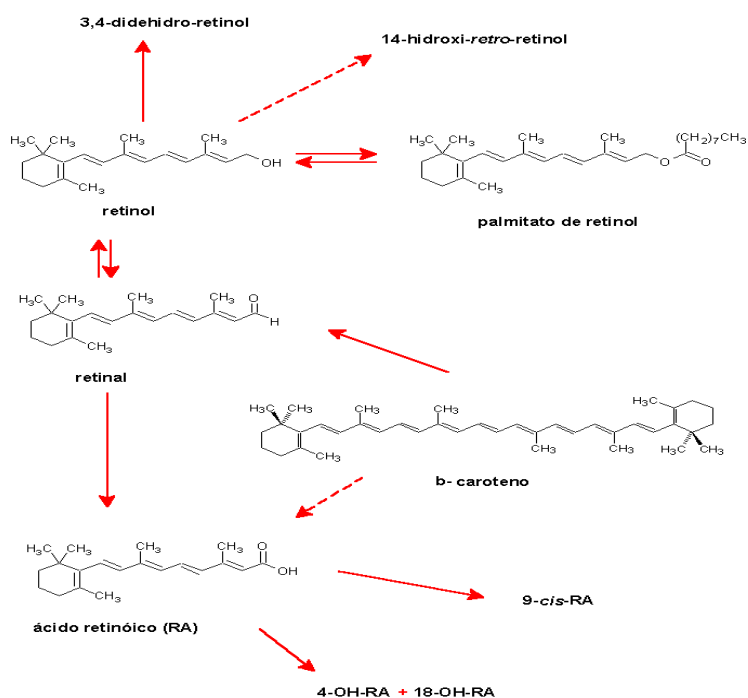


Figura 1. Estrutura da vitamina A e de seus derivados (adaptado de Napoli, 1996).

2.6.1 Absorção

As fontes dietéticas de vitamina A podem ser a vitamina A preformada e a pró-vitamina A, representada pelos carotenóides. O retinol só pode ser encontrado em tecidos animais, tendo como fontes alimentares principais, o fígado, o óleo de fígado de peixes, o leite integral e derivados, os ovos e as aves. Nos países desenvolvidos, considerando-se uma dieta habitual, aproximadamente 25% da vitamina A ingerida se encontra em forma de carotenóide, enquanto 75% é composto de vitamina A

preformada (Li e Norris, 1996). É provável que nos países em desenvolvimento a maior parte desta vitamina seja disponível sob a forma de carotenóides, devido às dificuldades na obtenção de alimentos de origem animal, pelas precárias condições de vida de grande parte de suas populações (Silveira, 1996). Tomando-se em conta a nossa população, após a ingestão de β -caroteno, essencialmente de frutas e hortaliças, a absorção do retinol é realizada similarmente à das gorduras. A absorção do retinol é quase integral em condições de normalidade do aparelho gastrointestinal, observando-se que sua absorção e de seus ésteres é mais completa em jejum e se administrados com soluções aquosas (Mahan e Stump, 2000).

2.6.2 Transporte

A vitamina A pode ser mobilizada do fígado para distribuição aos tecidos periféricos na dependência da oferta do aporte alimentar. Sendo essa deficiente, esse processo envolve a hidrólise de ésteres de retinil, fazendo com que o fígado mantenha uma concentração constante de sua forma ativa na circulação. A ligação de retinol a um transportador específico, a RBP (proteína carreadora do retinol), que circula no plasma em um complexo com TTR (transtiretina, pré-albumina), impede a excreção do complexo retinol-RBP na urina (Mahan e Stump, 2000). A taxa normal de retinol no plasma é de 1,04 $\mu\text{mol/L}$ a 2,43 $\mu\text{mol/L}$ (30 a 70 $\mu\text{g/dl}$). Porém, em indivíduos saudáveis, o retinol plasmático é mantido dentro de uma variação estreita de 1,39 a 1,73 $\mu\text{mol/L}$ (40,1 a 49,9 $\mu\text{g/dl}$) em adultos e aproximadamente metade desses valores nas crianças. Visto que a síntese hepática da RBP depende da presença tanto de zinco quanto de aminoácidos e de níveis de retinol plasmático, os níveis da RBP podem ser afetados por diferenças daqueles nutrientes bem como deficiência crônica da vitamina A grave o suficiente para depletar estoques de ésteres de retinil hepático (Booth et al., 1992). Assim, crianças com desnutrição protéico-calórica tipicamente mostram baixos níveis circulantes de retinol que pode não responder à suplementação de vitamina A, a menos que a deficiência protéica seja corrigida (Vannucchi, 1991).

2.6.3 Armazenamento

O armazenamento da retinol é feito sob forma de ésteres de retinil. Cerca de 50-80% da vitamina A no corpo é estocada no fígado onde é ligada à proteína ligadora de retinol (RBP). Esse estoque regula os efeitos de variabilidade nas taxas de ingestão de vitamina A, particularmente contra os riscos de deficiência durante os períodos de baixa ingestão dessa vitamina. A administração de pequenas quantidades de vitamina E aumenta o armazenamento do retinol nos tecidos (Mahan e Stump, 2000). Alguns trabalhos não consideram a concentração sanguínea como um guia recomendável para um estudo individual da vitamina A, porém vários classificam como o melhor método avaliador das concentrações de vitamina A (Silveira, 1996; Mahan e Stump, 2000).

2.6.4 Metabolismo

Na presença de anormalidades da absorção das gorduras, a absorção do retinol também sofre redução. As principais fases do metabolismo do retinol são mostradas na figura 2. O retinol é liberado das proteínas no estômago. O produto dessa ação são os *ésteres de retinil que, no intestino delgado, são hidrolizados de novo* a forma de *retinol*, que é absorvido mais eficientemente do que os ésteres. Já os carotenóides com atividade pró-vitamina A, quando há necessidade e uma diminuição da ingestão de retinol, são clivados dentro das células da mucosa intestinal em moléculas de *retinaldeído*, que posteriormente são reduzidos a retinol. Após a absorção do retinol ocorre a conjugação do mesmo ao ácido glicurônico, seguida da entrada na circulação êntero-hepática onde resultam dois produtos, a esterificação do retinol originando ésteres de retinil ou a oxidação do retinol originando o ácido retinóico. Tanto os ésteres de retinil quanto o ácido retinóico serão transportados no plasma (Mahan e Stump, 2000).

O retinol não é eliminado na urina e sob forma inalterada é excretado somente em casos de nefrite crônica. Quando altas doses de vitamina A são administradas é

que certa proporção sofre excreção sob forma inalterada nas fezes. O ácido retinóico, absorvido após passagem na circulação pela veia porta é transportado no plasma como um complexo ligado à albumina. De modo diferente do retinol, o ácido retinóico não é armazenado no fígado, sendo rapidamente excretado (Mahan e Stump, 2000).

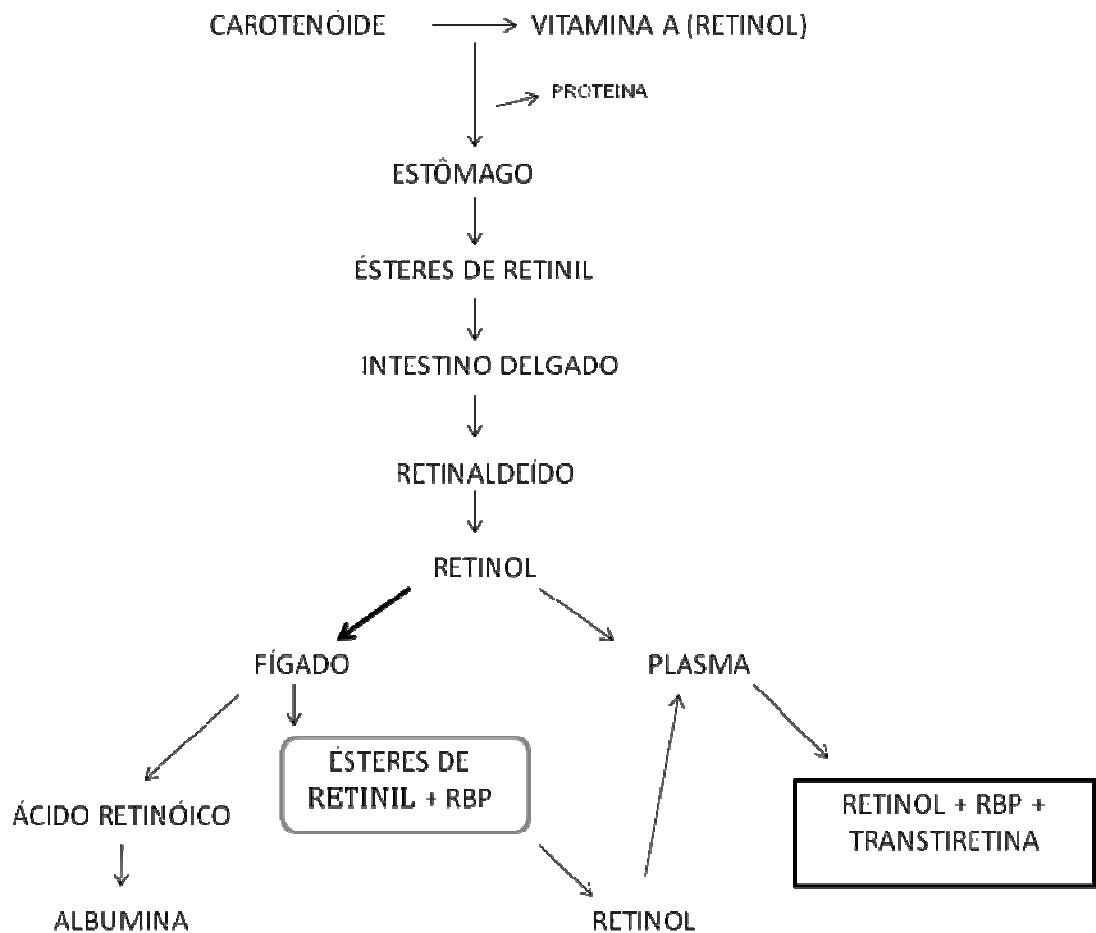


FIGURA 2. Metabolismo do retinol (absorção, armazenamento, transporte e eliminação) (Mahan e Stump, 2000).

2.6.5 Retinol como antioxidante

O potencial antioxidante do retinol foi primeiramente descrito pelo trabalho de Monaghan e Schmitt (1932), os quais relatam que a vitamina A pode proteger lipídios de rancidez. A atividade antioxidante do retinol pode ser pelo fato dele atuar como um agente de quebra de cadeia oxidativa por se combinar com o radical peróxil, antes que esse radical possa propagar a peroxidação na fase lipídica da célula e gerar hidroperóxidos (Palace et al., 1999). Tesoriere e colaboradores (1993) sugerem esta propriedade ao retinol, comparada ao tocoferol, pela sua curta cadeia de polienos, que permite uma alta mobilidade e melhor oportunidade para interagir com o radical peróxil na membrana (Das, 1989). Já Dal-Pizzol e colaboradores (2000) sugerem que doses de 7 μ M de retinol podem induzir peroxidação lipídica e alterar o balanço redox em culturas de células Sertoli, efeito esse que pode ser diminuído com a utilização de 1,10-fenantrolina, um quelante de ferro. Esses autores também demonstraram que as defesas antioxidantes como CAT, GPx e SOD têm sua atividade aumentada e ocorre uma indução da proliferação celular em células tratadas com a vitamina A.

2.7 Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais sintetizados por plantas e microrganismos, sendo componentes essenciais dos alimentos (Sthal e Sies, 2003). Consistem em mais de 600 componentes, inclusive isômeros, todos os quais são polisoprenóides. Possuem um extenso sistema de duplas ligações conjugadas, geralmente contendo 40 átomos de carbono, normalmente apresentando isomeria interna, e sempre tendo uma ou duas estruturas cíclicas que terminam em ligações conjugadas (Olson et al., 1995). Essas são responsáveis por sua cor e por algumas de suas funções biológicas (Moreira e Shami, 2004).

São coloridos, possuindo um espectro que vai do amarelo ao vermelho (Olson et al., 1995), tendo como função primária absorver luz durante a fotossíntese em plantas ou fotoproteção em microrganismos. Algumas das principais fontes de carotenóides são cenouras e abóboras (α e β -caroteno), tomates e produtos derivados, como extrato,

polpa e molhos (licopeno), espinafre (luteína) e laranja (β -criptoxantina) (Silva e Naves, 2001).

São constituintes normais do sangue e tecidos de humanos, sendo distribuídos primariamente no tecido adiposo (80-85%), fígado (8-12%), e músculo (2-3%) e com pequenas quantidades em outros tecidos (Olson, 1983). O soro contém β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno e luteína como os principais componentes, com baixas concentrações de zeaxantina (Parker, 1989). A figura 3 representa os principais carotenóides encontrados no sangue.

Dos mais de 600 carotenóides, menos de 10% atuam como precursores de vitamina A. O β -caroteno é o carotenóide nutricionalmente mais ativo compreendendo 15 a 30% dos carotenóides séricos totais, sendo que a vitamina A é formada primariamente pela clivagem central deste (Bendich, 1989), preferencialmente no fígado e intestino (Moore, 1957). Teoricamente, o β -caroteno é clivado e produz 2 moléculas de retinal que por um processo de redução transforma-se em retinol (Napoli, 1996). Entretanto, diferenças na taxa de absorção, suscetibilidade para a oxidação e a habilidade para ser convertido a retinal, ácido retinóico e retinol, contribuem no fato do β -caroteno fornecer menos do que 50% da atividade biológica da vitamina A. De fato, em humanos a taxa de conversão admitida de β -caroteno para retinol é de 6:1 (Olson, 1983; Wang, 1994).

2.7.1 Absorção

A absorção e o metabolismo de carotenóides têm uma grande variação entre espécies animais. Em humanos e só em alguns outros mamíferos (macacos, o furão e os bovinos), uma quantidade apreciável de carotenóides pode ser absorvida intacta pelas células da mucosa e conseqüentemente aparecem inalterados na circulação e tecidos periféricos (Bowen et al., 1993; Erdman et al., 1993). Em roedores e outros animais de gordura branca (contra os de gordura amarela), os carotenóides provitamina A são metabolizados a vitamina A nas células da mucosa intestinal ou não são absorvidos (e excretados pelo trato gastrointestinal) a menos que fosse administrado doses suprafisiológicas. Assim, concentrações plasmáticas normalmente são baixas e a distribuição tecidual não é comparável à de humanos. Em humanos, proporções

variáveis dos carotenóides absorvidos pelas células da mucosa intestinal são metabolizados o que complica a interpretação da resposta dos carotenóides no plasma como um indicador depois da administração desses em estudos (Parker, 1996).

A absorção dos carotenóides ocorre na mucosa intestinal, e a captação destes compostos pelas células da mucosa duodenal parece ser por difusão passiva, a favor de um gradiente de concentração entre a quantidade de carotenóide na micela e aquela na membrana da célula presumida como sendo o determinante na taxa de difusão destes compostos (Parker, 1996). Após a captação pelo enterócito, os carotenóides não metabolizados são incorporados pelo quilomícron e segregados pela linfa, seguida pela captação hepática e liberando novamente na circulação em associação com a VLDL e finalmente em associação com a LDL (Erdman et al., 1993). A eficiência da absorção dos carotenóides é relativamente baixa (<30%), e a porcentagem absorvida diminui com aumento da ingesta (Olson, 1994).

2.7.2 Transporte

Os carotenóides na circulação são transportados em associação com as lipoproteínas, com uma distribuição semelhante a do colesterol, por isso as concentrações plasmáticas de colesterol são altamente correlacionadas com as concentrações circulantes de carotenóides quando os dados populacionais são analisados (Clevidence e Bieri, 1993; Olson, 1994). No total, aproximadamente 75% dos carotenóides plasmáticos estão ligados a LDL, e os restantes são distribuídos entre as VLDL e HDL. Os carotenóides com menor polaridade (por exemplo, β -caroteno, α -caroteno e licopeno) são predominantemente ligados a LDL, enquanto os carotenóides mais polares (luteína) são associados mais com a HDL do que LDL. Em comparação com α -tocoferol, que também é associado com lipoproteínas, a quantidade de carotenóides circulantes com as lipoproteínas é relativamente pequena. Por exemplo, (Romanchik et al., 1995) aproximadamente 4 moléculas de carotenóides foram encontradas associadas a cada VLDL e 1 em cada partícula de LDL, enquanto que apenas 25 de cada 1000 partículas de HDL contém carotenóides.

