



TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDase E
5'-NUCLEOTIDASE E DO PERFIL OXIDATIVO EM
PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL
CRÔNICA**

Adriane Cismoski da Silva

PPGCBB

Porto Alegre, RS, Brasil

2008

**ESTUDO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDase E
5'-NUCLEOTIDASE E DO PERFIL OXIDATIVO EM
PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL
CRÔNICA**

por

Adriane Cismoski da Silva

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós – Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **DOUTORADO em Ciências Biológicas – Bioquímica**

PPGCBB

Porto Alegre, RS, Brasil

2008

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de
DOUTORADO

**ESTUDO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDase E
5'-NUCLEOTIDASE E DO PERFIL OXIDATIVO EM
PLAQUETAS DE PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA
RENAL CRÔNICA**

Elaborada por
Adriane Cismoski da Silva

Como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTORADO em
Ciências Biológicas – Bioquímica**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger
(Presidente/Orientador)

Prof^ª. Dra. Carla Bonan

Prof^º. Dr. Mauricio Reis Bogó

Prof.^º Dr. Felix Antunes Soares

Porto Alegre, 23 de Abril de 2008.

"É melhor tentar, ao invés de sentar-se e nada fazer; é melhor falhar, mas não deixar a vida passar; eu prefiro na chuva caminhar, do que em dias tristes em casa me esconder; prefiro ser feliz, embora louco, do que viver infeliz em são conformismo." (Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger pela sua forma de orientar, seu carinho e dedicação à arte de ensinar. À professora Dra. Vera Maria Morsch pela revisão dos trabalhos científicos.

Aos doutores Luís Cláudio Arantes e Luís Alberto Silva.

Aos professores do programa em Pós-Graduação, pelo enriquecimento científico acumulado durante o desenvolvimento das disciplinas.

Aos alunos André Luís Morsch e Rafael Zanin, e a amiga Maria do Carmo Araújo.

À minha família que soube respeitar os longos momentos de ausência.

Aos pacientes que participaram como voluntários nesse trabalho e ao grupo controle que espontaneamente colaboraram para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | VIII |
| RESUMO..... | XI |
| ABSTRACT..... | XIII |
| PARTE I | |
| 1. Introdução | |
| 1.1 Insuficiência renal crônica | 1 |
| 1.2 Dados epidemiológicos | 2 |
| 1.3 Diagnóstico da doença renal crônica | 4 |
| 1.4 Progressão da doença renal crônica | 5 |
| 1.5 Quadro bioquímico e hematológico da insuficiência renal | 6 |
| 1.6 Técnicas dialíticas na insuficiência renal crônica | 9 |
| 1.7 Doenças cardiovasculares na doença renal crônica | 10 |
| 1.8 Plaquetas | 12 |
| 1.9 Alterações da função plaquetária na doença renal crônica | 13 |
| 1.10 Hemostasia | 16 |
| 1.11 Nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares e purinoreceptores | 18 |
| 1.12 E-NTPDase | 22 |
| 1.13 5' – Nucleotidase..... | 26 |
| 1.14 Estresse Oxidativo | 27 |
| 1.15 Enzima ácida aminolevulínico desidratase | 32 |
| 2.Objetivos | 35 |

Parte II

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Apresentação dos Artigos | 36 |
|---------------------------------------|-----------|

| | |
|---|----|
| Capítulo 1: Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in chronic renal failure: Relationship between hemostatic defects and renal failure severity | 37 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Capítulo 2: Oxidative stress and δ -ALA-D activity in chronic renal failure patients..... | 45 |
|---|----|

Parte III

| | |
|---------------------------|-----------|
| 1. Discussão | 52 |
|---------------------------|-----------|

| | |
|--|----|
| 1.1 Perfil bioquímico e hematológico | 53 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| 1.2 Atividade das enzimas NTPDase e 5'- nucleotidase em plaquetas de pacientes com DRC | 55 |
|---|----|

| | |
|-----------------------------|----|
| 1.3 Estresse oxidativo..... | 59 |
|-----------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 1.4 Atividade da enzima delta aminolevulinato desidratase | 61 |
|---|----|

| | |
|----------------------------|-----------|
| 2. Conclusões | 64 |
|----------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------|-----------|
| 3. Perspectivas..... | 66 |
|-----------------------------|-----------|

| | |
|------------------------------|-----------|
| 4. Bibliografia | 68 |
|------------------------------|-----------|

LISTA DE ABREVIATURAS

OH[·] – Radical hidroxil

ACR – Regiões conservadas da apirase

ADP – Adenosina difosfato

AMP - Adenosina monofosfato

ANOVA – Análise de variância

ATP - Adenosina trifosfato

CAPD – Diálise peritoneal ambulatorial contínua

CAT – Catalase

DCV – Doença cardiovascular

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DP – Diálise peritoneal

DPA – Diálise peritoneal automática

DPAC – Diálise peritoneal ambulatorial contínua

DPIN – Diálise peritoneal intermitente noturna

DRC – Doença renal crônica

DTNB – Ácido – 5'5-ditio-bis-2-nitrobenzóico

E-NTPDase – Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

FG – Filtração glomerular

GM-CSF – Fator estimulante de colônia

GPI – Glicosil fosfatidil inositol

HD – Hemodiálise

HDL - Lipoproteína de alta densidade

IDL - Lipoproteína de densidade intermediária

IL – 6 – Interleucina 6

IL –1 – Interleucina 1

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MCP - Proteína de quimiotaxia de monócitos 1

MDA – Malondialdeído

ND – Não hemodialisados

NFKB – fator nuclear KB

NMPP – 5'- Nucleosídeo monofosfato fosfoanidrolase fosfodiesterase

NO - Óxido Nítrico

$O_2^{\cdot -}$ - Ânio superóxido

$ONOO^-$ - Peroxinitrito

PLC – fosfolipase C

PMSF – Fluoreto de fenilmetil sulfonil

PTH - Paratormônio

RLP – Remanescentes de lipoproteína

ROS – Espécies reativas de oxigênio

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF – Fator de crescimento

TNF – Fator de necrose tumoral

TSR – Terapia de substituição renal

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

As anormalidades hemostáticas são comumente encontradas em pacientes com doença renal. Ambos, sangramento e estados pró-trombóticos, podem ser observados em pacientes com doença renal crônica (DRC). O principal papel das plaquetas é assegurar a hemostasia primária, a manutenção da integridade do vaso e cessar o sangramento após uma injúria. As plaquetas também estão envolvidas na trombose arterial aguda, na inflamação, na aterosclerose, e na angiogênese. Quando as plaquetas são ativadas elas se aderem à matrix endotelial onde ocorre a ativação e a liberação de agonistas secundários tais como o ATP, ADP, tromboxano A₂, serotonina e outras substâncias biologicamente ativas. O ADP possui um papel crucial na ativação plaquetária, atuando em receptores P₂. Esta liberação pode ser responsável pela ativação, recrutamento e indução da agregação adicional de plaquetas no microambiente de lesão no vaso. Assim, o metabolismo do ADP no sangue é um importante mecanismo de regulação da função plaquetária. A NTPDase (ecto-CD39) hidrolisa o ATP e ADP extracelulares formando monofosfato de adenosina (AMP), que é subsequente convertido para adenosina pela ação da enzima 5'-nucleotidase (CD73).