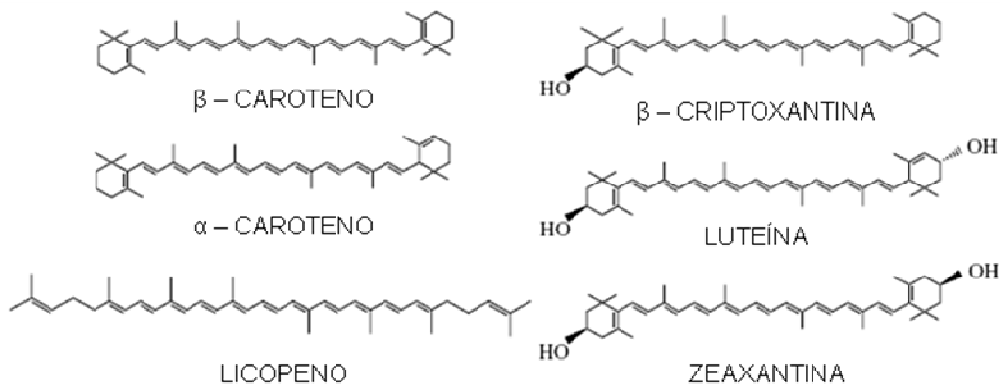


FIGURA 3. Principais carotenóides encontrados no plasma (luteína, zeaxantina, α - e β – caroteno, β -criptoxantina, licopeno) (Krinski e Johnson, 2005).

2.7.3 Armazenamento

O tecido adiposo (especialmente devido ao seu volume) e o fígado são os tecidos onde ocorrem os maiores depósitos de carotenóides, embora estes compostos também tenham sido encontrados nos pulmões, rim, colo, próstata e em muitos outros tecidos (Schmitz et al., 1991). Altas concentrações de carotenóides são encontradas em tecidos que são ricos em receptores de LDL, tais como o corpo lúteo, tecido adrenal e testículos, provavelmente resultante da absorção inespecífica pelas lipoproteínas. Em geral, a concentração de carotenóide nos tecidos reflete diretamente a ingestão destes compostos. Por esta razão, as concentrações de carotenóides no plasma podem funcionar como biomarcadores da ingestão de hortaliças e frutas (as maiores fontes), quando outras variáveis que influenciam são consideradas, e são utilizadas como marcadores de conformidade nas intervenções com grandes quantidades de vegetais (Rock et al., 1997).

2.7.4 Metabolismo

Os conhecimentos atuais sobre o metabolismo dos carotenóides em seres humanos dizem respeito principalmente à relação entre estes compostos e a vitamina

A. Apenas aqueles carotenóides que têm pelo menos um anel β -ionona não substituído anexado a uma estrutura de C-7 para C-15 intacto de polieno conjugado pode ser metabolizado a retinal, que é então reduzido para retinol (Goodwin, 1986). Devido a estes requisitos estruturais, o β -caroteno é o mais importante carotenóide provitamina A, embora outros (por exemplo, α -caroteno, β -criptoxantina) também satisfaçam estes requisitos. O mecanismo principal pelo qual o β -caroteno é metabolizado a retinal (que é posteriormente convertido em retinol) acredita-se que seja através de clivagens centrais pela enzima citosólica β -caroteno-15, 15'-dioxigenase (Goodwin, 1986). Existem estudos nos quais foram utilizados tecido intestinal humano e fígado de ratos indicando que o 9-cis- β -caroteno funciona como um precursor para ambos trans - e 9-cis-ácido retinóico (Nagao e Olson, 1994; Wang et al., 1994). Carotenóides pro vitamina A não são convertidos em retinol a menos que haja necessidade, e o rendimento de conversão é conhecido por ser baixo (Solomons e Bulux, 1993). A excreção de metabólitos dos carotenóides ainda não foi identificada. O pressuposto geral é de que o processo de degradação de carotenóides e seus metabólitos é suscetível de ser semelhante ao da vitamina A e dos retinóides. O citocromo P450 do fígado participa no metabolismo do retinol e ácido retinóico à metabólitos polares (Leo et al., 1989) assim existe a possibilidade do envolvimento deste sistema no metabolismo dos carotenóides. Devido à absorção ineficiente destes compostos, a maior parte dos carotenóides que são ingeridos são excretados nas fezes (Rock et al., 1996).

2.7.5 Carotenoides como antioxidantes

Os carotenóides apresentam características importantes, como a de seqüestrar o oxigênio singleto. Este é muito mais reativo que o oxigênio tripleto presente no ar, podendo interagir com muitos componentes celulares produzindo derivados oxidativos inativados. Também há interação dos carotenóides com o oxigênio singleto para produzir oxigênio tripleto e um carotenóide tripleto, o qual torna sua energia inofensiva (Olson, 1995; Britton G, 1995). Estas moléculas altamente reativas podem interagir com outros radicais livres, como os radicais peróxido e hidróxido, gerando produtos não radicalares, ou eles podem interagir com outras moléculas para restaurar o carotenóide

ao estado fundamental enquanto produz alguns radicais livres (Britton., 1995). A remoção de radicais livres das células, geralmente é considerada benéfica, e a geração de radicais livres nas células é geralmente nociva. Sob condições fisiológicas as ações antioxidantes dos carotenóides mostram-se predominantes (Britton, 1995; Krinsky, 1994). Além da reação tipo mediador citado acima, os carotenóides podem ser oxidados, tanto química como biologicamente, por fortes oxidantes, gerando uma variedade de produtos (Liebler, 1996).

Outros efeitos benéficos dos carotenóides incluem aumento da função do sistema imune (Bendich, 1989), proteção da radiação solar (Mattews-Roth,1990), e inibição do desenvolvimento de certos tipos de câncer (Nishino, 1998).

2.8 Espécies reativas

As espécies reativas de oxigênio (EROS) e as de nitrogênio (ERNS) estão envolvidas em importantes processos patológicos. As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radicalares: superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-) peroxila (ROO^-) e alcóxila (RO^-); e as não-radicalares: oxigênio singlete (1O_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso. A figura 4 representa a formação de espécies reativas de oxigênio. Dentre as ERNS incluem-se o óxido nítrico (NO^-), o óxido nitroso e o peroxinitrito ($HNOO^-$), dentre outros (Gilham et al., 1997; Sies, 1997). A maioria destes compostos apresenta tempo de vida médio bastante curto.

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 (Gilhan et al., 1997).

Eles podem ser formados no organismo de diversos modos. Durante a fosforilação oxidativa, mecanismo usado pelas células para produzir energia química (ATP), parte dos elétrons é transferida para o oxigênio, dando origem ao radical ânion superóxido (O_2^-) (Junqueira e Ramos, 2005). Eles podem ainda ser produzidos durante a oxidação de ácidos graxos, reações do citocromo P_{450} e de células fagocíticas, entre outros. 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).

Em condições fisiológicas normais as EROs podem desempenhar 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). No entanto, o aumento na sua produção e/ou a redução na sua eliminação gera um desequilíbrio fisiológico, caracterizando o estresse oxidativo (Beal, 1995; Finkel e Holbrook, 2000; Gutteridge e Halliwell, 2000; Junqueira e Ramos, 2005).

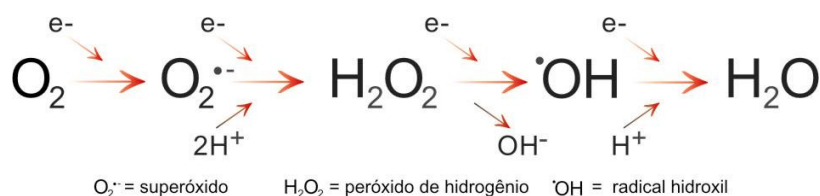
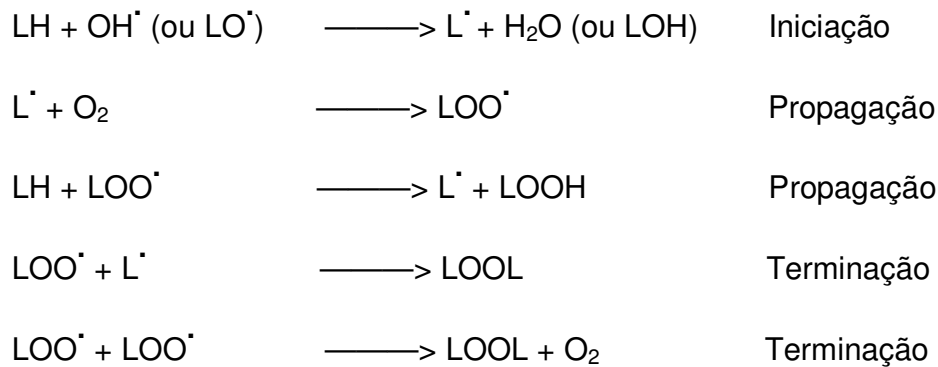


Figura 4. Formação de Espécies Reativas de Oxigênio através da redução do oxigênio (Adaptado de Nordberg & Årner, 2001).

2.9 Peroxidação lipídica

O ataque de espécies reativas aos lipídios das membranas desencadeia um processo chamado peroxidação lipídica (Urso e Clarkson, 2003), formando muitos produtos secundários. Estes produtos são principalmente aldeídos, com habilidade para aumentar o dano oxidativo (Uchida, 2000) entre eles, o malondialdeído (MDA) é considerado o principal e o mais estudado.

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio:



A reação acima se inicia com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo OH^\cdot ou pelo LO^\cdot (radical alcoxila), com conseqüente formação do L^\cdot (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o L^\cdot reage rapidamente com o O_2 , resultando em LOO^\cdot (radical peroxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o L^\cdot na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L^\cdot e LOO^\cdot) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios (Ferreira e Matsubara, 1997).

A formação de 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).

O tempo de vida longo e a alta reatividade permitem a estas moléculas agir tanto dentro quanto fora das células, interagindo com outras biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas, freqüentemente levando a danos irreversíveis sobre o delicado mecanismo de funcionamento da célula (Del Rio, 2005). O contínuo dano oxidativo leva a destruição de membranas, ricas em ácidos graxos poliinsaturados, diminuindo a sua fluidez e contribuindo para a injúria celular (Hershko, 1989). Ocorre perda da seletividade na troca iônica, inativação de enzimas e proteínas de transporte da membrana e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos. Adicionalmente, a oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e

veias, facilitando o acúmulo destes lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (Barreiros et al., 2006).

Apesar disto, 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 (Jamieson, 1989). Todavia, a excessiva liberação destes produtos durante o dano oxidativo pode causar edema celular, modificações na permeabilidade vascular, quimiotaxia e danos teciduais (Blake et al., 1987), implicando, por exemplo, na patogênese da aterosclerose (Vagimigli et al., 2003).

2.10 Enzima δ -aminolevulinato desidratase (ALA-D)

A ALA-D é uma enzima essencial em muitos organismos como um componente da rota de biossíntese do heme, catalisando a condensação de duas moléculas de ácido δ -aminolevulínico (ALA), mostrada na figura 5, para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio. Assim, por participar na biossíntese de moléculas tetrapirrólicas tem ação na constituição de grupos prostéticos de importantes proteínas fisiológicas como a hemoglobina e os citocromos (Sassa, 1998). É uma enzima que apresenta grupamentos sulfidrilas na sua constituição e sua atividade é altamente sensível a presença de elementos pró-oxidantes, os quais podem oxidar seus grupamentos $-SH$ (Bolzan et al., 2002).

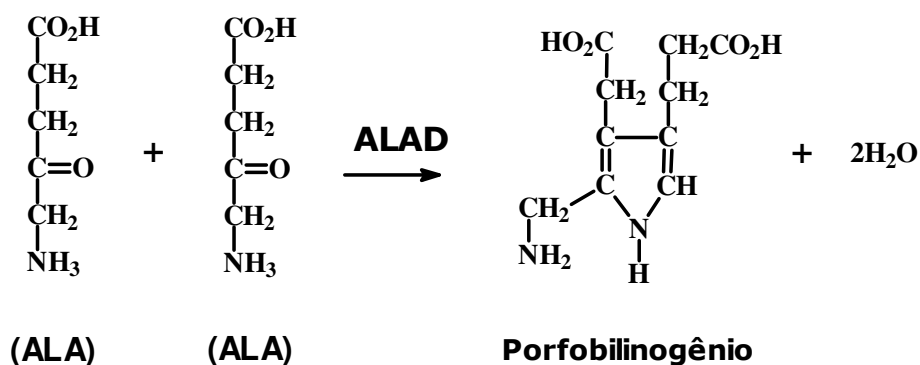


Figura 5. Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima δ -aminolevulinato desidratase, formando o porfobilinogênio (Sassa, 1998).

A inibição da ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em conseqüências patológicas, tais como anemia (Goering, 1993). Além da redução na síntese do heme, a inibição desta enzima pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA pode estar relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (Pereira et al., 1992; Bechara et al., 1993).

Em patologias humanas, tais como câncer (Gonçalves et al., 2005); diabetes (Fernandez-Cuartero et al., 1999), insuficiência renal crônica (Fontanellas et al., 2002) e pacientes hemodialisados (Valentini et al., 2007) são relatadas diminuições de atividade da ALA-D, ao mesmo tempo em que ocorrem danos oxidativos.

2.11 Antioxidantes

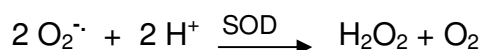
Frente à ação potencial lesiva das substâncias reativas, torna-se vital um delicado controle de sua produção e consumo dentro das células, ou seja, um fino balanceamento de sua concentração intra e extracelular. A figura 6 representa o modelo simplificado do sistema oxidante e antioxidante nas células. Isso é possível graças à atividade dos antioxidantes que, removendo as substâncias reativas, as mantêm em baixas concentrações (Reilly et al., 1991).

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

2.11.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD foi a primeira enzima antioxidante a ser descoberta (Halliwell & Gutteridge, 2000) em células eucarióticas aeróbias. Sua função é a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , que é menos reativo e pode ser degradado por outras duas enzimas, como catalase e glutathiona peroxidase. A metabolização do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 é realizada por duas isoenzimas, uma mitocondrial (MnSOD) e outra citosólica (CuZnSOD).

Na reação catalisada pela SOD, duas moléculas de superóxido formam peróxido de hidrogênio e oxigênio. A reação catalisada por SOD é extremamente eficiente, limitada a princípio pela difusão.

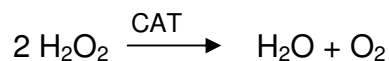


Na mitocôndria, o superóxido é formado relativamente em altas concentrações, devido à dispersão de elétrons da cadeia respiratória, sendo a MnSOD essencial.

A função principal das enzimas SOD seria proteger as proteínas contendo [4Fe-4S], tal como a aconitase mitocondrial (que catalisa a conversão do citrato a isocitrato no ciclo do ácido cítrico), da ação do ânion superóxido, prevenindo o acúmulo de ferro intracelular (Borella e Varela, 2002).

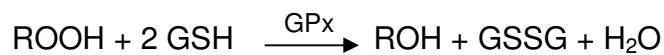
2.11.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma heme-enzima, que tem localização subcelular predominante no peroxisomo, onde catalisa a dismutação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Fridovich, 1998). Como a CAT tem o peróxido de hidrogênio como único substrato, a sua atividade está intimamente relacionada com a concentração desta espécie reativa.