O objetivo deste estudo foi explorar a relação entre a disfunção plaquetária na uremia com as anormalidades hemostáticas e a severidade na doença renal em pacientes com insuficiência renal crônica sob tratamento conservador ND (pacientes que não realizam hemodiálise) e HD (pacientes que realizam hemodiálise) comparando com indivíduos normais de mesma faixa etária. Os resultados demonstraram um aumento na atividade da NTPDase em plaquetas de pacientes HD (52,88%) com o substrato ATP. A hidrólise do ADP apresentou-se diminuída (33,68% e 39,75%) em HD e ND pacientes, respectivamente. Além disso, a atividade da 5'-nucleotidase mostrou-se elevada em HD (160%) e ND (81,49%) quando comparado com o grupo controle. Correlações significativas foram encontradas entre a hidrólise do ATP, ADP e AMP e os níveis plasmáticos de creatinina e uréia. Foram realizadas comparações entre o tempo de hemodiálise a que os pacientes estavam submetido e a alterações na hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP. Encontrou-se aumento na atividade da NTPDase com substrato ATP, diminuição com o substrato ADP e aumento da atividade da 5'-nucleotidase entre 49 e 72 meses em paciente HD. Os resultados sugeriram que as alterações na hidrólise dos nucleotídeos em plaquetas podem contribuir para anormalidades hemostáticas em pacientes com DRC, podendo realçar o risco de complicações tromboembólicas e aterosclerose acelerada em pacientes com DRC. Podemos inferir que tanto a uremia como a hemodiálise têm influência nas desordens hemostáticas apresentadas nesses pacientes, e descritas nesse trabalho.

Os conhecimentos sobre estresse oxidativo e seu papel como importante cofator contribuindo para disfunção endotelial, inflamação, aterosclerose e glomeruloesclerose têm substancialmente aumentado nos últimos anos. A doença cardiovascular (DCV) é a maior causa de morte em pacientes com insuficiência renal, sendo que cerca de 50% de todas as mortes em pacientes com terapia substitutiva e que receberam transplante renal estão relacionadas a DCV. A mortalidade por DCV em pacientes com insuficiência renal é aproximadamente 9%

por ano, o que chega a ser 30 vezes maior do que da população em geral.

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os mecanismos de defesa antioxidante. Nos últimos anos, foi estudado o efeito biológico das ROS, e, em estudos clínicos e experimentais recentes, foram notados sinais de estresse oxidativo em pacientes renais. No entanto, a influência da uremia e do procedimento de hemodiálise não foi elucidada.

Nesse estudo, avaliou-se a influência da uremia e da hemodiálise sobre o estresse oxidativo e a atividade da enzima delta aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) em pacientes com DRC em HD e ND comparando com o grupo controle. Observou-se um aumento na peroxidação lipídica em soro de pacientes HD e ND. O nível de TBARS em hemácias foi elevado somente em pacientes HD. A atividade da catalase mostrou-se aumentada (83,56% e 61,23%) em pacientes HD e ND, respectivamente. Neste estudo, demonstrou-se a inibição da atividade da δ -ALA-D em pacientes HD e ND quando comparado ao grupo controle. Observou-se, uma correlação positiva entre δ -ALA-D e δ -ALA-D/DTT com a quantidade de hemoglobina ($r= 0.55$, $r= 0.42$), respectivamente, e também observou-se uma correlação entre δ -ALA-D e δ -ALA-D/DTT e o nível de TBARS em eritrócitos ($r= -0.54$, $r= -0.51$), respectivamente. Além disso, uma correlação negativa foi encontrada entre δ -ALA-D ou δ -ALA-D/DTT e a atividade da enzima CAT ($r= -0.63$, $r= -0.5$), respectivamente.

Nesse trabalho, demonstrou-se que a uréia pode ser o principal fator na geração de estresse oxidativo em pacientes com DRC. Além disso, a inibição da atividade δ -ALA-D foi positivamente correlacionada com níveis de hemoglobina, demonstrando o papel fundamental da enzima δ -ALA-D na biossíntese do heme e no desenvolvimento de anemia em pacientes com CRF. Estudos descreveram que o acúmulo de δ -ALA pode levar ao aumento do estresse oxidativo, e a diminuição da eficiência nos mecanismos de defesa celular contra as espécies reativas de oxigênio pode levar a peroxidação lipídica e também a inibição da atividade da δ -ALA-D, com concomitante alteração na síntese do heme, formando assim um ciclo de destruição.

Esse estudo demonstrou várias alterações em pacientes com insuficiência renal crônica, sendo que muitas delas ajudam a explicar a tendência a desenvolver doença cardiovascular precoce nesses pacientes.

Abstract

Hemostatic abnormalities are commonly found in patients with renal failure. Both a bleeding diathesis and the uremic prothrombotic state may be caused by renal disease. The main role of blood platelets is to ensure primary hemostasis, which is the maintenance of vessel integrity and cessation of bleeding upon injury. While playing a major part in acute arterial thrombosis, platelets are also involved in inflammation, atherosclerosis, and angiogenesis. When platelets are undergo activation first adhere to the subendothelial matrix where they become activated and release secondary agonists such as ATP, ADP, thromboxane A₂, serotonin and several other biologically active substances. ADP and ATP play a crucial role in platelet activation, acting through P₂ receptors. This release may be responsible for the activation, recruitment, and induction of aggregation of additional platelets in the microenvironment. Thus, the metabolism of ADP in the blood is important for the regulation of platelet functions. NTPDase (ecto-CD39) is that hydrolyzes extracellular adenosine tri- and diphosphate (ATP, ADP) to adenosine monophosphate (AMP), which is subsequently converted into adenosine by 5'-nucleotidase (CD73).

The objectives of this study were to explore the relations between platelet dysfunction in uremia with hemostatic abnormalities and the severity of kidney disease in patients with CRF under conservative treatment (nondialysed - ND) and hemodialysis (HD) treatment comparing to healthy subjects with the same age. The activities of the enzymes NTPDase and 5'-nucleotidase were analyzed in platelets from patients with chronic renal failure (CRF), both undergoing hemodialysis treatment (HD) and not undergoing hemodialysis (ND), as well as from a control group. The results showed an increase in platelet NTPDase activity in CRF patients on HD treatment (52.88%) with ATP as substrate. ADP hydrolysis was decreased (33.68% and 39.75%) in HD and ND patients, respectively. In addition, 5'-nucleotidase activity was elevated in the HD (160%) and ND (81.49%) groups when compared to the control group. Significant correlation was found among ATP, ADP and AMP hydrolysis and plasma creatinine and urea levels. Patients were compared statistically according the time of hemodialysis treatment. We found enhanced NTPDase with ATP substrate and decrease with ADP substrate, and increase in 5'-nucleotidase activity between 49 and 72 months on HD patients. Our results suggest the existence of alterations in nucleotide hydrolysis in platelets, which might contribute to abnormal homeostasis in renal failure patients, thus and the enhanced risk of thromboembolic complication and accelerated atherosclerosis in patients with renal failure.

Our knowledge about stimuli and sources of oxidative stress, and about its role as an important cofactor contributing to endothelial dysfunction, inflammation, atherosclerosis and glomerulosclerosis has substantially increase over the last years. Cardiovascular disease (CVD) is the major cause of death in patients with renal insufficiency, accounting for 50% of all deaths in renal replacement therapy patients and in recipients of renal transplants. Mortality from CVD in patients with renal insufficiency is approximately 9% per year, which is about 30 times the risk in the general population.

Oxidative stress defines an imbalance between formation of reactive oxygen species (ROS) and antioxidative defense mechanisms. In view of the profound

biological effects of ROS, in recent years numerous clinical and experimental studies focused on detection of signs of oxidative stress in renal patients. However, the influence of uremia and the hemodialysis procedure, respectively, has not been elucidated. Oxidative stress has been implicated in long-term complications including anemia, amyloidosis, accelerated atherosclerosis, and malnutrition. In this study, we studied the influence of uremia and hemodialysis on oxidative stress and δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in patients with CRF on HD treatment, in patients ND and in a control group. An increased lipid peroxidation was observed in the serum of HD and ND patients, as measured by TBARS serum levels. However, erythrocytic TBARS was only elevated in HD patients. The activity of catalase was increased (83.56%, 61.23%) in HD and ND groups, respectively. This study also showed an inhibition Blood δ -ALA-D activity of HD and ND patients was significantly lower when compared with the control group. A positive correlation was also observed between δ -ALA-D or δ -ALA-D/DTT with hemoglobin ($r=0.55$, $r=0.42$), respectively, and a negative correlated were observed between δ -ALA-D or δ -ALA-D/DTT with TBARS level in erythrocytes ($r= -0.54$, $r=-0.51$), respectively. Furthermore, a negative correlation was found between δ -ALA-D or δ -ALA-D/DTT and CAT activity ($r= -0.63$, $r= -0.5$), respectively.

In this study, it was shown that uremia itself could be the principal factor in generating oxidative stress in CRF patients. Furthermore, the inhibition of δ -ALA-D activity was positively correlated with hemoglobin levels, showing the fundamental role of this enzyme in heme biosynthesis and the development of anemia in patients with CRF. Studies reported that the accumulation of δ -ALA may lead to increased oxidative stress. In addition an existence of a decreased efficiency in the mechanisms of cellular defense against reactive oxygen species can lead to lipid peroxidation and inhibition of the activity of δ -ALA-D with concomitant change in the synthesis of heme, thus forming a cycle of destruction.

This study showed several changes in patients with chronic renal failure, which may to explain the tendency to develop cardiovascular disease in these patients early.

Parte I

1. Introdução

1.1 Insuficiência renal crônica

A insuficiência renal crônica é definida como a deterioração progressiva e irreversível da função renal. Esse conceito pode ser traduzido pela presença de lesão renal (proteinúria persistente), associada ou não a diminuição da filtração glomerular (FG), inferior a 60 mL/min/1,73 m², persistente, durante um período mínimo de três meses (Levey, 2002).

No curso da doença renal crônica (DRC), particularmente quando o FG diminui a valores inferiores a 60 mL/min/1,73m², é comum o aparecimento de complicações, tais como: anemia, doença óssea, desnutrição e acidose metabólica (Draibe & Cendoroglo, 2001; Stigant, Stevens & Levin, 2003).

Pelo fato de ser lenta e progressiva, a perda da função dos nefróns resulta em processos adaptativos que, até certo ponto, mantêm o paciente sem sintomas. Normalmente, os sintomas aparecem após perda de mais de 50% da função renal. Nesta fase, os sintomas são leves e nem sempre incomodam o paciente. Os principais sintomas são: a anemia leve, a pressão alta, o edema dos olhos e pés, a mudança nos hábitos de urinar (levantar diversas vezes à noite para urinar) e as alterações da urina (urina muito clara, sangue na urina, etc.). Nesta fase, o uso de medicamentos e dieta são suficientes para manter a qualidade de vida (Levey, 2002). Quando os rins passam a funcionar com somente 10-12% da função renal

normal, torna-se necessário o uso de outros métodos de tratamento como: a diálise ou o transplante renal (Levey, 2002).

Diversas são as doenças que levam à insuficiência renal crônica. As três mais comuns são: a hipertensão arterial, a diabetes e a glomerulonefrite. A incidência de DRC em hipertensos é elevada, devido ao fato de que os rins são responsáveis pelo controle da pressão arterial. Quando os rins não funcionam adequadamente, ocorre uma elevação da pressão arterial que, por sua vez, leva ao aumento da disfunção renal, fechando assim um ciclo de agressão aos rins. O risco de desenvolvimento de nefropatia é de cerca de 30% nos diabéticos do tipo 1 e de 20% nos diabéticos do tipo 2. Outra causa, muito freqüente de insuficiência renal é a glomerulonefrite, que resulta de uma inflamação crônica dos rins. Depois de algum tempo, se a inflamação não é curada ou controlada, pode haver perda da função renal (Ajzen & Schor, 2002). O risco para desenvolver doença renal crônica é considerado elevado em pacientes com hipertensão arterial, diabetes mellitus e histórico familiar de DRC, e é considerado médio para pacientes com enfermidades sistêmicas, infecções urinárias de repetição, litíase urinária de repetição, mulheres grávidas, crianças com idade inferior a cinco anos e adultos com idade superior a sessenta anos (Junior, 2004).

1.2 Dados epidemiológicos

Segundo o censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), realizado em 2007, a prevalência de pacientes em programa crônico de diálise aumentou de 24.000 em 1994 para 73.605 pacientes em 2007. A figura 1 demonstra a

prevalência de pacientes em programa crônico de diálise (<http://www.sbn.org.br>). A variação percentual anual estimada de 2004 a 2007 foi de cerca de 8,1% (<http://www.sbn.org.br>). A figura 2 demonstra a porcentagem de pacientes em hemodiálise e de pacientes em diálise peritonial (<http://www.sbn.org.br>).

Em trabalho populacional, recente, realizado com os habitantes de Bambuí – MG, observou-se que a prevalência de creatinina sérica elevada foi de 0,48% em adultos, chegando a 5,09% na população mais idosa (>60 anos), o que projetado para a população brasileira equivale acerca de 1,4 milhões de pessoas (Junior, 2004)

Figura 1 - Prevalência de Pacientes em Diálise no Brasil (1994 a 2007) – Censo – SBN (<http://www.sbn.org.br>).