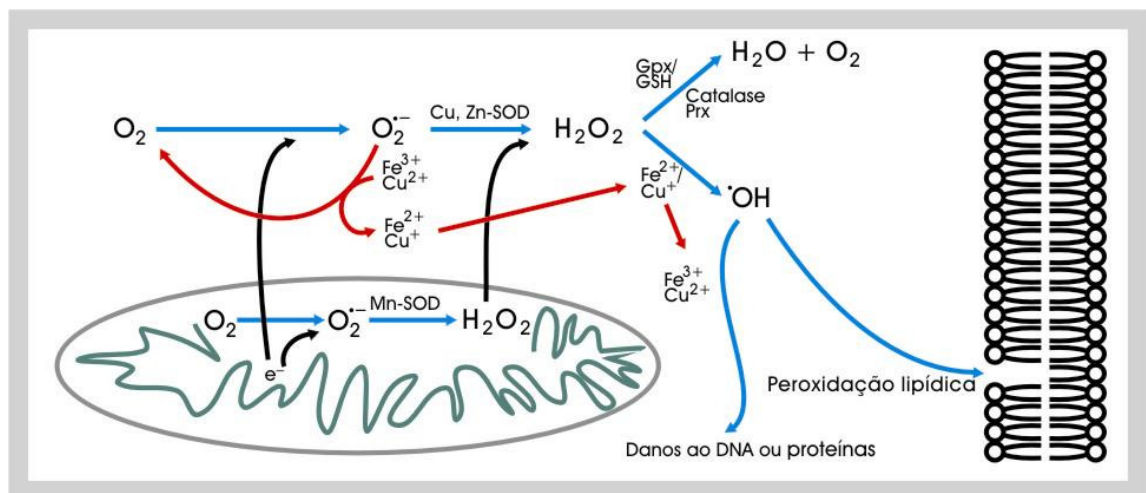


2.11.3 Glutathiona Peroxidase (GPx)

A GPx é uma enzima dependente de selênio, e é importante para a proteção contra peróxidos orgânicos (ROOH) e peróxido de hidrogênio. Para sua atividade, a GPx necessita da presença de glutatona reduzida (GSH) conforme a reação abaixo:



Na mitocôndria de mamíferos, é a principal defesa contra H_2O_2 , já que essas organelas de maneira geral não apresentam catalase.



SOD = Superóxido dismutase GPx = Glutaciona peroxidase GSH = Glutaciona reduzida

Figura 6. Representação simplificada dos sistemas oxidante e antioxidante nas células (modificado de Nordberg & Årner, 2001).

2.11.4 Glutaciona reduzida (GSH)

A glutaciona é um tripeptídeo, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina. Além de ser o principal tiol não-protéico intracelular livre, encontrado em vários tecidos biológicos, é também, o principal antioxidante endógeno (Nozal et al., 1997) sendo considerada um antioxidante multifatorial (Cecconi et al., 1988). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento $-\text{SH}$, presente em sua molécula. Dentre outras funções fisiológicas, ela é sequestradora 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). A figura 7 mostra o sistema glutaciona e a interconversão nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e o papel das enzimas glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR).

No sangue, 99,5% da glutaciona se encontra no interior dos eritrócitos e uma pequena quantidade está associada às membranas destes (Mills e Lang, 1996). Embora presente em várias formas: reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e ligada às proteínas (PSSG), a GSH é a forma mais abundante (Nozal et al, 1997).

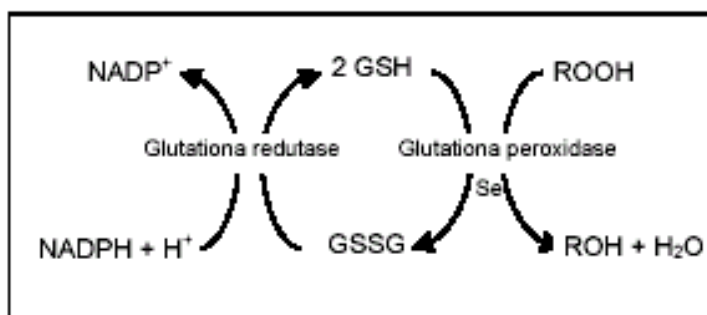


Figura 7. Sistema antioxidante da glutaciona e suas enzimas envolvidas (Sies et al., 1972).

O núcleo do resíduo cistenilglicina da glutaciona está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical GS^\cdot , que produz, por dimerização, o GSSG (glutaciona oxidada). A redução de H_2O_2 e peróxidos orgânicos a seus álcoois correspondentes com a conversão de GSH em GSSG é catalisada pela enzima GPx dependendo essencialmente da presença de selênio. A GSSG é, então, reduzida pela GR, regenerando a GSH, num processo dependente de NADPH (Shan et al., 1990).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

3.1 Artigo I

The plasma retinol levels as pro-oxidant/oxidant agents in hemodialysis patients

Artigo aceito para publicação na Revista *“Nephrology and Dialysis Transplantation”*

Objetivos

Verificar a possível associação entre os níveis plasmáticos de retinol e o estresse oxidativo em pacientes submetidos ao tratamento de hemodiálise.

The plasma retinol levels as pro-oxidant/oxidant agents in hemodialysis patients

Miguel Roehrs^{1,2}, Juliana Valentini², Rachel Bulcão², José Cláudio Moreira³, Hanz Biesalski⁴, Renata P. Limberger⁵, Tilman Grune⁴, Solange Cristina Garcia^{2*}

¹Post-graduate Program of Pharmacology, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

²Laboratory of Toxicology (LATOX), Department of Clinical and Toxicology Analysis, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

³Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Institute of Biological Chemistry and Nutrition, University of Hohenheim, Garbenstraße, Stuttgart, Germany.

⁵Department of Clinical and Toxicology Analysis, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Direct correspondence to Prof Dr Solange Cristina Garcia.

E-mail adress: sgarpom@smail.ufsm.br (S. C. Garcia).

Abstract

Background: Oxidative stress is a process involved in hemodialysis-related pathologies such as cerebrovascular diseases. Retinol is the major circulating form of vitamin A and it is elevated in hemodialysis (HD) patients. It is known that these patients present anemia that is not totally responsive to erythropoietin. The aim of this study was to evaluate the influence of plasma retinol levels on oxidative stress biomarkers, especially on δ -aminolevulinate dehydratase.

Methods: Plasma retinol and malondialdehyde (MDA) levels were quantified by HPLC-UV/VIS; blood activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and δ -aminolevulinate dehydratase (ALA-D) were analyzed by spectrophotometric methods; all in HD patients (n=29) and healthy subjects (n=20).

Results: The MDA and retinol levels, SOD and CAT activities were significantly increased in HD patients. ALA-D activity was significantly decreased. Retinol levels were correlated with MDA levels ($r=0.68$), CAT ($r=0.39$), SOD ($r=0.40$) and ALA-D ($r=-0.55$). It was found partial correlation between retinol levels with ALA-D ($r=0.43$), SOD ($r=0.30$) and CAT ($r=0.36$) activity, utilizing MDA levels as co-variable.

Conclusion: Higher retinol levels may be associated with the increase of SOD and CAT activities, but this increase was not sufficient to prevent the lipid peroxidation and ALA-D thiolic group oxidation. In this manner, our results could suggest that high retinol levels contribute as an additional factor to the oxidative tissue damage.

Key-words: ALA-D activity; anemia; hemodialysis; MDA; oxidative stress; retinol levels.

Introduction

Hemodialysis treatment is the main resource for patients in the end-stage of renal disease, who are either waiting for, or are not suitable to undergo renal transplantation [1]. In CRF patients under hemodialysis treatment (HD) the formation of reactive oxygen species (ROS) is amplified and the oxidative stress may be one of the most relevant complications occurring. This problem may not have immediate clinical effects, although it may represent a long term complication derived from the repetitive effects of blood-membrane interaction [2-4]. Nevertheless, the multifactorial nature of this process [3] might include other factors peculiar to chronic HD treatment, such as the absence of a complete correction of the uremic toxicity, malnutrition and the progressive worsening of the clinical condition due to aging and co-morbidity [2-4].

Retinol, the major circulating form of vitamin A, was shown to have some antioxidant properties [5], although recent studies demonstrated that in higher doses it is a pro-oxidant and modulates antioxidants enzyme activity. Anyway, the mechanism by which retinol can act as a pro-oxidant is not well elucidated yet [6].

Vitamin A plays an essential role in maintaining mammalian health. It is required for many crucial biological functions such as vision, reproduction, growth and immunity [7-8]. These are generated intracellularly by two oxidative enzymatic reactions in which retinol is converted first to retinaldehyde and then to retinoic acid [9]. Vitamin A is normally transported in plasma as retinol linked by a specific transport protein, which is known as retinol-binding protein (RBP) [10-11]. When dietary vitamin A is not available, RBP is able to mobilize retinol from vitamin A stores in the liver to supply peripheral cells and tissues with retinoids needed for various biological functions [12].

The oxidative stress biomarkers include superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx); enzymes are the first endogenous antioxidants, and they catalyze important defense reactions to clear up the detrimental ROS *in vivo*. Any factors that undermine the activities of antioxidant enzymes may lead to accumulation of ROS and subsequently oxidative damage to biological macromolecules [13].

On the other hand, δ -aminolevulinatase (δ -ALA-D), a zinc metalloenzyme of the heme biosynthesis pathway, requires reduced thiol groups for its activity [14]. For this reason, ALA-D has been suggested as a biomarker for oxidative stress [15-16]. One of them, δ -aminolevulinic acid (ALA) has been shown to induce pro-oxidant events [17-18]. It is important to clarify that δ -ALA-D activity is decreased in CRF, especially during HD treatment [19-21]. Furthermore, malondialdehyde (MDA) is a more specific and sensitive biomarker for the evaluation of the lipid peroxidation status in many pathologies [22], including in patients under chronic hemodialysis treatment [23].

The aim of this study was to verify the possible influence of plasma retinol levels on classical oxidative stress blood biomarkers (enzymatic antioxidants and plasma MDA levels - the largest used lipid peroxidation biomarker) and on erythrocyte ALA-D activity in HD patients, comparing to healthy subjects.

Materials and methods

Chemicals

5'-Aminolevulinic acid (ALA), 2-Thiobarbituric acid (TBA), Dithiothreitol (DTT) and retinol were purchased from Sigma (St. Louis, USA). All other chemicals used in this study were of the highest purity available.

Subjects

Twenty nine patients with diagnosis of CRF (19 men and 10 women) undergoing regular hemodialysis (HD) treatment at Caridade and Casa de Saúde Hospitals, located in Santa Maria, RS, Brazil. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria (protocol n^o: 091/2003) and all the patients gave their informed consent prior to the inclusion in the study. To be part of this work the patients should carry out regular hemodialysis, however the smoking ones, with alcoholism problems, diabetes, viral hepatitis and HIV were not included in the research. Patients using any antioxidant vitamin in the last 3 months were also excluded. The patients who participated were using vitamin D, erythropoietin, statines and noripurum (saccharate ferric hydroxide), and were performing dialysis three times per week during the morning, with duration of four hours each session being the last one 2 days before the drawn.

The control group consisted of 20 healthy subjects (10 men, 10 women), who did not have clinical history of renal diseases or other pathologies. All the volunteers did not receive antioxidants vitamins, were nonsmokers, and have not consumed alcohol regularly.

Samples

Venous blood samples (10 ml) were drawn from HD patients, before the hemodialysis session. In the control group the collection was held during the morning. Then, these samples were divided in heparinized tubes, EDTA-containing tubes, and tubes without anticoagulant. Plasma-EDTA and serum were obtained by centrifugation at 1500 *g* for 10 minutes at 4 °C.

Hematological determinations

Hemoglobin (Hb) and hematocrit (Hct) were determined in Cobas Micros system, (Hematology Analyzer, Roche Diagnostics®).

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by measured malondialdehyde (MDA). The measurement of plasmatic MDA was determined by high performance liquid chromatographic with visible detection (HPLC-VIS), according to the method of Grotto et al. [24].

δ-ALA-D activity

δ-Aminolevulinate dehydratase activity was determined in the total blood, with heparin as anticoagulant, according to the method of Sassa [25] including some modifications. The enzyme activity was determined by the rate of porphobilinogen (PBG) formation, in the presence and absence of the reductor agent dithiothreitol (DTT- 2 mM final concentration). The enzyme reaction was initiated after 10 min of pre-incubation. The reaction was started by adding δ-aminolevulinic acid (ALA) to a final concentration of 4 mM in phosphate buffered solution at pH 6.8; incubation was carried

out for 1h at 37°C and the reaction product was measured at 555 nm. The reactivation index was estimated using: $A-B/A*100$, being A= absorbance ALA-D with DTT, and B= absorbance of ALA-D without DTT.

Retinol assay

Plasma retinol quantification was performed after liquid-liquid extraction with a solution of n-butanol: ethanol (50:50) in BHT (2, 6-di-ter-butyl-4-methylphenol) mixed by vortex and followed by centrifugation. The supernatant was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV/VIS detector, according to Murata et al. with modifications [6]. The β - apo – 8 caroteno were utilized as internal standard.

Antioxidant enzyme activities

Enzymes assays were determined in the total blood with heparin. Superoxide dismutase activity was determined based on its ability to inhibit the autoxidation of adrenaline into adrenochrome at an alkaline pH [26]. Catalase activity was determined using H_2O_2 as substrate [27]. They were measured spectrophotometrically using a UV-VIS model Hitachi U 1800[®].

Biochemistry Assay

Serum creatinine and urea were determined in Cobas Integra system, (Roche Diagnostics[®]).

Statistical analysis

Statistical computations were performed with Statistica® 6.0 software system (Statsoft Inc., 2001). The results are expressed as mean \pm standard error medium (SEM). Comparisons between groups were achieved by test *t* of Student or Mann-Whitney test, depending on the variables distribution. Pearson's correlation or Spearman's rank order correlation were used to evaluate the relationship between pairs of variables, following the variables distribution. Partial correlation was used to evaluate the relationship between a pair of variables while controlling for a third variable. A value of $p < 0.05$ (5%) was considered significant.

Results

The general characteristics from hemodialysis patients and healthy subjects as age, sex distribution, hemodialysis time and biochemicals parameters are presented in the table 1.

Table 1

Retinol assay

Plasma retinol levels were significantly increased in HD patients compared to healthy subjects, almost three times-fold; being 6.86 ± 0.60 vs 2.41 ± 0.12 $\mu\text{mol/L}$, respectively ($p < 0.0001$). On the other hand, plasma MDA levels, the biomarker of lipid peroxidation, also were significantly increased in HD patients (Figure 1). Moreover, plasma retinol levels were correlated positively with MDA levels (Figure 2) and presented negative correlation with the ALA-D activity (Figure 3).

Figure 1

To verify if plasma retinol levels and plasma MDA levels are indeed independent variables influencing ALA-D activity it was estimated the partial correlation between each one of these variables and ALA-D activity, while controlling for the other variable. Controlling for plasma retinol levels, partial correlation analysis revealed no significant relation between MDA levels and ALA-D activity ($r=-0.11$, $p>0.05$). However, the partial correlation analysis revealed a negative relation between plasma retinol levels and ALA-D activity ($r=-0.43$, $p<0.05$), controlled for MDA levels. Additionally, when controlling for retinol levels it was observed no linear correlation between activities of the antioxidants enzymes and MDA levels.

The retinol levels also correlated with the catalase and SOD activity, being ($r=0.39$ and $r=0.40$, $p<0.05$), respectively. Moreover, while carrying out the partial correlation analysis it was observed a positive correlation between plasma retinol levels and SOD activity ($r=0.30$, $p<0.05$) such as catalase activity ($r= 0.36$, $p<0.05$), controlled by MDA levels.

Figure 2

Figure 3

Lipid peroxidation

The results of the lipid peroxidation assessed by MDA measurement were significantly higher in HD patients compared to the healthy subjects, being 6.92 ± 0.35 vs $4.53 \pm 0.16 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively ($p < 0.0001$). Plasma MDA levels presented negative correlation with the ALA-D activity. The MDA levels positively correlated with CAT and SOD activities ($r = 0.46$, $p < 0.05$ and $r = 0.49$, $p < 0.05$) respectively.