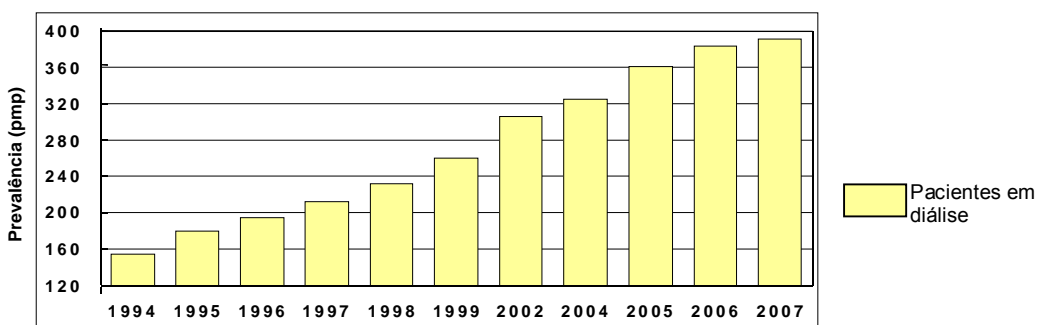
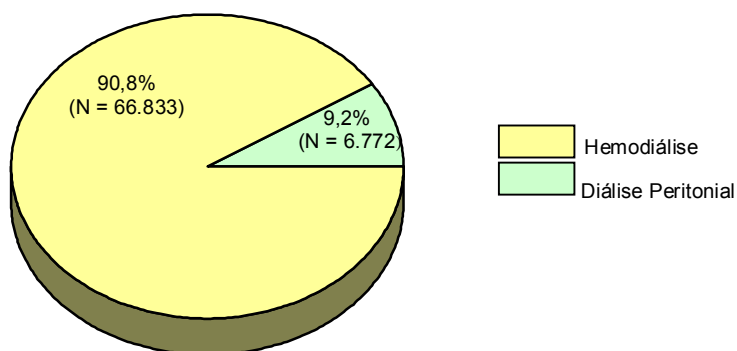


Figura 2 – Distribuição de pacientes em diálise no Brasil de acordo com o tipo de diálise - Janeiro/2007 Censo - SBN – (<http://www.sbn.org.br>).



1.3 Diagnóstico da doença renal crônica

A estimativa da filtração glomerular (FG) representa uma ótima maneira de mensurar a função renal e deve ser usada no estadiamento da DRC. O quadro 1 mostra o estadiamento da DRC (Junior, 2004).

Quadro 1. Estadiamento e classificação da doença renal crônica

| Estágio | Filtração Glomerular (ml/min) | Grau de Insuficiência Renal |
|---------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | >90 | Lesão Renal com Função Renal Normal |
| 2 | 60-89 | IR Leve ou Funcional |
| 3 | 30-59 | IR Moderada ou Laboratorial |
| 4 | 15-29 | IR Severa ou Clínica |
| 5 | <15 | IR Terminal ou Dialítica |

No estágio 1 encontram-se pacientes com função renal normal com histórico familiar de doença renal, no estágio 2 os pacientes possuem uma insuficiência renal leve, os níveis de uréia e creatinina sérica encontram-se em normais, somente a partir do estágio 3 observa-se alterações no nível de creatina e uréia

sérica, porém os sintomas clínicos somente apareceram no estágio 4. Como uma queda na FG precede o aparecimento de sintomas da falência renal ao se monitorizar mudança na FG, estima-se o ritmo de perda da função (Filho, 2004).

1.4 Progressão da doença renal crônica

A doença renal pode progredir independentemente da presença do fator inicial. Estudos em animais de laboratório mostram que a remoção cirúrgica de grandes porções do rim causa alterações adaptativas dos néfrons remanescentes, aumentando o fluxo sanguíneo, a FG e o débito urinário (Bregman, 2004). Os mecanismos exatos responsáveis por estas alterações não são bem compreendidos, mas envolve a hipertrofia dos néfrons remanescentes, bem como as alterações funcionais que diminuem a resistência vascular, a reabsorção tubular nos néfrons sobreviventes e a vasodilatação de suas arteríolas aferentes (Brenner, Meyer & Hostetter, 1982). Essa hiperperfusão leva a uma hipertensão glomerular com conseqüente hiperfiltração glomerular e lesão das estruturas glomerulares (Brenner, Meyer & Hostetter, 1982).

Essas alterações funcionais e morfológicas determinam o aparecimento de proteinúria, que estimula a proliferação mesangial, ao mesmo tempo em que as proteínas passam a ser reabsorvidas em grande escala pelo túbulo contorcido proximal. Esse intenso tráfego de proteínas é lesivo às estruturas tubulares tanto pelo metabolismo como por suas substâncias agregadas. Concorrem para isso a ativação citoplasmática do sistema de estimulação gênica NFK β (fator nuclear K β) e a produção local de espécies reativas de oxigênio (OH \cdot , H $_2$ O $_2$), hormônios,

fatores de crescimento e citocinas. A presença de hipertensão arterial sistêmica constitui fator importante de progressão, somando-se sinergicamente à hipertensão glomerular (Levey et al., 1999).

A taxa de declínio da FG está relacionada com a doença de base (Levey, 1990; Walser, 1990; Austin et al., 1993; Ruggenti et al., 2000), e, também, a fatores modificáveis e não modificáveis (Hannedouche et al., 1993; Hunsicker et al., 1997; Hovind et al., 2001). O quadro 2 apresenta os fatores relacionados à evolução da DRC (Bregman, 2004).

Quadro 2. Fatores relacionados à evolução da DRC

| |
|--|
| Evoluem mais rapidamente |
| Nefropatia diabética, doenças glomerulares, doença renal policística, doença renal do rim transplantado. |
| Evoluem mais lentamente |
| Nefroesclerose hipertensiva, doenças renais tubulointersticiais. |
| Fatores não modificáveis (evolução mais rápida) |
| Sexo masculino, idade avançada. |
| Fatores modificáveis (evolução mais rápida) |
| Maior proteinúria, hipoalbuminemia, hipertensão arterial, controle glicêmico ineficaz, fumo. |

1.5 Quadro bioquímico e hematológico da insuficiência renal

Durante o curso da insuficiência renal, os pacientes apresentam incrementos discretos, mas constantes de uréia e de creatinina plasmáticas. No início da doença, as concentrações plasmáticas de sódio, potássio e fósforo permanecem normais ou muito próximas do normal, com manutenção do pH em níveis

fisiológicos e queda progressiva do bicarbonato plasmático (acidose metabólica compensada) (Kamel et al., 2000; Hsu & Chertow, 2002).

Diariamente, um indivíduo normal gera de 13.000 a 20.000 mmol de ácido volátil (ácido carbônico) e 40 a 60 mmol de ácidos fixos resultantes do seu metabolismo. Esta carga ácida é eliminada através da integração entre os sistemas de tampões, respiratório e renal (Gyton & Hall, 2006). Com a redução do número de néfrons, os rins não conseguem exercer de maneira adequada esta função. Assim, os pacientes portadores da DRC passam a apresentar acidemia metabólica. A queda do pH para níveis acidóticos ($\text{pH} < 7,32$) ocorre em fases mais avançadas da insuficiência renal (acidose descompensada) (Helou, 2004).