ALA-D activity

Blood δ -ALA-D activity was significantly decreased in HD patients compared to healthy subjects (Table 2). The involvement of SH-groups in ALA-D inhibition was examined by testing the effect of dithiothreitol (DTT) on the enzyme. The addition of DTT (2mM) into the assay mixture caused an increase of 74.74% and 21.05% in ALA-D activity in patients and healthy subjects, respectively, corresponding ALA-D reactivation index (%). Moreover, the ALA-D activity correlated with the CAT activity ($p = 0.003$; $r = -0.46$), while the SOD activity was not correlated with ALA-D activity ($p > 0.05$).

Enzymes activity assay

The table 2 shows that the SOD activity was significantly higher in HD patients compared to healthy subjects, ($p < 0.05$). The catalase activity also was significantly higher in HD patients compared to healthy subjects, being ($p < 0.05$).

Table 2

Biochemistry Assay

The table 1 shows the results of serum creatinine and urea levels. Both uremic markers were significantly increased (7 times higher) in the HD patients compared with control group. Moreover, it was found positive correlations between creatinine with MDA and retinol levels ($r=0.63$ and $r=0.65$; $p<0.05$), respectively, and urea with MDA and retinol levels, ($r=0.61$ and $r=0.68$; $p<0.05$), respectively.

Discussion

Several reports have documented that the plasma vitamin A concentration is often elevated in patients with chronic renal failure, either untreated or treated with hemodialysis or peritoneal dialysis [28]. In according with Zima et al., in a group with 14 HD patients, all of them possessed the retinol levels increased 3 times higher in relation to the controls [29]. In other study with 40 HD patients, almost all possessed toxicant levels of plasma retinol and it was also verified that there were not any significant differences among the analysis predialysis and postdialysis, while alpha-tocopherol was significantly decreased in postdialytic state [30]. In our study, it was observed an increase of retinol levels, three times higher in the HD patients compared to healthy subjects ($p<0.001$) (Fig.1).

It is known that vitamin A is transported from its hepatic stores to peripheral target sites in the form of retinol bound to its specific carrier protein, retinol binding protein (RBP) and transthyretin (TTR). The retinol-binding protein 4 (RBP4) is a 21 kDa plasma protein which is mainly synthesized in the liver and adipose tissue and is known to transport retinol (ROH) in the blood. The binding of ROH to RBP4 guarantees the homeostatic regulation of plasma ROH levels, which are an essential aspect for a variety of physiological processes. In healthy individuals RBP4 is mainly synthesized in the liver

and secreted into the circulation in a 1:1:1 complex with ROH and transthyretin (TTR). The binding with TTR increased the molecular weight of RBP4 and thus prevents its glomerular filtration and catabolism in the kidney. After releasing ROH into the target cells the remaining apo RBP4 (unbound ROH) is rapidly filtered through the glomeruli and subsequently reabsorbed in the proximal tubular cells via the megalin-cubulin receptor complex and then catabolized [31]. Thomas et al. 1991, observed an increase in circulatory retinol in rats with experimental acute renal failure and have established that this increase is almost entirely due to retinol in the retinol-RBP-TTR complex. This retinol is derived from the hepatic pool of retinol newly acquired from the diet, suggesting that the kidney modulates the release of this retinol. In this manner, normal kidney function influences the release of hepatic retinol into circulation and contributes to circulatory vitamin A homeostasis [32]. In this line, clearance and catabolism of retinol-binding protein depend on normal renal function [33]. In fact, a correlation between plasma vitamin A and serum creatinine concentration has been observed [28], suggesting an association with increased severity of renal failure [33]. In our study, hemodialysis patients had high levels of urea and creatinine (table 1) which correlated with the levels of retinol ($r=0.68$ and $r=0.65$, respectively) and MDA ($r=0.61$ and $r=0.63$, respectively). In this way, Frey and collaborators demonstrated that the kidney, the main site of RBP4 catabolism, contributes to an elevation of RBP4 levels during chronic kidney disease (CKD) and regarding the kidney function, there was a strong correlation between serum creatinine and RBP4 levels [31]. Another factor, but less relevant, that may contribute to an elevation in vitamin A concentration is a decrease in the enzymatic transformation of retinol into retinoic acid [24-25].

Retinoids have redox-related properties and they influence the oxidative status of the cell. Many authors suggested that retinol and related molecules, such as beta-carotene, act in biological systems as antioxidants. Thus, they could be potential clinical agents in antioxidant therapies for treatment and prevention of malignant and neurodegenerative diseases. However, during clinical trials it was observed that retinoids can also be deleterious and are associated with activation of proto-oncogenes, leading to an incidence increase of neoplasias. There are also several reports in the literature which clearly show that the retinol works as pro-oxidant, increasing the activity of antioxidants enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and also maximizes in the oxidative damage in lipids, proteins, DNA, and modulation of iron turnover [34]. Due to this conflict of information, more studies regarding the action of retinol, are still needed since there are several therapies based on the use of retinol for several diseases. These diseases are related to cell cycle disruption/cell death and increased reactive oxygen species, including skin cancer, lung cancer, Parkinson's disease and Alzheimer's [34-36].

The retinol has been related to the increase of superoxide anion and oxygen peroxide and consequently the lipid peroxidation [6]. Furthermore, in agreement with Oliveira et al. [37] the sharp and chronic supplementation with vitamin A caused an augment of 1.8 and 2.7 in the striatum lipid peroxidation. In other studies, an increase in chromatin sensitivity to DNase I [34] and significative changes in nuclear protein phosphorylation [35] in Sertoli cells treated with retinol, were demonstrated. Many of these effects were inhibited by the addition of 1,10-phenantroline (iron chelator), suggesting the participation of a Fenton reaction in these retinol-induced effects [36].

In HD patients the levels of retinol and MDA were increased when compared to controls observed in the Figure 1. These findings are in agreement with the previous studies that revealed increased oxidative stress and retinol levels in HD patients [38]. Moreover, the present work demonstrated a positive correlation between the levels of retinol and the lipid peroxidation (Figure 3). In this line, the increase of retinol levels may act, in association with other factors, as pro-oxidant. It was shown in other studies that high levels of retinol involve a drastic increase in the production of O_2^- , the ROS, which might originate the hidroperoxyl radical, as occurs at the proximity of biomembranes [36].

In the Table 2, it is possible to observe that ALA-D activity in controls (healthy subjects) was similar to previous studies [40] and it was significantly higher compared to HD patients ($p < 0.001$). Additionally, it is been known that ALA-D enzyme is involved in the heme syntheses and more recently, its inhibition has been related with oxidative stress in humans [39]. Also, HD patients are in a continuous oxidative stress and normally are anemic. In our work we found a negative significant correlation between vitamin A and hematocrit ($r = -0.61$). These results are in agreement to Ono and collaborators [24] who demonstrated that the plasma vitamin A levels were inversely correlated with hematocrit ($r = -0.5$). According to Ono and collaborators the increase in vitamin A could be a factor contributing to anemia in patients on regular dialysis patients.

In agreement with Valentini et al. [39], it was also found out a significant inverse linear relation between ALA-D activity and MDA levels. It was evaluated the influence of retinol levels which also revealed a significant and inverse linear relation with ALA-D activity ($p < 0.001$). In this manner, the results from this work demonstrated that plasma retinol levels may influence MDA formation and ALA-D activity inhibition. This way, it

was carried out the partial correlation test to verify if plasma retinol and MDA levels were indeed independent variables influencing ALA-D activity, estimating between each one of these variables and ALA-D activity, while controlling for the other variable. When controlling for retinol levels, a partial correlation analysis revealed no significant relation between MDA levels and ALA-D activity. However, the partial correlation analysis revealed a negative relation between retinol levels and ALA-D activity ($r=-0.43$, $p<0.05$), controlled by MDA levels. These results suggest that the plasma retinol levels are an independent variable affecting ALA-D activity, since MDA levels had no relation with ALA-D activity when controlling for retinol. It is known that other factors also inhibit ALA-D activity in according with works from our group, that were observed a negative correlation of aluminum with ALA-D ($r = - 0.31$, $p < 0.05$) [39]. Regarding the timing of hemodialysis only the reactivation of ALA-D correlated positively with the time of HD treatment ($r=0.30$, $p<0.05$) [23]. The present work demonstrated that plasma retinol levels may be a new factor, because the correlation was strong when compared to other factors. The test with dithiothreitol (DTT), a reducing agent that has been used *in vitro* in order to prevent and/or reverse oxidation of thiolic groups [41], verified that the ALA-D reactivation index was increased in HD patients compared to controls. The hypothesis is that the overproduction of oxidant species due to chronic renal failure and/or haemodialysis is responsible for the increase of oxidative stress in HD patients [42] and may be contributing to ALA-D –SH groups oxidation. Reduced ALA-D activity in HD patients was found to be related to the oxidation of –SH group which is essential for enzyme activity as described in another work [39]. Besides, other mechanisms seem to be involved in enzyme inhibition, since DTT could not completely restore ALA-D activity.

In this study, activities of erythrocyte enzymes that scavenge superoxide radicals (SOD) and hydrogen peroxide (CAT) were measured in HD patients and controls. The results demonstrated a significant increase of blood SOD and CAT activity. Some authors demonstrated also that the activity of erythrocyte SOD and CAT and plasma SOD and CAT increased significantly [43-48]. However, another work showed a reduction of antioxidant enzymes in plasma and RBC of CRF patients [49-55].

These antioxidant enzymes are mainly involved in intracellular antioxidant defense. Several publications describing enzymes participation in free radical metabolism have yielded wrong and mixed results. The authors explained this by adaptative mechanisms to oxidative stress. This mechanism can also be explained by another finding, in accordance with Murate and collaborators, who demonstrated the increase of O_2^- and H_2O_2 by retinol increase [6]. Our results tend to confirm these observations. The activities of these enzymes (CAT and SOD) were significantly correlated to the retinol levels ($r=0.39$ and $r=0.40$, $p<0.01$) respectively. In agreement with Dal-Pizzol [36], the treatment with retinol only induces the increase of the CAT activity in high doses; this may suggest that retinol levels could be a factor inducing oxidative stress in HD patients. In this line, we also verified that CAT activity was negatively associated with ALA-D activity, suggesting that the production of H_2O_2 due to elevated retinol levels could contribute to inhibition of the thiols groups from ALA-D enzyme.

In summary, high lipid peroxidation in the plasma of HD patients could be occurring due to the process of hemodialysis, which has already been mentioned in other articles. Furthermore, the results of this work demonstrated the correlation between high plasma retinol levels and lipid peroxidation, and also the induction of

antioxidant enzymes activity and inhibition of thiol group dependent enzyme, ALA-D. In this line, the increase of plasma retinol levels in HD patients tends to act as additional effect, as pro-oxidant agent. However, more works will be necessary to evaluate the influence of retinol levels with other factors on oxidative stress biomarkers and possible damages, as lipid peroxidation, protein oxidation and DNA injury in HD patients.

Acknowledgements

The authors would like to thank Capes/DAAD for providing grant for Prof Dr Garcia S.C. in her scientific visit to the Institute of Biological Chemistry and Nutrition (Germany); to Fapergs (grant to S.C Garcia (Proc. 05/2069.0). S.C. Garcia is recipient of a Research Fellowship. We would also like to thank Michael Wolter from the Institute of Biological Chemistry and Nutrition (Germany) for helping in the quantification of plasma retinol levels.

References

1. Dakshinamurty KV, Srinivasa Rao PVLN, Saibaba KSS, Shyam C, Sheela RB, Venkataramana G, Sreekrishna V. Antioxidant status in patients on maintenance haemodialysis. *Indian J Nephrol* 2002;12: 77-80.
2. Bloembergen WE, Port FK, Mauger EA, Wolfe RA. Causes of death in dialysis patients: Racial and gender differences. *Am J Kidney Dis* 1994; 5:1231-42.
3. Yeun JY, Levine RA, Mantadiok V, Kaysen G A. C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in haemodialysis patients. *Am J Kidney* 2000; 35:469-76.
4. Lowrie E G, Lew N L. Death risk in hemodialys patients: The predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities. *Am J Kidney Dis* 1990;15:458-82.
5. Abd El Maksoud AM, Abd Allah AM, Massoud W, Ismail MA. Retinol and alpha-tocopherol levels among haemodialysis patients. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* 2000;15:65-71.
6. Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivatives via superoxide generation. *J Biol Chem* 2000;275: 2003-2008.

7. Goodman DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. *N Engl J Med* 1984;16:1023-1031.
8. Napoli JL. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism and signal transduction. *Clin. Immunol. Immunopathol* 1996;80:S52- S62.
9. Blaner WS, Olson JA. Retinol and acid retinoic metabolism. In: Sporn, MB, Roberts, AB, Goodman, DS (EDS), *The Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine*. Raven press, New York, NY 1994, p. 229-256.
10. Kanai, M.A. Raz, and De W.S. Goodman. Retinol binding protein: the transport binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 1968;47:2025-2044.
11. Muto Y, Goodman DWS. Vitamin A transport in rat plasma. Isolation and characterization of retinol-binding protein. *J Biol Chem* 1972;247:2533-2541.
12. Vogel S, Gamble MV, Blaner, WS. Biosynthesis, absorption, metabolism and transport of retinoids. In: Nau H, Blaner, WS(Eds), *Handbook of experimental pharmacology. Retinoids*. Springer Verlag Publishing, Heidelberg 1999, p.31-95.

13. Ceballos IP, Nicole A, Clement M, Bourre JM. Age-related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Mutat Res* 1992;275:281–293.

14. Fukuda H, Paredes S, Batlle AM. Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehydratase modified by diethylpyrocarbonate and protected by Zn²⁺ ions. *Comp Biochem Physiol* 1988; 91B:285-291.

15. Rocha JBT, Pereira ME, Emanuelli T, Christofari RS, Souza DO. Effects of mercury chloride and lead acetate treatment during the second stage of rapid postnatal brain growth on ALA-D activity brain, liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 1995;100:27-37.

16. Rocha JBT, Tuerlinckx SM, Schetinger MRC, Folmer V. Effects of group 13 metals on porphobilinogen synthase in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;200:169 -176.

17. Bechara EJH, Medeiros MHG, Monteiro HP. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyries associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quim Nova* 1993;16:385-392.

18. Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJ. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 1992;72:226-230.
19. Buchet JP, Lauwerys R, Hassoun A, Dratwa M, Wens R, Collart F, Tielemans C. Effect of aluminum on porphyrin metabolism in hemodialyzed patients. *Nephron* 1987;46:360-363.
20. Djordjevic VB, Strahinjc S, Karacevic D, Mijkovic P, Pavlovic D, Stefanovic V. Erythrocyte delta-aminolevulinate dehydratase measurements in Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 1991;34:S96-96.
21. Fontanellas A, Herrero JA, Coronel F, Santos JL, Moran MJ, Barrientos A, Salamanca RE. Effects of recombinant human erythropoietin on porphyrin metabolism in uremic patients on haemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:774-779.
22. Voss P, Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic Res* 2006;40(12):1339-1349.
23. Valentini J, Grotto D, Paniz C, Roehrs M, Burg G, Garcia SC. The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2008; 62 (6): 378-382.

24. Ono K, Waki Y, Takeda K. Hypervitaminosis A: A contributing factor to anemia in regular dialysis patients. *Nephron* 1984;38:44-47.
25. Fishbane S, Frei GL, Finger M, Dressler R. Hypervitaminosis A in two haemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1995;25:346-349.
26. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J Biol Chem* 1969;244:6049-6055.
27. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
28. Rock CL, Jahnke MG, Gorenflo DW, Swartz RD, Messana J M. Antioxidant vitamins in hemodialysis. *Am J Clin Nutr* 1997;65:844-850.
29. Zima T, Janebová M, Nemecek K, Bátová V. Retinol and alpha-tocopherol in haemodialysis patients. *Ren Fail* 1998;20(3):505-512.
30. El Maksoud A, Awatif M, Allah A, Asmaa M, Waleed M, Mervat I. Retinol and alpha-tocopherol levels among haemodialysis patients. *Egyptian Journal of Hospital Medicine* 2004;15:65-71.
31. Frey SK, Nagl B, Henze A, Raila J, Schlosser B, Berg T, Tepel M, Zidek W, Weickert MO, Pfeiffer AF, Schweigert FJ. Isoforms of retinol binding protein 4

(RBP4) are increased in chronic diseases of the kidney but not of the liver. *Lipid in healthy and disease* 7:29, 2008.

32. Thomas H Gerlach and Maija H. Zile, Metabolism and secretion of retinol transport complex in acute renal failure, *Journal of Lipid Research*, 1991;32:515-20.

33. Muth I. Implications of hypervitaminosis A in chronic renal failure. *J Renal Nutr* 1991;1:2-8.

34. Moreira JCF, Dal-Pizzol F, Guma FCR, Bernard EA. Effects of pre-treatment with hydroxyurea on the increase in [methyl-³H] thymidine incorporation induced by retinol treatment in Sertoli cells. *Med Sci Res* 1996;24:383-384.

35. Moreira JCF, Dal-Pizzol F, Rocha AB, Klamt F, Ribeiro NC, Ferreira CJS Bernard EA. Retinol-induced changes in the phosphorylation of histones and high mobility group proteins from Sertoli cells. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:287-293.

36. Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota MLC, Moraes LF, Moreira JCF, Benfato MS. Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. *Free Radic Res* 2000;32:677-687.

37. Oliveira MR, Pasquali MAB, Silvestrin RB, Souza TM, Moreira JCF. Vitamin A supplementation induces a pro oxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats. *Brain Res* 2007;1169:112-119.
38. Evelyne P, Carbonneau MA, Doubourg L. Lipid peroxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing haemodialysis. Vitamins A, E and iron status. *Free Radic Biol Med* 1994;16(3):339-349.
39. Valentini J, Schmitt GC, Grotto D, Santa Maria LD, Boeira SP, Piva JS, Brucker N, Bohrer D, Pomblum VJ, Emanuelli T, Garcia CS. Human erythrocyte δ -aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress in haemodialysis patients. *Clin Biochem* 2007;40:591-594.
40. Hernández AF, López O, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, Parron T, Juan Carlos Alvarez JC, Lorente JA, Pla A. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides. Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol Lett* 2005;159:13-21.
41. Gabriel D, Pivetta L, Folmer V, Soares JCM, Augusti GR, Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Human erythrocyte δ -aminolevulinate dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups. *Cell Biol Inter* 2005;29:669-674.

42. Schmidtman S, Von Baehr R, Precht K. Free radicals induce increased lysis of red blood cells after haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1990;5:600-603.
43. Mimic-Oka J, Simic T, Djukanovic L, Reljic Z, Davicevic Z. Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin Nephrol* 1999;51:233–241.
44. Laporte F, Foret M, Favier A, Cordonnier D. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1991;57:10–15.
45. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thavenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B () Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996;21:845–853.
46. Mimic-Oka J, Simic T, Ekmescic V, Dragicevic P. Erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in different stages of chronic renal failure. *Clin Nephrol* 1995;44:44–48.
47. Dasgupta A, Hussain S, Ahmad S. Increased lipid peroxidation in patients on maintenance haemodialysis. *Nephron* 1992;60:56–59.

48. Lucchi L, Banni S, Capelli B, Medici G, Melis MP, Tomasi A, Vannini V, Lusvarghi E. Conjugated diene fatty acids in patients with chronic renal failure: evidence of increased lipid peroxidation? *Nephron* 1993;65:401–409.
49. Dursun E, Ozben T, Suleymanlar G, Dursun B, Yakupoglu G. Effect of haemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:1009–1013.
50. Konukoglu D, Ercan M, Ayaz M, Onen S. Plasma and erythrocytes antioxidant status and trace element levels in proteinuric patients with moderate glomerular function. *J Trace Elem Med Biol* 2001;15:119–122.
51. Kamezaki TC, Nagai Y, Kikuchi H, Koyama A. Favorable effect of haemodialysis on decreased serum antioxidant activity in haemodialysis patients demonstrated by electron spin resonance. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1157–1163.
52. Ozden M, Maral H, Akaydin D, Cetinalp P, Kalender B. Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malonyldialdehyde and erythrocyte glutathione levels in haemodialysis and CAPD patients. *Clin Biochem* 2002;35:269–273.

53. Paul JL, Sall ND, Soni T, Poignet JL, Lindenbaum A, Man NK, Moatti N, Raichvarg D. Lipid peroxidation abnormalities in hemodialyzed patients. *Nephron* 1993;64:106–109.

54. Vanella A, Geremia E, Pinturo R, Triolo P, Liuzzo G, Triolo C, Custorella A, Condorelli G, Giglio A. Superoxide dismutase activity and reduced glutathione content in erythrocytes of uremic patients on chronic dialysis. *Acta Haematol* 1983;70:312–315.

55. Zachara BA, Adamowicz A, Trafikowska U, Trafikowska A, Manitius J, Nartowicz E () Selenium and glutathione levels and glutathione peroxidase activities in blood component of uremic patients on haemodialysis supplemented with selenium and treated with erythropoietin. *J Trace Elem Med Biol* 2001;15:201–208.

Figure 1 – Demonstrates the significant increase in plasma retinol and MDA levels in hemodialysis patients (n=29) compared to controls (healthy subjects; n=20); being almost three times higher for plasma retinol levels. The Unit of both is $\mu\text{mo.L}^{-1}$.

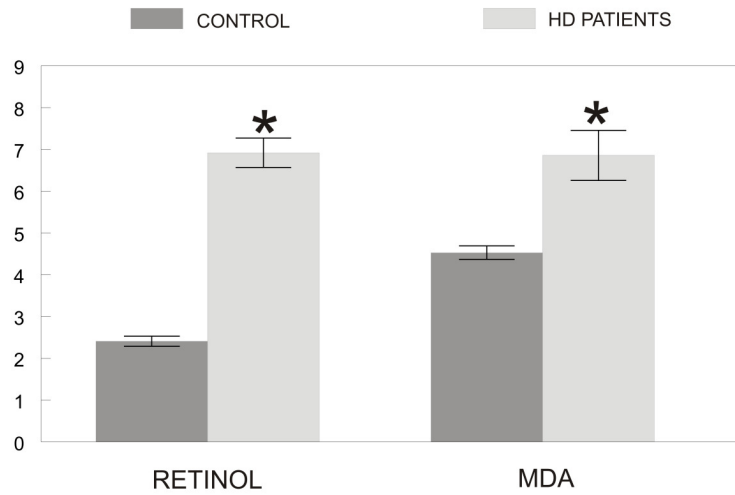


Figure 2 - Spearman test correlation between plasma retinol and MDA levels (n=49).

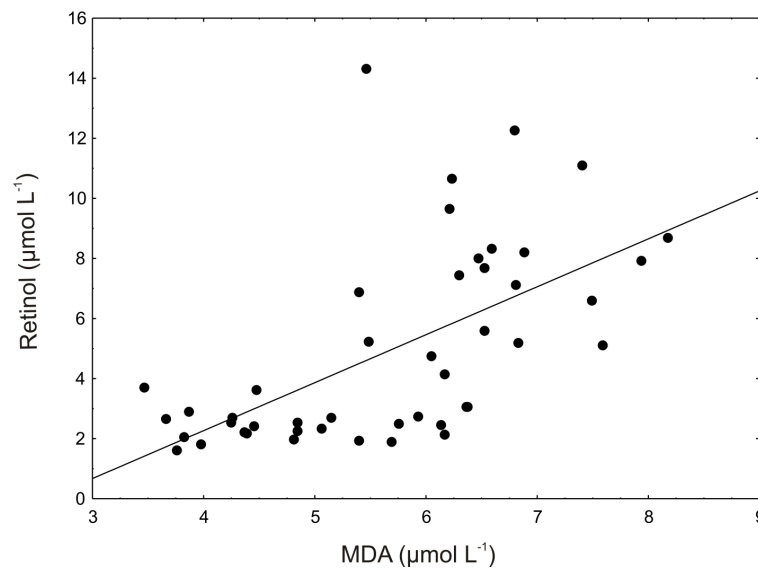


Figure 3 - Spearman correlation test between plasma retinol levels and blood ALA-D enzyme activity (n=49).

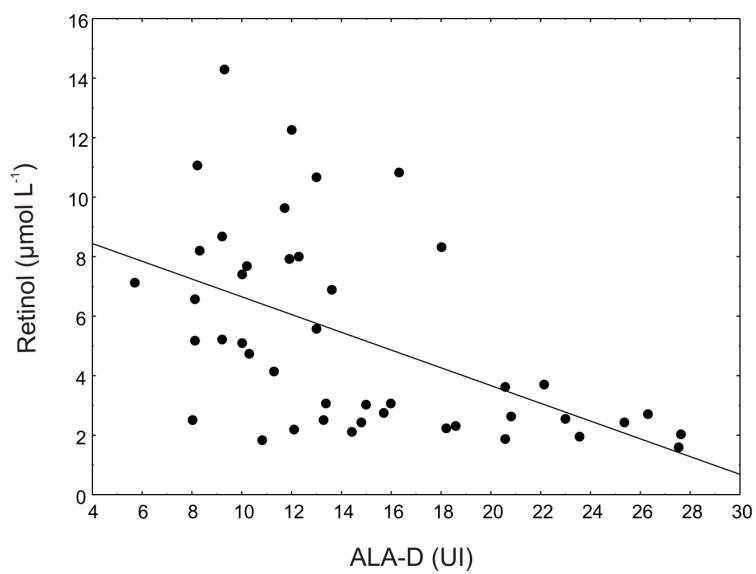


Table 1. General characteristics of the studied groups (hemodialysis patients and healthy subjects)

Parâmetros	Healthy subjects	HD patients
	n= 20	n= 29
Age (years)	43.15 ± 1.30	51 ± 2.17
Time of HD treatment (months)	–	45.68 ± 7.27
Sex (men/women)	10/10	19/10
Urea (mg/dL)	27.35 ± 1.58*	164.54 ± 7.45
Creatinin (mg/dL)	0.67 ± 0.07*	10.17 ± 0.62

The values are expressed as mean ± standard error medium (SEM).

*Significantly different from controls (p<0.001).

Table 2. Activities of antioxidant enzymes and of ALA-D enzyme obtained with and without reductor agent (DTT).

Biomarkers	Healthy subjects	HD patients
	n= 20	n= 29
ALA-D (UI)	20.00 ± 1.49	11.57 ± 0.55*
ALA-D index of reactivation (%)	21.05 ± 2.88	74.74 ± 7.35**
SOD (U SOD/mg Hb)	0.70 ± 0.05	0.90 ± 0.03*
CAT (K/ mg Hb)	43.17 ± 9.20	56.98 ± 4.25*

Results expressed in mean ± standard error medium.

*Significantly different from controls (p<0.05).

**Significantly different from controls (p<0.001).

3.2 Manuscrito I

Carotenoids, vitamin E and enzyme antioxidants in hemodialysis patients and the risk of cardiovascular disease

Manuscrito submetido à Revista "*Clinical Biochemistry*"

Objetivos

Avaliação das concentrações de vitamina E (tocoferóis), carotenóides (α e β carotenos, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina e licopeno) e enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase) em pacientes hemodialisados e indivíduos saudáveis.

Avaliação do perfil lipídico (colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos), ainda o índice de risco coronariano (relação colesterol total/HDL e colesterol LDL/HDL) em pacientes hemodialisados e indivíduos saudáveis.

Verificar possível correlação entre potenciais antioxidantes (endógenos e exógenos) e seu papel protetivo na peroxidação lipídica e no risco cardíaco em pacientes hemodialisados.

Carotenoids, vitamin E and enzymatic antioxidants in hemodialysis patients and the risk of cardiovascular disease

Miguel Roehrs^{1,2}, Juliana Valentini², Clóvis Paniz², Angela Maria Moro², Mariele Charão², Fernanda Almeida², Hanz K. Biesalski³, Geni Burg⁴, Marta Duarte⁵, Tilman Grune³, Solange Cristina Garcia^{2*}

¹Graduate Program on Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

²Laboratory of Toxicology (LATOX), Department of Clinical and Toxicology Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

³Institute of Biological Chemistry and Nutrition, University of Hohenheim, Gartenstraße, Stuttgart, Germany.

⁴ Renal Clinical of Caridade Hospital, Santa Maria, RS, Brazil.

⁵Graduate Program on Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*Direct correspondence to Prof Dr Solange Cristina Garcia.

E-mail adress: sgarpom@smail.ufsm.br (S. C. Garcia).

ABSTRACT:

Objectives: The purpose of the study was to investigate the possible role of blood carotenoids and tocopherols may play on, the biomarkers of oxidative stress and the risk of cardiovascular disease in hemodialysis patients (HD).

Design and methods: Plasma carotenoids, malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) levels were quantified by HPLC UV/VIS and plasma tocopherols levels by HPLC with fluorescent detector. The superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and lipid profile were also analyzed. All blood analyses were performed in 29 HD e 20 healthy subjects.

Results: The lycopene levels were significantly decreased in HD compared to healthy subjects. MDA, GSH, SOD, CAT and cholesterol (total and LDL) were significantly increased ($p < 0.05$). Lycopene levels were negatively correlated with levels of MDA ($r = -0.50$; $p < 0.01$), LDL cholesterol ($r = -0.38$; $p = 0.01$) and the LDL/HDL cholesterol relation ($r = -0.33$; $p = 0.03$).

Conclusion: The lycopene levels, among the quantified exogenous antioxidants, may be an additional factor contributing to decline the lipid peroxidation and possibly the atherogenesis in HD.

Key words: hemodialysis, carotenoids, antioxidants, chronic renal failure, tocopherols, lycopene.

INTRODUCTION

In hemodialysis patients (HD), the major cause of death is cardiovascular disease, which accounts for 50% of the mortality in this group [1-3]. The pathophysiology of cardiovascular events in HD is multifactorial, but accelerated atherosclerosis seems to play a central role in cardiovascular dysfunction. In addition, current evidence suggests that the high prevalence of the cardiovascular events in these patients are directly linked to oxidative stress, and to the abnormality of plasma lipid profile [4-8].

Chronic renal failure (CRF) is a prooxidant status, since there are oxidative stress-inducing factors such as diabetes mellitus, inflammation, aging, and iron overload [9]. However, in CRF patients on haemodialysis treatment the formation of reactive oxygen species (ROS) is amplified, therefore beyond uremic toxins, the hemodialysis itself due to bio-incompatible dialysis water, non-sterile dialysate, poor quality of dialysis water, back-leak of contaminants across the dialysis membrane and time of haemodialysis treatment [10-11].

The abnormalities in the antioxidant defense system and the increased oxidative stress may lead to higher susceptibility to lipid peroxidation in low density lipoprotein (LDL) [10, 12]. Antioxidant vitamins and dietary constituents (eg, vitamin C, tocopherols, α -carotene, and other carotenoids) may play an important role in protecting against oxidant damage and consequently against the atherosclerosis [13-15].

In the literature there are controversial results in relation to biochemical parameters, endogenous antioxidants and vitamins in HD [16]. Also, the relation among the concentration of antioxidant enzymes, vitamins, carotenoids, classical biochemical parameters, and oxidative stress biomarkers has not been extensively

evaluated in these patients yet. Thus, the aim of this cross-sectional study was to verify the plasma concentrations of carotenoids (lycopene, lutein, zeaxanthin, α - and β -carotene and β -cryptoxanthin), vitamin E (α - and γ - tocopherol) levels and endogenous antioxidant enzymes (SOD, GPx and CAT) activities and GSH levels in CRF patients on haemodialysis treatment along with its possible influence on lipid peroxidation and atherogenesis.

SUBJECTS AND METHODS

SUBJECTS

This study included twenty nine patients with diagnosis of CRF (19 men and 10 women) undergoing regular haemodialysis treatment at Caridade and Health House Hospitals, located in Santa Maria, RS, Brazil. The range of ages in HD were 53.96 ± 2.18 years old. To be part of this research the patients should carry out regular, however the patients with alcoholism problems, diabetes, viral hepatitis and HIV, and the smoking ones were not included in the study. Patients using any antioxidant vitamin within the last 3 months were also excluded.