A manutenção do potássio corpóreo depende de um balanço integrado entre a ingestão e a absorção do potássio pelo intestino e a sua eliminação pela urina e fezes (Kamel et al., 2000). Na DRC observam-se mecanismos adaptativos para aumentar a excreção de íons potássio pelos néfrons remanescentes, assim como pelo intestino. Esses mecanismos possuem um limite e assim, a hipercalemia poderá ser observada quando a FG atingir valores menores do que 10 ml/min (Kamel et al., 2000). Com a progressão da doença, o nível plasmático de potássio tende a se elevar e o cálcio mostra tendência à queda (Helou, 2004).

A insuficiência renal crônica está associada a alterações do metabolismo ósseo, do cálcio e do fósforo. A osteodistrofia renal pode ser definida como uma síndrome composta de uma variedade de alterações ósteo-articulares que acometem a quase totalidade dos pacientes com DRC. As doenças ósseas da DRC são decorrentes de um conjunto de alterações do metabolismo mineral que provocam alterações hormonais dentre elas o desenvolvimento de

hiperparatireoidismo secundário (Kates, Sherrard & Andress, 1997; Hsu & Chertow, 2002).

O paratormônio regula os níveis séricos de cálcio e fósforo e em decorrência da perda da função renal ocorre alteração na produção desse hormônio na tentativa de manter os níveis adequados dos íons cálcio e fósforo. O hiperparatireoidismo secundário decorre da retenção de fósforo, da hipocalcemia e da deficiência de calcitriol, da proliferação autônoma de células da paratireóide, da resistência óssea à ação do PTH, da alteração no controle da transcrição do gene do PTH, das anormalidades nos receptores de cálcio e vitamina D das paratireóides e alterações na degradação do PTH Hsu & Chertow, (2002).

Os pacientes portadores de DRC apresentam um perfil lipídico tipicamente trombogênico. O tipo e a severidade da dislipidemia nesta população dependem da doença de base e a ocorrência de doença coronariana freqüentemente se dá com níveis normais de LDL-colesterol, concentrações plasmáticas elevadas de triglicérides e níveis reduzidos de HDL-colesterol. Os níveis de VLDL e IDL-colesterol apresentam-se elevados, juntamente com a elevação das concentrações da apolipoproteína C-III e apolipoproteína E nestas frações lipoprotéicas (Nestel, Fidge & Tan, 1982; Attman, Samuelsson & Alaupovic, 1993; Lindner et al., 1974).

Os pacientes com DRC apresentam o exame de urina com hematúria, leucocitúria e proteinúria. A proteinúria é um marcador de doença renal e constitui um fator de risco independente para a sua progressão (Alves, 2004).

A insuficiência renal determina o aparecimento de anemia e essa está relacionada a diversas causas, tais como: deficiência de ferro, deficiência de ácido fólico e vitamina B12, perdas sangüíneas, hemólise e inflamação (Hutchinson & Jones, 1997) e sendo a deficiência relativa de eritropoetina o fator mais importante (Radtke et al., 1979; McGonigle et al., 1984).

1.6 Técnicas dialíticas na insuficiência renal crônica

A diálise é um processo físico-químico pelo quais duas soluções separadas por uma membrana semipermeável influenciam na composição uma da outra (Fisbane & Paganini, 2001). Devem ser encaminhados à diálise pacientes com insuficiência renal crônica, que apresentam sintomas de uremia, e aqueles em que o tratamento conservador não é capaz de manter a qualidade de vida sem prejuízo do seu estado nutricional ou agravamento de complicações crônicas da uremia (Ajzen & Schor, 2002). Não existe um valor exato de uréia e creatinina que determine o início do programa de diálise, mas, pode-se utilizar a média aritmética dos *clearances* de uréia e creatinina. Quando essa média for menor ou igual a $10,5 \text{ ml/min/1.73m}^2$, ou seja, os pacientes com clearance de creatinina entre 9 a $14 \text{ ml/min/1.73m}^2$ e clearance de uréia entre 6 e 7 ml/min/1.73m^2 devem ser encaminhados a diálise (Held et al., 2004; Voneshe & Moran, 1999).

Na hemodiálise, o sangue obtido de um acesso vascular é impulsionado por uma bomba para um sistema de circulação extracorpórea onde se encontra um filtro (dialisador). No filtro, através de uma membrana semipermeável, ocorrem as

trocas entre o sangue e o banho de diálise (dialisato). A hemodiálise crônica normalmente é realizada três vezes por semana por quatro horas com fluxo de sangue de 250-300 ml/min e fluxo de dialisato de 500 ml/min (Ajzen & Schor, 2002). Existem vários tipos de membranas: as de celulose (ex. cuprofano), de celulose modificada (ex. acetato de celulose) e as sintéticas (ex. poliacrilonitrila, polissulfona). As membranas sintéticas são menos bioincompatíveis (Burkart, 1999).

A diálise peritoneal consiste no transporte de solutos e água através do peritônio (membrana semipermeável) entre dois compartimentos: sangue nos capilares peritoniais e solução de diálise na cavidade peritoneal (d'Avila & Figueredo, 1996).

A diálise peritoneal crônica pode ser: DPAC (diálise peritoneal ambulatorial contínua) e DPA (diálise peritoneal automática). A DPAC habitualmente envolve a realização de quatro trocas por dia de 2,0 a 2,5 litros, permanecendo cada troca cerca de 4-8 h na cavidade peritoneal. Na DPA, de 3 a 10 trocas são realizadas através de cicladora automática à noite. A DPA pode ser de dois tipos: DPCC (diálise peritoneal cíclica contínua), quando o paciente mantém solução de diálise na cavidade peritoneal durante o dia, e a DPIN (diálise peritoneal intermitente noturna) quando não ocorre diálise durante o dia (Fisbane & Paganini, 2001).

1.7 Doenças cardiovasculares na doença renal crônica

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com DRC (Appel, 1991; Attman & Alaupovic, 1991). Os

fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardíaca coronariana aterosclerótica, são os tradicionais, como: a hipertensão arterial sistêmica, o diabetes mellitus, a obesidade e a dislipidemia (Longenecker, Coresh & Powe, 2002; Bayés et al., 2005). São, também, fatores de riscos associados à uremia, a hipervolemia, a anemia e o hiperparatireoidismo, os níveis séricos de cálcio e fósforo, e a inflamação (Anavekar & Pfeffer, 2004; Bayés et al., 2005). A mortalidade por DCV nesses pacientes é 10 a 30 vezes maior do que na população em geral (Levey et al., 1998).

No entanto, o conjunto destes fatores não explica totalmente a alta incidência de doença cardiovascular em pacientes com DRC (Bayés et al., 2005). Outros fatores de risco, conhecidos como novos ou não clássicos, são a homocisteína e o estresse oxidativo (Kaysen, 2002; Koenig, 2003; Busch, Franke & Muler, 2004). Mais recentemente, constatou-se que os pacientes urêmicos apresentam atividade inflamatória aumentada e que essa atividade altera o colesterol HDL e o colesterol LDL oxidado (Kaysen, 2002; Koenig, 2003).

Os pacientes urêmicos apresentam um estado micro-inflamatório crônico, especialmente aqueles em tratamento dialítico (Wanner et al., 1999; Arici & Walls, 2001; Bellomo et al., 2003; Thomé et al., 2005). As proteínas de fase aguda positiva, como a proteína C-reativa e outras, têm seus níveis aumentados (Arici & Walls, 2001; Kaysen, 2002; Thomé et al., 2005). As citocinas também estão elevadas, tais como: a interleucina-6, a interleucina-1, o fator de necrose tumoral alfa, entre outras (Arici & Walls, 2001; Kaysen, 2002; Thomé et al., 2005). As causas da estimulação dessas citocinas não são conhecidas, mas várias possibilidades são propostas, tais como: a uremia, as infecções (HCV, infecções

estafilocócicas ou fúngicas, periodontites e outras), o contato com o sistema extracorpóreo de diálise, como linhas e filtros capilares com membranas não idealmente compatíveis e a contaminação por resíduos da água usada no dialisato, principalmente o pirogênio (Tetta et al., 2001; Thomé et al., 2005). Além disso, a desnutrição, a doença renal de base e as co-morbidades ajudam no processo de inflamação (Arıcı & Walls, 2001; Tetta et al., 2001; Thomé et al., 2005).

1.8 Plaquetas

As plaquetas são fragmentos de células anucleadas ovais ou redondas com 2 a 4 μm de diâmetro. São formadas na medula óssea a partir de precursores hematopoiéticos chamados megacariócitos, e são eliminadas da circulação pelo sistema de macrófagos teciduais e do baço (Lee et al., 1998).

As plaquetas possuem muitas características funcionais. O seu citoplasma possui moléculas e organelas, tais como: moléculas de miosina e actina, similares àquelas encontradas nas células musculares; a trombostenina, uma proteína contrátil; resíduos de retículo endoplasmático e aparato de Golgi, que sintetizam várias enzimas e armazenam significativa quantidade de íons cálcio; mitocôndrias e sistemas enzimáticos, que sintetizam ATP, ADP, prostaglandinas, um fator estabilizador da fibrina e o fator de crescimento (Lee et al., 1998).

As plaquetas secretam proteínas que são estocadas nos grânulos α , grânulos densos e lisossomos. As proteínas dos grânulos α incluem fatores específicos (fator plaquetário 4) e proteínas comuns ao plasma (fibrinogênio, fibronectina). As plaquetas sintetizam proteínas, tais como: trombospodina, fator von Willebrand,

enzimas lisossomais, como: N-acetilglucosaminidases, β -galactosidases, catepsinas e collagenases. Os grânulos densos contêm ATP, ADP, Ca^{++} e serotonina (Wu, 1996).

1.9 Alterações da função plaquetárias na doença renal crônica

A função plaquetária é deficiente em pacientes com insuficiência renal. Os defeitos observados nas plaquetas incluem: diminuição de agonistas plaquetários (Castaldi, Rozemberg & Stewart, 1966), anormalidade na aderência das plaquetas (Salzman & Neri, 1966; Larsson, 1971), redução da ativação de pró-coagulantes (Horowitz et al., 1970), diminuição na produção de tromboxano A_2 (Remuzzi et al., 1983), aumento do cAMP (Matthiias & Palinski, 1977), diminuição na retração do coágulo (Lewis, Zucker & Ferguson, 1956), diminuição da glicoproteína de membrana de plaqueta Ib (GPIb) (Sloand et al., 1991). O aumento na produção de prostaglandinas pelo endotélio (Remuzzi et al., 1977), o acúmulo de várias toxinas, tais como, o ácido guanidinosuccínico e a uréia (Cheney & Bonnin, 1962; Horowitz et al., 1970; Gallice et al., 1980; Remuzzi et al., 1983) estão associados à disfunção plaquetária. O tempo de coagulação e a agregação plaquetária são anormais nesses pacientes (Remuzzi et al., 1978; Remuzi, 1989; Carvalho, 1990). Anormalidades na adesão e na ativação plaquetária também são descritas, assim como a trombocitopenia (Cecil & Bennett, 2001).

O sangramento devido ao quadro urêmico é usualmente mucocutâneo e reflete anormalidade nas plaquetas e ou na função hemostática. A hemodiálise e a diálise peritonial normalmente revertem o defeito hemostático induzido pela uremia

(Lindsay et al., 1976; Nenci et al., 1979, Eknoyan & Brown, 1981; Fisbane & Paganini, 2001). O sangramento é parcialmente explicado pelo defeito na interação das plaquetas com a parede do vaso, e é caracterizado por um prolongado tempo de coagulação (Remuzzi, 1989; Gordge & Neild, 1991; Rabelink et al., 1994). A disfunção plaquetária é a principal responsável por defeitos na hemostasia e é responsável pelas maiores alterações na coagulação nesses pacientes (Larsson, 1971; Remuzi et al., 1978; Eknoyan & Brown, 1981).

Quando os pacientes são submetidos à diálise para corrigir a tendência ao sangramento, observa-se uma ativação da coagulação, tais como, ativação plaquetária e agregação como uns dos primeiros e mais importantes fenômenos que ocorrem devido ao contato do sangue com o circuito extracorpóreo (Lindsay et al., 1980; Buscaroli et al., 1991). Os estudos demonstram que os pacientes submetidos à diálise apresentam um estado pró-trombótico (Lai, 1993; Sagripanti et al., 1993). Pode ocorrer estímulo à cascata extrínseca da coagulação por fatores teciduais (Callander & Rapaport, 1993) e observou-se também aumento da geração de trombina *in vivo* (Tomura et al., 1991; Sagripanti et al., 1993; Mezzano et al., 1996). Os pacientes com doença renal crônica possuem uma tendência acelerada a desenvolver aterosclerose (Lindner et al., 1974).

Durante a sessão de hemodiálise, o sangue do paciente fica exposto, no circuito extracorpóreo, a uma superfície de linhas, agulhas, filtro e ar que exibem um variável grau de trombogenicidade, com a adesão de proteínas plasmáticas, a aderência e a agregação de plaquetas, a geração de tromboxano A₂, a geração e

a ativação da cascata intrínseca de fatores de coagulação, levando assim a formação de trombos no circuito extracorpóreo (Pereira et al., 1994).

A ativação plaquetária não ocorre somente devido a desgranulação dos grânulos α , mas, também por mudanças conformacionais no complexo GP IIb/IIIa e a outras respostas fisiológicas. Ocorre, também, uma elevação no nível de várias proteínas plasmáticas como: o fator von Willebrand (Gordge & Neil, 1991), a trombomodulina, que se apresenta elevada na fase avançada da doença renal (Ishii, Uchiyama & Kazama, 1991) e o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) que demonstra-se normal ou elevado em pacientes que realizam hemodiálise (Nakamura et al., 1992; Gris et al., 1994; Hong & Yang 1994; Takagi et al., 1994).