The control group consisted of 20 healthy subjects (10 men, 10 women), that were 43.83 ± 1.30 years old, who did not have clinical history of renal diseases or other pathologies. All the volunteers did not receive vitamins, were nonsmokers, and have not consumed alcohol regularly.

The study protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria (protocol n^o: 091/2003) and all the patients gave their informed consent prior to the inclusion in the study.

Methods

Venous blood samples (10 ml) were drawn in fasting from HD before the haemodialysis process (two days after the last process) and also from the control subjects. The samples were divided in heparinized tubes, EDTA-containing tubes, and tubes without anticoagulant. Plasma-EDTA and serum were obtained by centrifugation at 1500 *g* for 10 minutes at 4°C.

Plasma carotenoids (lutein, zeaxanthin, lycopene, β -criptoxanthin, α - and β -carotene) and tocopherols (α and δ -tocopherol) quantification were realized after liquid-liquid extraction with a solution of n-butanol: etanol (50:50) in BHT (2,6-di-ter-butyl-4-methylphenol) mixed by vortex and followed by centrifugation. The supernatant was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV/VIS and fluorescent detector, according to [17] with modifications. The β – apo – 8 caroteno was utilized as internal standard.

Hemoglobin (Hb) and hematocrit (Hct) were determined in Cobas Micros system (Hematology Analyzer, Roche Diagnostics®). The biochemistry analyses were realized by automatic devices Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics®). Index of coronary risk is accomplished through total cholesterol and HDL cholesterol relation or even through LDL cholesterol and HDL cholesterol relation.

Lipid peroxidation was estimated by measured malondiadehyde (MDA). The measurement of plasmatic MDA was determined by high performance liquid chromatographic system with visible detection (HPLC-VIS), a method developed by our laboratory [18].

The levels of reduced glutathione in erythrocytes were measured by high performance liquid chromatography (HPLC), a method developed by our laboratory [19].

Enzymes assays were realized in the total blood with heparin. Superoxide dismutase (SOD) activity was determined based on its ability to inhibit the autoxidation of adrenaline into adrenochrome at an alkaline pH [20]. Catalase (CAT) activity was determined using H₂O₂ as substrate [21]. Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined using glutathione reductase and NADPH. The method is based on the oxidation of NADPH, which is indicated by a decrease in absorbance at 340 nm [22]. They were measured spectrophotometrically using a UV-VIS model Hitachi U-1800®.

Statistical analysis

Statistical computations were performed with Statistica® 6.0 software system (Statsoft Inc., 2001). The results are expressed as mean ± standard error medium (SEM). Comparisons between groups were achieved by test *t* of Student or Mann-Whitney test, depending on the variables distribution. Pearson's correlation or Spearman's rank order correlation were used to evaluate the relation between pairs of variables, following the variables distribution. A value of $p < 0.05$ (5%) was considered significant.

RESULTS

The general characteristics of the groups studied are demonstrated in Table 1. The clinical history of the HD was evaluated, and the cause of renal failure was unknown in the majority of the patients (n=11 or 37.9% of the patients). In order of appearance, the major causes of renal failure were pyelonephritis and glomerulonephritis (n=6 or 17.2% of the patients), hypertension (n=3 or 10.3% of the patients), diabetes (n=3 or 10.3% of the patients), polycystic kidney (n=1 or 3.5% of

the patients), tuberculosis of urinary tract (n=1 or 3.5% of the patients), disease of kidney tubules (n=1 or 3.5%). In relation to drugs consumption, the vitamin D was used only by six patients, while seventeen patients used erythropoietin and eleven of the patients used noripurum (saccharate ferric hydroxide). Additionally, we also accompanied the clinical history of the HD studied during two years after the collection of the blood samples and it was observed that during this period seven individuals (24.1% of the total) died. Among these patients, the main cause of death was cardiovascular diseases (n=6; 85.7%), and only one (3.5%) patient died due to stroke.

Results of the vitamins and carotenoids are summarized in Table 2. The tocopherols (α - and γ - tocopherol) were unchanged in HD in comparison with healthy subjects. Although the lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin and β -carotene were not affected in the entire patient population ($p>0.05$), their levels in general (except the β -cryptoxanthin) were more pronounced in healthy subjects than HD. Moreover, both the levels of alpha-carotene and lycopene were reduced by half in groups of haemodialysis compared to the control group ($p <0.05$).

The parameters of lipid profile analyzed such as total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides and the index of coronary risk (ICR) are reported in Table 3. The levels of total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides are within the reference values, but increased significantly when compared to controls. Already, the HDL cholesterol is below the reference values and also decreased when compared to controls. The HD in this study possessed TC / HDL two times greater than the healthy subjects. The LDL/HDL cholesterol relation was three times greater in HD than in healthy subjects.

The average SOD and CAT activities in total blood were found to be significantly increased in all the HD compared to healthy subjects ($p < 0.05$). On the other hand, GPx activity was significantly lower in the patients ($p < 0.01$). Erythrocyte GSH levels were significantly increased in HD ($p < 0.05$). Table 2 demonstrates the baseline plasmatic MDA levels, which were significantly increased in group of patients compared with healthy subjects ($p < 0.01$) (Table 4).

DISCUSSION

It is known that in HD the cardiovascular diseases play an important role in the death of these patients. On the other hand, the oxidative stress is increased in HD due to many conditions, mainly by the increase of the reactive species and decrease of exogenous antioxidants as carotenoids and vitamins. In this line, studies are interesting to explore the possible associations between oxidative stress biomarkers, vitamins/carotenoids, lipid profile and its risk for cardiovascular disease in HD. Moreover, it was observed that almost 30% of HD patients of the present study died due to vascular diseases.

Our results confirmed occurrence of impairment in oxidative stress biomarkers in HD (Table 4). The increasing of free radicals, especially reactive oxygen species (ROS), and abnormalities in the antioxidants defense system are among the main factors that contributed for cardiovascular disease, and it is the main cause of morbidity and mortality in these patients [32]. Additionally, the previous researches demonstrated that the factor that may be highly influencing in the atherogenesis is the lipid peroxidation [35]. It is an important hallmark of oxidative stress, which disrupts the structural integrity of cell membranes and can also lead to the formation

of aldehydes, which in turn time damage lipids, proteins and DNA [36]. The main product of the lipoperoxidation is malondialdehyde (MDA) which is also cytotoxic, and it was examined in HD by our group of research, and their levels were strongly elevated in comparison with healthy subjects [37]. In Table 4 the results of this work confirmed the previous found.

The carotenoids have several functions in the prevention of human diseases, such as cataract, cancer and other diseases acting as antioxidants [23]. In the case of haemodialysis patients, the carotenoids have a very important role as antioxidants and heart protectors [24]. Normally, dialysis patients have vitamin and carotenoid abnormalities because of inadequate dietary intake resulting from poor appetite and dietary restrictions and metabolic disorders associated with renal failure [25]. In this study the patients had no statistical differences in levels of carotenoids, with the exception of lycopene and α -carotene that were reduced statistically in HD (Table 2). These reductions in concentrations of carotenoids in haemodialysis patients can also be a marker of the low intake of vegetables [24].

Although lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin and β -carotene, may contribute to the protection against several age-related diseases, including cataract, stroke, heart disease, and mainly some forms of cancer [26], however showed no significant differences between the study groups (table 3).

In contrary, the vitamin E (α - and γ - tocopherol), a liposoluble vitamin, which has strong antioxidant and anti-inflammatory activity did not show loss during haemodialysis. According to other studies [6] these patients showed no difference in concentrations when compared to the healthy subjects (table 2). Although vitamin E is considered a strong antioxidant against the process of atherogenesis, and its

levels are normal in HD patients, they still continue with a high incidence of deaths from vascular diseases.

Several studies have indicated that lycopene is an effective antioxidant and free radical scavenger, because of its high number of conjugated double bonds [27-28]. The lycopene, also has been suggested to prevent carcinogenesis and atherogenesis by protecting critical biomolecules including lipids, low-density lipoproteins (LDL), proteins and DNA [29-30]. Our results are consistent with other work [24], in which the levels of lycopene are reduced almost by half in HD regarding healthy subjects (table 2). The lycopene levels were negatively correlated with MDA ($r=-0.50$; $p<0.01$), and in accordance to Velmurugan et al. 2002, work in vitro, who observed that supplementation of lycopene significantly reduced the extent of lipid peroxidation [31].

Furthermore, the lipid profile analysis demonstrated a moderate increase in triglyceride, total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and decreased high-density lipoprotein (HDL) cholesterol in HD, (Table 3) results in accordance with other author [33]. One of the consequences of the increased production of reactive oxygen species in this setting is the oxidation of low-density lipoprotein (LDL) leading to oxidized-LDL particles, which are important in the initiation and progression of atherosclerotic plaques, since they can elicit inflammatory processes and lipid accumulation within the arterial wall [34].

The lycopene also show hypocholesterolemic effect, in wich Loughrey et al, (1994) show that macrophage enrichment with lycopene or with β -carotene results in the suppression of cellular cholesterol synthesis and increase macrophage LDL receptor activity. This effect can lead to enhanced clearance of LDL from the plasma, and thus this carotenoid may be recognized as hypocholesterolemic agent [38]. In

our study the HD showed an inverse correlation between the levels of lycopene and LDL cholesterol ($r=-0.38$; $p=0.01$). Also, these patients present an increase in the index of coronary risk (LDL/HDL relation) and this index was negatively correlate with lycopene levels ($r=-0.33$; $p=0.039$). According to Kinoshian et al, 1994 this relation together with the relation TC / HDL cholesterol are factors more trustworthy than his own parameters of lipid profile to assess risks from coronary artery disease [39].

Moreover, the results of this study indicate that patients which perform hemodialysis periodically have changes in its endogenous antioxidant system. A major finding is the decrease of GPx activity, which in HD was almost reduced by 50 percent of activity when compared to controls, and its close correlation with the degree of renal function impairment. This decrease in GPx activity may represent an early consequence of active nephron mass reduction and is in keeping with the suggestion that the renal tubule is the predominant site of synthesis of GPx [40]. The GPx together with the CAT are the enzymes needed to remove hydrogen peroxide (H_2O_2). The levels of GSH are larger than the levels in healthy subjects ones, probably due to the compensation mechanism, although high GSH levels seem to be insufficient due to the GPx levels arise [6]. The activity of CAT and SOD were increased in HD, unlike the results found by Ceballos-Picot et al, 1996 [4]. The SOD and CAT probably are increased by a process of compensation, due to the stress generated during the hemodialysis process [41]. On the other hand, the increase of GSH, SOD and CAT were not sufficient to decrease the plasma MDA levels, the principal lipid peroxidation biomarker.

In conclusion, we observed that the hemodialysis patients showed reduced levels of specific carotenoids, such as lycopene and α -carotene, and the most accepted hypothesis to this finding can be a problem of the specific-metabolism of

these carotenoids, due to renal insufficiency. The endogenous antioxidant system tends to act as a compensatory mechanism against the increase of oxidative stress in HD, however it was observed increase of the lipid peroxidation. Moreover, the increase of lipid profile was correlated with lycopene levels. In this manner, it may be suggested that specific carotenoids levels linked to hemodialysis treatment may be influencing additionally the sequential relation among damage oxidative, levels of oxidized cholesterol, and cardiovascular diseases.

Acknowledgement: The authors would like to thank Capes/DAAD for providing a scientific visit of the researcher Prof Dr S.C. Garcia to Germany (Institute of Biological Chemistry and Nutrition). S.C. Garcia has received CNPq research fellowship.

REFERENCES

- [1] Morbidity and mortality of dialysis. NIH consensus statement. Bethesda, MD: National Institutes of Health, 1993.
- [2] Port F. Mortality and causes of death in patients with end-stage renal failure. *Am J Kidney Dis* 1990; 15: 215-7.
- [3] Panfrey PS, Harnett ID, Barre PE. The natural history of myocardial disease in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2: 2-12.

- [4] Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen T, Thevenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Junger P, Descamps-Latscha B. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 845–53.
- [5] Schmidtman S, Muller M, von Baehr R, Precht K. Changes of antioxidative homeostasis in patients on chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: 71 – 74.
- [6] Clermont G, Lecour S, Lahet J, Siohan P, Vergely C, Chevet D, Rife G, Rochette L. Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 618–23.
- [7] Shurtz-Swirski R, Mashiach E, Kristal B, Shkolnik T, Shasha SM. Antioxidant enzymes activity in polymorphonuclear leukocytes in chronic renal failure. *Nephron* 1995; 71: 176 – 79.
- [8] Chen CK, Liaw JM, Juang JG, Lin TH. Antioxidant enzymes and trace elements in hemodialyzed patients. *Biol Trace Elem Res* 1997; 58: 149–57.
- [9] Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Inter* 1999; 55: 648-658.
- [10] Morena M, Cristol JP, Canaud B. Why hemodialysis patients are in a prooxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance. *Blood Purif* 2000; 18: 191 – 99.
- [11] Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G, Witko-Sarsat V, Drüeke TB, Lacour B, Thévenin¹ M. Oxidative stress and

haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:335-40.

[12] Galli F, Varga Z, Balla J, Ferraro B, Canestrari F, Floridi A, Kakuk G, Buoncristiani U. Vitamin E, lipid profile, and peroxidation in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2001; 59: S148 –54.

[13] Abbey M, Nestel PJ, Baghurst PA. Antioxidant vitamins and low density-lipoprotein oxidation. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 525-32.

[14] Hodis HN, Mack WI, LaBree L, Cashin-Hemphill L, Sevanian A, Johnson R, Azen SP. Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *JAMA* 1995; 273:1849-54.

[15] Stampfer MJ, Rimm EB. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1365S-9S.

[16] Mohora M, Mircescu G, Cirjan C, Mihailescu I, Girneata L, Ursea N, Dinu V. Effect of hemodialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure. *Rom J Intern Med* 1995; 33: 237–42.

[17] Epler KS, Ziegler RG, Craft NE. Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food. [J Chromatogr](#) 1993; 619: 37-48.

[18] Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43: 619-24.

[19] Garcia SC, Schott K, Charão M, et al. Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes of hemodialysis patients. *Biomed Chromatogr* 2008; 22: 460-8.

- [20] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
- [21] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
- [22] Paglia D, Valentini W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
- [23] Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 2004; 58:100-10.
- [24] Rock CL, Jahnke MG, Gorenflo DW, Swartz RD, Messana JM. Racial group differences in plasma concentrations of antioxidant vitamins and carotenoids in hemodialysis patients. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 844-50.
- [25] Gilmour ER, Hartley GH, Goodship THJ. Trace elements and vitamins in renal disease. In: Mitch WE, Klahr S, eds. *Nutrition and the kidney*. 2nd ed. Boston: Little, Brown and Company, 1993:114-31.
- [26] Ribaya-Mercado JD, Blumberg J. Lutein and Zeaxanthin and Their Potential Roles in Disease Prevention. *J Am Coll Nutr* 2004; 23: 567S–87S.
- [27] Sattler W, Christison J, Stocker R. Cholesterylester hydroperoxide reducing activity associated with isolated high density and low density lipoproteins. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 421–9.
- [28] Ohta T, Takata K, Horiuchi S, Morino Y, Matsuda I. Protective effect of lipoproteins containing apoprotein-A-I on Cu²⁺-catalyzed oxidation of human low density lipoprotein. *FEBS Lett* 1989; 257: 435–8.
- [29] Mackness MI, Abbott C, Durrington PN, Arrol S. The role of high density lipoprotein in lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993; 294: 829–34.

[30] Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC, Laks H, Fogelman AM. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic-wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein-1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991; 88: 2039–46.

[31] Velmurugan B, Bhuvaneswari V, Nagini S. Antiperoxidative effects of lycopene during *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis. *Fitoterapia* 2002; 73:604-11.