O tipo de membrana utilizada em hemodiálise apresenta diferentes resultados. Pacientes que utilizam membrana de celulose apresentam maiores alterações hemostáticas do que os que utilizam membrana de polissulfona (Kawabata et al., 2002).

A alteração na agregação plaquetária em pacientes com insuficiência renal crônica está caracterizada, mas os mecanismos envolvidos não estão completamente elucidados. A ativação plaquetária durante a hemodiálise pode ocorrer por vários fatores, incluindo ativação por contato e ativação de agonistas como o ADP (Castaldi, Rozenberg & Stewart, 1966; Bloom & Evans, 1969; Frank et al., 2001; Aggarwal et al., 2002). Portanto, mais estudos são necessários para

elucidar os mecanismos envolvidos na ativação plaquetária em pacientes com insuficiência renal crônica e naqueles que realizam hemodiálise.

1.10 Hemostasia

O endotélio vascular normal mantém o sangue fluido por inibição da coagulação sangüínea, inibição da agregação plaquetária e a promoção da fibrinólise, enquanto promove uma barreira que separa as células sangüíneas e os fatores plasmáticos de alta reatividade dos elementos da parede do vaso (Roth, 1992; Marcus & Safier, 1993; Caen & Rosa, 1995). As células endoteliais inibem a agregação plaquetária por vários mecanismos: liberação de prostaglandinas, geração de óxido nítrico, manutenção de carga negativa de sulfato de heparan que repele as cargas negativas das plaquetas e ação da enzima NTPDase que hidrolisa o ADP (Marcus & Safier, 1993).

As plaquetas também parecem ser essenciais para a integridade da monocamada endotelial, pois elas liberam fatores de crescimento para a manutenção das células endoteliais. Uma coagulação rápida e eficiente é dependente da ativação da agregação plaquetária, processo esse modulado por outras células sangüíneas e pelo endotélio e denominado de tromboregulação (Marcus & Safier 1993).

O reparo às lesões vasculares pelas plaquetas está baseado em várias funções, a figura 3 demonstra o mecanismo de ativação plaquetária. Quando as plaquetas entram em contato com a superfície vascular lesada imediatamente mudam suas características (Wu, 1996), elas aumentam de volume, adquirem

formas irregulares com numerosos pseudópodos irradiando-se pela superfície, suas proteínas contráteis contraem-se fortemente e provocam a liberação de grânulos que contêm múltiplos fatores ativos. Além disso, tornam-se viscosas e aderem às fibras colágenas, secretam grande quantidade de ADP, ATP, serotonina, epinefrina, norepinefrina, e suas enzimas sintetizam tromboxano A₂, que também é secretado para o sangue. O ADP é o principal responsável pela ativação, recrutamento e indução da agregação plaquetária adicionando mais plaquetas para esse micro-ambiente (Marcus & Safier 1993). Por conseguinte, na área de qualquer ruptura de um vaso, a parede vascular lesada ou os tecidos extravasculares iniciam um ciclo vicioso de ativação que atraem mais plaquetas ao local da lesão (Siess, 1989). Esses eventos constituem o que se denomina hemostasia primária. Posteriormente, ocorre interação entre proteínas da cascata da coagulação e ativação plaquetária por contato, culminado na geração de trombina, promovendo maior ativação plaquetária e recrutamento. Finalmente, ocorre a formação de um tampão de fibrina (hemostasia secundária) (Dubyak & Elmoatassim, 1993). Em condições normais, esse processo é regulado para prevenir a excessiva formação de coágulos e a oclusão do vaso. Em condições patológicas, como fissura de uma placa aterosclerótica, o processo normal de hemostasia pode escapar do controle normal, resultando em oclusão do vaso (Esmon, 1993).

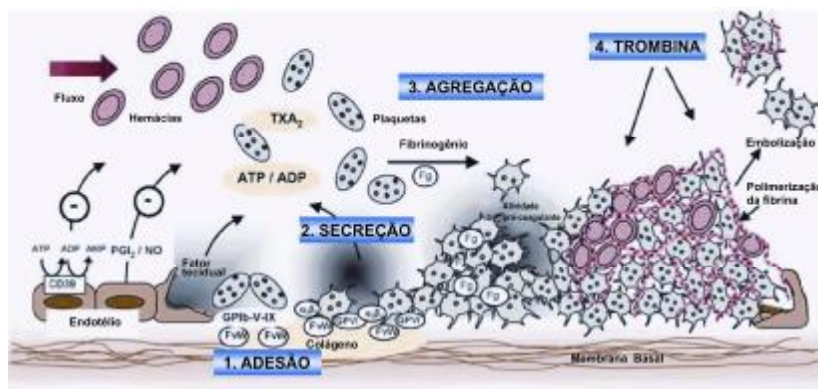


Figura 3. Mecanismo de ativação plaquetária e formação de trombos arteriais (Gachet, 2006). Primeiro as plaquetas aderem à matrix subendotelial onde se ativam e liberam agonistas secundários como o ATP e ADP, que são secretados dos grânulos densos, e TXA₂ que é sintetizado a partir do ácido araquidônico. Todos esses processos levam à ativação da integrina αIIbβ3 que promove mudanças conformacionais na superfície da plaqueta, ligação do fibrinogênio solúvel e fator de von Willebrand, e subsequente agregação plaquetária. Por último, a trombina desencadeia a formação de coágulo de fibrina que estabiliza o trombo.

1.11 Nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares e purinoreceptores

Os nucleotídeos extracelulares são provenientes da ruptura celulares ou liberados do citoplasma por meio de exocitose. As plaquetas representam uma importante fonte de nucleotídeos que são liberados dos grânulos densos por ativação plaquetária (Gachet, 2006). A figura 4 demonstra o modelo de ativação dos receptores P2 em plaquetas.

O receptor P2Y₁ é amplamente distribuído nos tecidos, incluindo coração, vasos sanguíneos, células da musculatura lisa, tecido neural, testículos, próstata e ovários (Ralevic & Burnstock 1998). O receptor P2Y₁ está acoplado a proteína G_q e provoca a ativação intracelular de PLC via Ca²⁺ (Jin & Kunapuli, 1998). O ADP é o agonista preferencial, já o ATP comporta-se como um antagonista em plaquetas (Leon et al., 1997) ou como um agonista parcial, dependendo da densidade de receptores (Filippov, Brown & Barnard, 2000; Birk et al., 2003; Waldo & Harden 2004). Os receptores P2Y₁ desencadeiam mobilização de cálcio dos estoques internos e provocam mudanças na forma das plaquetas. A resposta ao ADP é

considerada fraca e transitória, mas o receptor P2Y₁ é fundamental para iniciar a agregação plaquetária (Hechler et al., 1998a; Hechler et al., 1998b; Jin, Daniel & Kunapuli, 1998; Savi et al., 1998; Burnstock, 2006).