[32] Ha TK, Sattar N, Talwar D, Cooney J, Simpson K, O'Reilly DS and Lean ME. Abnormal antioxidant vitamin and carotenoid status in chronic renal failure. *QJM* 1996; 89: 765-9.

[33] Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974; 290: 697-701.

[34] Asatryan L, Ziouzenkova O, Duncan R, Sevanian A. Heme and lipid peroxides in hemoglobin modified low-density lipoprotein mediate cell survival and adaptation to oxidative stress. *Blood* 2003; 102: 1732–9.

[35] Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulsen F, Diczfalussy U, Wang T, Berglund L, Jogestrand T. Strong association between malnutrition, inflammation and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 55: 1889 – 1911.

[36] Silva AC, Rocha JBT, Morsch ALB, Zanin RF, Kaizer R, Maldonato PA, Arantes LC, Silva LA, Morsch VM, Schetinger MRC. Oxidative stress and d-ALA-D activity in chronic renal failure patients. *Biomed Pharmacother* 2007; 61: 180-5.

- [37] Valentini J, Grotto D, Paniz C, Roehrs M, Burg G, Garcia SC. The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 378-82.
- [38] Loughrey CM, Young IS, McEneny J, McDowell IF, McMaster C, McNamee PT, Trimble ER. Oxidation of low density lipoprotein in patients on regular haemodialysis. *Atherosclerosis* 1994; 110: 185-93.
- [39] Kinosian B, Glick H, Garland G. Cholesterol and Coronary Heart Disease: Predicting Risks by Levels and Ratios. *Ann Intern Med* 1994; 121: 641-7.
- [40] Schiavon R, Biasioli S, De Fanti E, Petrosino L, Cavallini L, Cavalcanti G, Zambello A, Guidi G. The plasma glutathione peroxidase enzyme in hemodialyzed subjects. *ASAIO J* 1994; 40: 968-71.
- [41] Fiorillo C, Oliviero C, Rizzuti G, Nediani C, Pacini A, Nassi P. Oxidative stress and antioxidant defenses in renal patients receiving regular haemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 149–53.

Table 1

General characteristics of the population studied

	Healthy group (n=20)	Haemodialysis patients (n=29)
Age (years)	43.83 ± 1.30	53.96 ± 2.18
Sex (F/M)	10/10	19/10
Haemodialysis time (months)	-	45.68 ± 7.27

Table 2

Plasma carotenoids and tocopherols concentrations ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) analyzed in haemodialysis patients and healthy subjects

	Healthy group (n=20)	Haemodialysis patients (n=29)
Tocopherols (α and γ)	29.59 ± 1.30	33.16 ± 1.87
Lutein	0.62 ± 0.06	0.46 ± 0.05
Zeaxanthin	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Criptoxanthin	0.18 ± 0.07	0.21 ± 0.04
α – Carotene	0.18 ± 0.03	0.07 ± 0.01 ^a
β – Carotene	0.64 ± 0.09	0.50 ± 0.07
Lycopene	0.64 ± 0.06	0.35 ± 0.04 ^a

^a $p < 0.05$ as compared to the healthy subjects.

Table 3

Comparison of lipid profile and the relation of coronary risk of haemodialysis patients with the healthy subjects

	Healthy group (n=20)	Haemodialysis patients (n=29)
Total cholesterol (mg/dL)	147.27 ± 4.48	181.14 ± 5.38 ^a
LDL cholesterol (mg/dL)	72.66 ± 4.37	115.89 ± 3.79 ^a
HDL cholesterol (mg/dL)	55.90 ± 3.00	28.89 ± 1.92 ^a
Triglycerides (mg/dL)	88.04 ± 6.14	160.37 ± 9.28 ^a
Relation CT/HDL	2.68 ± 0.15	7.12 ± 0.55 ^a
Relation LDL/HDL	1.28 ± 0.11	4.48 ± 0.32 ^a

The values represent the mean ± standard error medium (S.E.M)

^ap < 0.01 as compared with the healthy subjects

Table 4

Biomarkers of oxidative stress analyzed in haemodialysis patients and healthy group

	Healthy group (n=20)	Haemodialysis patients (n=29)
GSH ($\mu\text{mol/gHb}$)	6.03 ± 0.26	7.87 ± 0.27^a
CAT (K/ mg Hb)	27.96 ± 4.18	56.99 ± 4.25^a
GPX ($\mu\text{mol NADPH/min/g Hb}$)	11.57 ± 0.39	6.61 ± 0.21^a
SOD (U SOD/mg Hb)	0.69 ± 0.49	0.91 ± 0.03^a
MDA ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	4.53 ± 0.16	6.92 ± 0.36^a

CAT = catalase; GPX = glutathione peroxidase; SOD= superoxide dismutase;

MDA = malondialdehyde, GSH = glutathione reduced.

The values represent the mean \pm standard error medium (S.E.M)

^a $p < 0.05$ compared to the healthy subjects.

4. DISCUSSÃO

Pacientes com IRC, principalmente os que recebem uma técnica depurativa extrarenal, como a hemodiálise, possuem um desequilíbrio do balanço pró-oxidante/antioxidante (Locatelli et al., 2003). Essa situação tem origem multifatorial, como a desnutrição e hipoalbuminemia; o próprio estado urêmico; uso de membranas sintéticas bioincompatíveis e presença de contaminantes na água de diálise usadas durante a terapia. Além disso, fatores de comorbidade, como idade avançada, diabetes, fenômenos inflamatórios, infecciosos e virais também podem contribuir para esse desequilíbrio (Halliwell e Gutteridge, 1990; Himmelfarb et al., 2002). Tudo isso acarreta uma exacerbação do dano celular mediado por espécies reativas, as quais estão envolvidas na mortalidade e desenvolvimento de muitas complicações, principalmente vasculares.

Para estes pacientes, inúmeras são as razões para a desnutrição, incluindo distúrbios no metabolismo protéico e energético, alterações hormonais e ingestão alimentar deficiente, devidos, principalmente a anorexia, náuseas e vômitos, manifestações clínicas freqüentes no estado de toxicidade urêmica (Martins e Riella, 2001), sendo por isso, importante a avaliação de vitaminas e de carotenóides nestes pacientes.

O retinol, maior forma circulante da vitamina A no organismo, encontra-se aumentada em pacientes com IRC, tratados por hemodiálise (Muth I, 1991). Neste trabalho, os níveis de retinol plasmático estavam três vezes maiores em pacientes hemodialisados quando comparados aos indivíduos saudáveis, ($p < 0.001$). A análise entre grupos com recente terapia e longa terapia (dados não mostrados), não demonstrou nenhuma diferença relacionada ao tempo de tratamento, supondo com isso que o tempo de hemodiálise não interfira nas concentrações de retinol. O principal motivo para o aumento dos níveis de retinol na circulação destes pacientes é devido a alterações no catabolismo da proteína carreadora do retinol (RBP) que é dependente da função renal normal (Frey et al, 2008). Em pacientes que realizam hemodiálise, a concentração desta proteína aumenta, com o aumento da falência renal. Foi demonstrado no presente trabalho que níveis de retinol plasmático apresentaram uma correlação positiva com as concentrações de uréia e creatinina (Rock et al., 1997) ($r=0,68$ e $r=0,65$), respectivamente.

O retinol assim como a vitamina E possui propriedades lipofílicas e antioxidantes. Pelo seu poder antioxidante é muito utilizado em terapias para tratamento e prevenção de doenças neudegenerativas e alguns tipos de câncer (Abd et al., 2000). Porém, nos últimos anos, o retinol tem sido alvo de muitos estudos, pois, em altas concentrações constatou-se ter ação pro-oxidante, promovendo o aumento do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, e conseqüentemente o aumento do MDA. Os pacientes deste estudo, assim como mostrado em vários trabalhos, apresentaram níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) significativamente aumentados (figura 1; artigo 1). Pela figura 2 do artigo 1 foi demonstrada a existência de uma correlação positiva entre retinol e MDA, sugerindo que o retinol está atuando como pro-oxidante, aumentando possivelmente a peroxidação lipídica. Também foi constatada uma correlação negativa entre os níveis de retinol e a atividade de ALA-D a qual pode ser inibida com o aumento do estresse oxidativo ($p < 0.01$) (figura 3; artigo 1), esta enzima vem sendo com considerada um biomarcador do estresse oxidativo em várias patologias como na IRC (Fontanellas et al, 2002) e também em relação ao tempo de hemodiálise (Valentini et al, 2007).

Quando realizada a correlação parcial para verificar se o MDA ou o retinol que mais influenciavam na inibição da atividade da ALA-D foi demonstrado que somente o retinol foi significativo, quando controlado pelo MDA ($r = -0,43$, $p < 0,05$).

Realizando o teste com o dithiothreitol (DTT), agente utilizado *in vitro* para prevenir ou reduzir a oxidação dos grupos tiólicos à atividade da enzima, não foi observada a restauração, pelo DTT, aos níveis normais encontrados nos indivíduos saudáveis. Isso faz supor que outros mecanismos poderiam estar envolvidos na inibição. Dentre eles, a oxidação de outros aminoácidos não sulfidrílicos, a síntese diminuída dessa enzima, ou ainda outros fatores peculiares à condição urêmica, como o acúmulo de substâncias no organismo que poderiam interferir na atividade enzimática.

Nesta mesma linha também demonstramos o desequilíbrio na atividade das enzimas antioxidantes, no qual a atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) estavam aumentadas no grupo de pacientes. A explicação para estes aumentos pode ser devido a um processo compensatório que estaria ocorrendo devido o aumento crônico das concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do ânion superóxido (O_2^-).

De acordo com Murata e colaboradores (2000) o aumento das enzimas antioxidantes (CAT e SOD) pode ocorrer pelo aumento do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio promovido pelo aumento das concentrações de retinol. Quando realizada a correlação entre o retinol e a atividade destas enzimas, verificou-se uma correlação positiva com as duas, a catalase ($r=0,39$; $p<0,01$) e a SOD ($r=0,40$; $p<0,01$). Estes resultados estão de acordo com Dal-Pizzol e colaboradores (2000) que sugerem que o aumento dos níveis de retinol induz um aumento da atividade destas enzimas.

Entre pacientes hemodialisados a principal causa de morbidade e mortalidade são as doenças vasculares (Bethesda,1993; Port, 1990; Panfrey, 1991). Neste trabalho, dois anos após as coletas sanguíneas, em torno de 30% dos pacientes HD morreram de doenças vasculares, sendo 1 por acidente vascular cerebral (AVC) e 6 por doenças cardiovasculares. O aumento do estresse oxidativo e alterações no perfil lipídico, e conseqüentemente o aumento do índice de risco coronariano, são os principais fatores que podem acarretar doenças vasculares.

Os pacientes deste estudo possuíam as concentrações de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides dentro dos valores normais, apesar de serem aumentados significativamente quando comparados com o grupo controle (tabela 4; artigo 2). Porém, a concentração do colesterol HDL estava abaixo dos valores de referência e significativamente diminuída comparada aos controles. Também foi calculado o índice de risco coronariano (relação colesterol total/colesterol HDL e colesterol LDL/ colesterol HDL) (Kinosian et al, 1994) no qual os pacientes HD apresentaram estes índices três vezes mais elevados em relação aos controles, sugerindo que apesar de possuírem alguns níveis de colesterol dentro dos valores de referência, estes apresentavam um aumento de risco coronariano.

Os principais antioxidantes exógenos carotenóides e vitamina E (α - e γ -tocopherol) apresentaram poucas diferenças entre os pacientes hemodialisados e o grupo controle. Sabe-se ainda, que a concentração dos carotenóides é afetada principalmente pela dieta (frutas e legumes) e pelo metabolismo. Sendo a vitamina E, em vários trabalhos demonstrada como o principal antioxidante exógeno contra o processo de aterogênese, neste estudo não apresentou diferença entre os dois grupos (tabela 3; artigo 2). Isto pode sugerir que apesar da vitamina E estar em concentrações comparáveis a dos controles, os pacientes HD ainda continuam morrendo por doenças causadas pela aterogênese. Dentre os carotenóides, os

únicos que apresentaram diferença entre os grupos foram o α -caroteno e o licopeno, no qual suas concentrações estavam significativamente reduzidas pela metade no grupo de pacientes. Já o β -caroteno, a luteína, a β -criptoxantina e a zeaxantina não apresentaram diferenças entre os grupos de estudo.

O α -caroteno, apesar de estar diminuído significativamente no grupo de pacientes HD, até então, não foi atribuída nenhuma ação anti-aterogênica, possuindo apenas ação antioxidante. Já o licopeno, um dos principais antioxidantes e cardioprotetores (Ohta et al, 1989), apresenta também ação hipocolesterolêmica (Loughrey et al, 1994). Por ser um dos carotenóides mais importantes para a saúde humana possui grande interesse em seu estudo. Neste trabalho, foi demonstrado que os pacientes HD possuíam os níveis de licopeno reduzidos significativamente em relação ao grupo controle. Também se evidenciou uma correlação negativa entre os níveis de licopeno e MDA. Com esta correlação podemos sugerir que os baixos níveis de licopeno corroboram para o aumento da peroxidação lipídica. Foi constatada uma correlação negativa com o colesterol LDL, um dos principais fatores responsáveis pelo aumento da prevalência da aterogênese, e o índice de risco coronariano (relação colesterol LDL/ colesterol HDL). Com estas duas correlações também podemos sugerir que a diminuição dos níveis de licopeno também corroboram para o aumento do risco de eventos vasculares. Então, a partir destas correlações podemos sugerir que em pacientes hemodialisados o licopeno, dentre os carotenóides estudados, é o que apresenta maior influência sobre a aterogênese. Pois, como atua tanto como antioxidante quanto como hipocolesterolêmico, principalmente protegendo a fração LDL da oxidação, estando em baixas concentrações não consegue proteger contra a aterosclerose.

5. CONCLUSÕES:

- Os pacientes HD apresentaram níveis plasmáticos de retinol aumentados e, através das análises laboratoriais e estatísticas, foi possível sugerir que em concentrações elevadas atua como um agente pró-oxidante/oxidante. Induzindo o aumento das atividades das enzimas SOD e CAT, supostamente por um mecanismo compensatório pelo aumento do peróxido de hidrogênio e do ânion superóxido; assim como inibir os grupos tiólicos da enzima ALA-D (dano de proteína), além da peroxidação lipídica.
- Os níveis sanguíneos, de vitamina E (α - e γ - tocoferol), carotenóides (luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno) e antioxidantes endógenos (SOD, CAT e GSH), comparáveis ao grupo de indivíduos saudáveis, não impediram o aumento da peroxidacao lipídica em pacientes hemodialisados.
- Os pacientes hemodialisados apresentaram concentrações de colesterol total, LDL e triglicerídeos dentro dos valores de referência, porém o índice de risco coronariano, relação colesterol LDL/colesterol HDL, estava aumentado, cerca de três vezes, em relação ao grupo controle.
- A partir dos resultados obtidos é possível sugerir que o licopeno, dentre as vitaminas e carotenóides analisados, é o que pode ter a maior influência protetora sobre a aterogênese, que é a principal causadora de morbidade e mortalidade por doenças vasculares nestes pacientes. Pois, os níveis de licopeno foram correlacionados negativamente com os níveis de colesterol LDL, sugerindo ação hipocolesterolêmica, e ainda uma correlação negativa com o índice de risco coronariano (colesterol LDL/colesterol HDL). Além disso, seu aumento diminui a peroxidacao lipídica, sugerindo uma ação antioxidante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL MAKSOUUD A. M. Retinol and alpha-tocopherol levels among haemodialysis patients. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v. 15, p. 65-71, 2000.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth. Enzymol.** V.105, p.121-126, 1984.

APPEL G. Lipid abnormalities in renal disease. **Kidney Int**, v. 39, p.169-83, 1991.

ATTMAN, P. O.; ALAUPOVIC, P. Lipid and apolipoprotein profiles of uremic dyslipoproteinemia – relation to renal function and dialysis. **Nephron**, v. 57, p. 401-10, 1991.

BARREIROS, B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-126, 2006.

BEAL, M. F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annals of Neurology**, v. 38, p. 357-366, 1995.

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

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

BENDICH, A. Carotenoids and the immune response. **J. Nutr**, v. 119, p. 112-115, 1989.

BERGSTROM J. Why are dialysis patients malnourished? **Am J Kidney Dis**, v. 26, p. 229-41, 1995.

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

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.

BOLZAN, R. C. et al. Delta-aminolevulinate dehydratase inhibition by phenyl selenoacetylene: effect of reaction with hydrogen peroxide. **Pharmacology & Toxicology**, v.90, n. 4, p. 214-9, 2002.

BONITHON-KOPP, C. et al. Combined effects of lipid peroxidation and antioxidant status on Carotid atherosclerosis in a population aged 59-71 y: The EVA Study. Etude sur le Vieillissement Arteriel. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 121-127, 1997.

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

BOOTH, S. L.; JOHNS, T.; KUHNLEIN, H. V. Natural food sources of vitamin A and provitamin A. **Food Nutr Bull**, v. 14, p. 6-19, 1992.

BORELLA, M.L.L & VARELA, Q.D. Antioxidantes Enzimáticos. In: SALVADOR, M. E HENRIQUES, J. A. P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas: ULBRA, p.35-49, 2002.

BOWEN, P. E.; MOBARHAN, S.; SMITH, J. C. Carotenoid absorption in humans. **Methods Enzymol**, v. 214, p. 3-17, 1993.

BRITTON G. Structures and properties of carotenoids in relation to function. **The Faseb Journal**. v. 9, p.1551 – 1558, 1995.

CANAUD, B. et al. Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. **Blood Purif**, v.17, p.99-106, 1999.

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

CHAZOT C. Malnutrition in long-term haemodialysis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 16, p. 61-69, 2001.

CLEVIDENCE, B. A.; BIERI, J. G. Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. **Methods Enzymol**, v. 214, p. 33-46, 1993.

COWARD KH. Influence of light and heat on formation of vitamin A in plant tissues. **J Biol Chem**, v. 72, p. 781-99, 1927.

CUPPARI L. Avaliação nutricional de pacientes renais crônicos em programa de hemodiálise. **Rev Ass. Med Bras**, v. 35, p. 9-14, 1989.

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

DAL-PIZOL F. et al. Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. **Free Radic Res**, v. 32, p.677-687, 2000.

DAS, N. P. Effects of vitamin A and its analogs on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. **J. Neurochem**, v. 25, p. 585-588, 1989.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H.; Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys**, v.274, p.532-538, 1989.

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.

ERDMAN, J. W.; BIERER, T. L.; GUGGER, E. T. Absorption and transport of carotenoids. **Ann. NY Acad. Sci**, v. 691, p.76-85, 1993.

FERNANDEZ-CUARTERO, B. et al. Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. V. 31, n. 3/4, p. 479-88, 1999.

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.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FONTANELLAS, A. et al. Erythrocyte aminolevulinate dehydratase activity as a lead marker in patients with chronic renal failure. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 40, n. 1, p. 43-50, 2002.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol**, v.201, p. 1203-1209, 1998.

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

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. **Wills' : biochemical basis of medicine**. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, p. 196-202, 1997.

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

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

GOODWIN, T. W. Metabolism, nutrition and function of carotenoids. **Annu. Rev. Nutr.** v. 6, p. 273-297, 1986.

GOULD A. L. Cholesterol reduction yields clinical benefit: Impact of statin trials. **Circulation**, v. 97, p.946-52, 1995.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136-47, 2000.

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

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

HARRIS, A.; DEVARAJ, S.; JALAL, I. Oxidative stress, alpha-tocopherol therapy, and atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 4, p. 373-80, 2002.

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.

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

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

JUNQUEIRA, V. B. C.; RAMOS, L. R. Estresse Oxidativo. In: RAMOS, L. R.; NETO, J. T. **Geriatrics e gerontologia**. Barueri: Manole Ltda, v. 24, p. 315-324, 2005.

KRINSKY, N. I. Carotenoids and cancer: basic research studies. In: National Antioxidants in Human Health and Disease, p. 239-261, Academic Press, San Diego, 1994.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Mol Aspect of Medicine**, v. 25, p.459-516, 2005.

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.

LEO, M. A. et al. Metabolism of retinol and retinoic acid by human liver cytochrome P450IIC8. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 269, p. 305-312, 1989.

LEVEY A. S. Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: What do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? **Am J Kidney Dis**, v. 32, p.853-906, 1998.

LI, E.; NORRIS, A. W. Structure/function of cytosolic vitamin A-binding proteins. **Annu Rev Nutr**, v. 16, p. 205, 1996.

LIEBLER D. C.; MCCLURE T. D. Antioxidant Reactions of Carotene: Identification of Carotenoid-Radical Adducts. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, p. 8-11, 1996.

LOCATELLI, F. et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 18, p. 1272-1280, 2003.

LONGENECKER J. C; CORESH J.; POWE N. R. Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients with the general population: The CHOICE Study. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, p. 1918-27, 2002.

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

MAHAN, L.K & STUMP, S.E. What is a vitamin? In: KRAUSE'S. **Food, Nutrition & Diet Therapy**. W.B. 10ª edição, Saunders Company, p.68-109, 2000.

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

MARIANI, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. **Journal Chromatography B**, v. 827, n. 1, p. 65-75, 2005.

MARTINS C.; RIELLA M. C. Nutrição e Hemodiálise. In: Riella MC, Martins C. Nutrição e o rim. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.114-31, 2001.

MATHEWS-ROTH, M.M.. Plasma concentration of carotenoids after large doses of beta-carotene. **Am. J. Clin. Nutr**, v.52, p.500-501, 1990.

MATHUR S.; DEVARAJ S.; JINLAL I. Accelerated atherosclerosis, dyslipidemia and oxidative stress in end-stage renal disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 11, p. 141-147, 2002.

MAYNE, S. T. Antioxidants nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 933S-940S, 2003.

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.

MEYDANI, S. N.; HAN, S. N.; WU, D. Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. **Immunological Reviews**, v. 205, p. 269-284, 2005.

MILLS, B. J.; LANG, C. A. Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 401-406, 1996.

MONAGHAN, B. R.; SCHMITT, F. O. The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linolei acid. **J. Biol. Chem**, v. 96, p. 387-395, 1932.

MOSCA, M. et al. Antioxidant nutrient supplementation reduces the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in patients with coronary artery disease. **Journal of American College of Cardiology**, v.30, n.2, p. 392-9, 1997.

MOORE, T. Vitamin A. Amsterdam: **Elsevier Publishing Company**, 1957.

MOREIRA, A. M.; SHAMI, N. J. Licopeno como agente antioxidante. **Ver. Nutr**, v.17, p.227-236, 2004.

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.

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

MUTH I. Implications of hypervitaminosis A in chronic renal failure. **J Renal Nutr**, v. 1, p. 2-8, 1991.

NAGAO, A.; OLSON, J. A. Enzymatic formation of *9-cis*, *13-&s*, and all-trans retinals from isomers of beta-carotene. **FASEB J**, v. 8, p. 968-973, 1994.

NAPOLI, J.L. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism and signal transduction. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.80. p.52-62, 1996.

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

NISHINO, H. Cancer prevention by carotenoids. **Mutat. Res**, v.402, p.159-163, 1998.

NORDBERG, J. & ÀRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxins system. **Free Rad Biol Med**, v.31, p. 1287-1312, 2001.

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.

OLSON JA, KRINSKY NI. Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic. **Faseb J**, v.9, p.1547-1550, 1995.

OLSON, J. A. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. **Pure Appl. Chem**, v. 66, p. 1011-1016, 1994.

OLSON, J. A. Formation and function of vitamin A. Biosynthesis of Isoprenoid compounds, **Wiley e Sons**, New York, v.2, p.371-412, 1983.

PACKER L. Protective Role of Vitamin E in biological systems. **Am J Clin Nutr**, v.53, p.1050-1055, 1991.

PALLACE, V.P. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Rad. Biol. Med**, v.26, p.746-761, 1999.

PARKER, R. S. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. **FASEB J**, v. 10, p. 542-551, 1996.

PARKER, R.S.. Carotenoids in human blood and tissues. **J Nutr**. v.119, p.101-104, 1989.

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

PASSOS V. M. A. Health and Ageing Study (BHAS) Group. Detection of renal dysfunction based in serum creatinine levels in a Brazilian community. The Bambui Health and Ageing Group. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, p. 393-401, 2003.

PEREIRA, B. et al. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **J. Appl. Physiol**, v. 72, p. 226-230, 1992.

PRICHARD S. S. Impact of dislipidemia in end-stage renal disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, p. S315-S320, 2003.

QUADRO, L. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. **Mol. Asp. Med**, v. 24, p. 421-430, 2003.

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

ROCK, C. L. Responsiveness of serum carotenoids to a high-vegetable diet intervention designed to prevent breast cancer recurrence. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev**, 1997, in press.

ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **J. Am. Diet. Assoc**, v. 96, p. 693-702, 1996.

ROMANCHIK, J. E.; MOREL, D. W.; HARRISON, E. H. Distributions of carotenoids and alpha-tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated *in vitro*. **J. Nutr**, v. 125, p. 2610-2617, 1995.

ROMÃO JR. J. E. Doença renal crônica: Definição epidemiologia e classificação. **J Bras Nefrol**, n. 26, v.3, p. 1-3, 2004.

SASSA, S. ALA-D Porphyrin. **Seminars in Liver Disease**, v.18, p. 95–101, 1998.

SCHMITZ, H. H. Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue. **J. Nutr**, v. 121, p. 1613-1621, 1991.

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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, p.67-71, 2005.

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

SILVA, C. R. M.; NAVES, M. M. V. Suplementação de vitaminas na prevenção do câncer. **Revista Nutr**, v.14, p.135-143, 2001.

SILVEIRA, S. A. Avaliação antropométrica e dos níveis plasmáticos de vitamina A em indivíduos infectados pelo HIV-1 em pacientes com SIDA [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Departamento de Clínica Médica – Moléstias Infecciosas e Tropicais da USP, 1996.

SOLOMONS, N. W.; BULUX, J. Plant sources of provitamin A and human nitriture. **Nutr. Rev**, v. 51, p. 199-204, 1993.

STAHL, W., SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Mol Aspects Med**, v.24, p.345-351, 2003.

STAMPFER, M.J.; RIMM, E. B. Epidemiologic evidence for vitamin E. **Sciences**, v. 899, p. 136-47, 1995.

TESORIERE, L. Antioxidant activity of all-trans-retinol in homogenous solution and phosphatidylcholine liposomes. **Arch. Biochem. Biophys.** v.307, p. 217-223, 1993.

UCHIDA, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1685-96, 2000.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, 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.

VALENTINI J., et al. Human erythrocyte δ -aminolevulinatase activity and oxidative stress in haemodialysis patients. **Clin Biochem**, v.40, p.591-594, 2007.

VALENZUELA R. G. V. Estado nutricional de pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise no Amazonas. **Rev Ass. Med Bras**, v. 49, p. 72-8, 2003.

VANNUCCHI, H. Interaction of vitamins and minerals. **Arch Latinoam Nutr**, v. 41, p. 9-18, 1991.

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

WANG, X. D. et al. Biosynthesis of 9-cis-retinoic acid from γ -cis-beta-carotene in human intestinal mucosa in vitro. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 313, p. 150-155, 1994.

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

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

7.1 ANEXO A

CARTA DE ACEITE PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA NEPHROLOGY AND DIALYSIS TRANSPLANTATION

Em qua, 31/12/08, ndt@ugent.be <ndt@ugent.be> escreveu:

De: ndt@ugent.be <ndt@ugent.be>

Assunto: The plasma retinol levels as pro-oxidant/oxidant agents in haemodialysis patients

Para: garciapomblum@yahoo.com.br, sgarpom@ccs.ufsm.br

Cc: caroline.vinck@ugent.be

Data: Quarta-feira, 31 de Dezembro de 2008, 10:02

NDT-00862-2008.R2

The plasma retinol levels as pro-oxidant/oxidant agents in haemodialysis patients

31-Dec-2008

Dear Professor Garcia,

Thank you for sending us your final revised version of the above manuscript. We are pleased to inform you that your work has been accepted for publication in NDT, and will be forwarded to the publishers immediately.

Two to three weeks from acceptance, you will receive the PDF proof of your paper. Please check your proof carefully. Any corrections will need to be returned to Oxford Journals within three working days.

Copyright:

It is a condition of publication that we receive a completed copyright form. Please download and complete a 'License to Publish Form' and send it directly to the publishers by express mail

(<http://www3.oup.co.uk/jnls/list/ndt/instauth/copyright.pdf>).

Conflict of interest:

Please send the original and signed 'Conflict of Interest Form' to our publisher OUP (http://www.oxfordjournals.org/our_journals/ndt_for_authors/conflict.pdf).

IMPORTANT NOTE!

OPTIONAL OPEN ACCESS -NDT authors can opt, at an additional charge, to make their paper freely available online to all immediately upon publication, as part of the Oxford Open initiative. Now that your manuscript has been accepted you must complete and return the licence form to the production office immediately (fax: +44 (0)1865 353798). Under Step One of the form indicate whether you wish to be published under an Open Access model and agree to pay the

relevant additional charge. Applicable Open Access charges can be found at <http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen/>

If you do not select the Open Access option, your paper will be published in the journal with standard subscription-based access and you will not be charged. Authors who choose the Open Access publication option are also required to complete an Open Access charge form online at <http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen/forms>.

Should you have any further questions related to your paper, please do not hesitate to contact the Editorial Office.

The Editorial Team of NDT thanks you for your interesting contribution to our journal.

Yours sincerely,

Prof. Dr. N. Lameire
Editor In Chief, Nephrology Dialysis
Transplantation

Jürgen Floege, M.D.
David Wheeler, M.D.
Deputy Editors, NDT

7.2 ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,, data de nascimento/....., sexo, fui convidado(a) pela profa. Dra. Solange Cristina Garcia Pomblum a fazer parte de um trabalho científico intitulado “**Avaliação de vitaminas e carotenóides em pacientes hemodialisados**”.

Neste trabalho será verificada a quantidade de algumas vitaminas e carotenóides importantes no sangue que podem levar ao aumento do risco de derrames, perdas de memória e problemas no coração. Serão realizados também hemograma (exame pra detectar anemias e infecções), dosagens de colesterol e triglicerídios e outros marcadores que quando aumentados podem levar ao aparecimento de doenças cerebrais e cardíacas. Fui esclarecido que minha participação é de livre e espontânea vontade e que caso aceite, será realizada uma coleta de 10 mL de sangue venoso, com o mínimo de risco já conhecido para esta técnica sem custo para o doador. Fui informado que, caso as vitaminas estejam baixas serei convidado a fazer um tratamento por seis meses com complexo vitamínico, sob orientação médica do projeto sem nenhum custo. Para isso, serão coletados mais 10 mL de sangue aos três meses e outra aos seis meses de tratamento. Depois de decorridos os seis meses, caso ainda seja necessário tratamento, serei encaminhado para cuidados médicos em ambulatório de geriatria do Hospital Universitário de Santa Maria ou de minha escolha com completa isenção do grupo de pesquisa.

Estou ciente de que receberei os resultados dos exames sem custo, mas não receberei nenhuma outra forma de pagamento e que poderei desistir de fazer parte do trabalho a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento, restrições ou consequências.

Eu terei garantia de não identificação e de caráter confidencial dos resultados. Terei garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca de procedimentos, riscos, benefícios, etc, contatando a professora Dra. Solange Cristina Garcia Pomblum, em sua casa na Rua Antônio Botega, 346, Apto 302, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97095-030, telefone (55) 9614-0553 ou no Laboratório de Toxicologia no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria, localizado na Av. Roraima s/n, Prédio 26, CEP 97110-970, sala 1404 ou pelo fone (55) 3220-8941.

Fui informado de que os resultados deste trabalho serão apresentados posteriormente em seminários, congressos e artigos.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas por mim, descrevendo o estudo.

Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer hora, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Santa Maria, Setembro de 2006.

Assinatura do paciente ou responsável