Os receptores P2Y₁₂ possuem distribuição limitada, embora não sejam restritos às plaquetas, estando presentes também no cérebro, nas células endoteliais, nas células gliais e nas células da musculatura lisa (Gachet, 2006). O ADP é o agonista natural, ao passo que o ATP e os análogos trifosfatos são antagonistas (Bodor et al., 2003; Kauffenstein et al., 2004). Este receptor está acoplado a proteína G_{i2}, e é responsável pela agregação plaquetária em resposta ao ADP, possuindo assim um papel crucial na amplificação e indução da agregação (Cattaneo et al., 2002).

O receptor P2X₁ está acoplado ao canal de cátion. O ATP ao ligar-se a esse receptor induz um rápido influxo de cálcio (Mahaut-Smith et al., 2004), provocando mudanças na forma das plaquetas em humanos (Rolf et al., 2001). Embora seja incapaz de desencadear a agregação plaquetária por si só, o receptor P2X₁ tem demonstrado participar da agregação plaquetária induzida pelo colágeno (Takano et al., 1999; Mahaut-Smith et al., 2000; Oury et al., 2001; Cattaneo et al., 2002; Hechler et al., 2003; Vial et al., 2003).

A adenosina é uma molécula que está envolvida em muitas respostas fisiológicas em tecidos de mamíferos. Existem quatro receptores de adenosina acoplados a proteína G: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, que atuam em mecanismos de sinalização intracelulares distintos, e exibindo diversos padrões de distribuição tecidual. Em plaquetas, os receptores A_{2A} são conhecidos pela inibição da agregação plaquetária, processo mediado pelo AMPc (Kawashima, Nagasawa &

Ninomiya, 2000). Também, a adenosina atua em receptores A_{2A} , causando vasodilatação e, pode ainda, possuir uma ação antiinflamatória (Kawashima, Nagasawa & Ninomiya, 2000).

As purinas e as pirimidinas controlam o tônus vascular através dos receptores P2. O ATP, juntamente com a noradrenalina e neuropeptídeo Y, liga-se a receptores $P2X_1$, assim como em $P2X_2$ e $P2X_4$ na musculatura lisa do vaso, resultando em vasoconstrição. A adenosina liberada pela hidrólise enzimática do ATP liga-se a receptores $P1(A_1)$, e inibe a liberação de transmissores. Em condições de injúria e hipóxia, as células endoteliais liberam ATP e UTP, que se ligam a receptores $P2Y_1$ e $P2Y_2$, levando a produção de óxido nítrico, o qual promove a vasodilatação (Burnstock, 2006). Yamamoto et al. (2006) demonstraram que receptores $P2X_4$ medeiam a liberação de óxido nítrico em alguns vasos em resposta ao ATP.

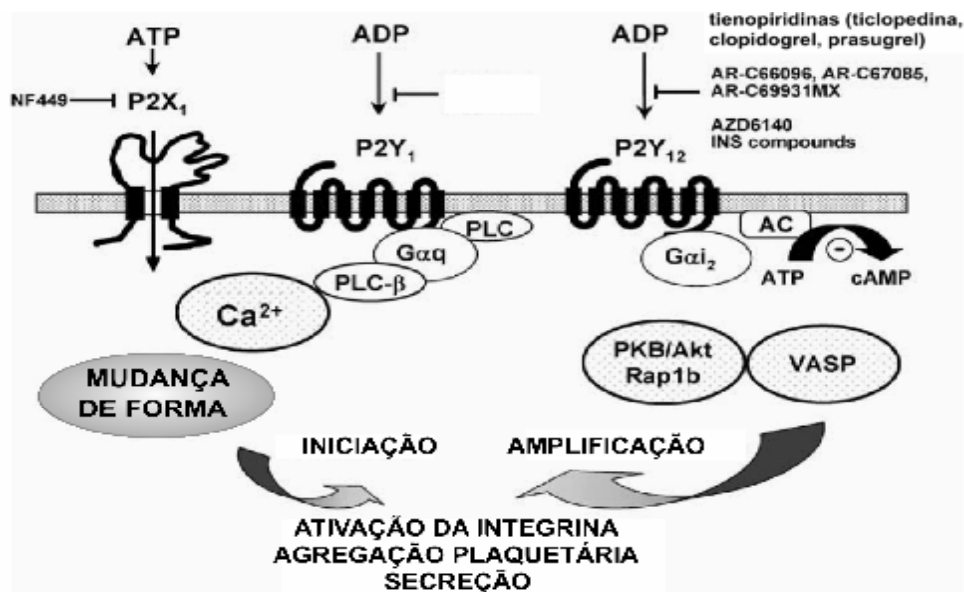


Figura 4. Modelo atual dos três receptores P2 em plaquetas (Gachet, 2006). O receptor P2X₁ é responsável pelo rápido influxo de cálcio e mudanças conformacionais em plaquetas, em resposta ao ATP, e contribui para ativação plaquetária induzida pela baixa concentração de colágeno. Os receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ são essenciais para agregação em resposta ao ADP: P2Y₁ é responsável pela mobilização de cálcio intracelular, pelas mudanças conformacionais das plaquetas e inicia a agregação plaquetária, a ativação do receptor P2Y₁₂ completa a agregação induzida pelo ADP e a potencializa, e induz a secreção de outros agentes através de várias rotas intracelulares. Antagonistas seletivos permitem a discriminação dos papéis dos três receptores. O P2Y₁₂ é alvo de drogas anti-trombóticas como o ticlopidine e o clopidogrel, enquanto P2Y₁ e P2X₁ são potenciais alvos de novos compostos anti-agregantes.

As catecolaminas não podem ser consideradas verdadeiros mediadores da agregação plaquetária. A serotonina, atuando em receptores 5-HT₂, não pode induzir agregação plaquetária em humanos, embora possa potencializar a agregação induzida por norepinefrina (Shah et al., 1999). Ambos, epinefrina e norepinefrina, atuando em receptores α_{2A} têm demonstrado induzir agregação e potencializar a agregação em resposta ao ADP, trombina e tromboxano (Olbrich, Aepfelbacher & Siess, 1989). O ATP pode potencializar a agregação plaquetária induzida pela norepinefrina (Birk et al., 2002). Em contraste, a interação entre serotonina e ATP não tem efeito sobre a agregação plaquetária, sugerindo que a interação entre ATP e norepinefrina é específica (Birk et al., 2003).

A sinalização purinérgica também controla mudanças nas células como a proliferação, a diferenciação, a migração e a morte celular, estando envolvida em várias patologias, tais como: restenose, hipertensão, aterosclerose e isquemia (Burnstock, 2006). Existem estudos que evidenciam o papel da sinalização purinérgica na regeneração de músculos, no controle do crescimento das células vasculares, na formação da neointima associada à hipertensão. Também, vários estudos relatam o papel da sinalização purinérgica no desenvolvimento e na remodelação óssea (Hoebertz, Arnett & Burnstock, 2003, Burnstock, 2006).

1.12 E-NTPDase

A E-NTPDase 1-8 (Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase) é uma família de ectonucleotidases, previamente classificada como ATPases do tipo E, ATPDases, ecto-ATPases ou ecto-apirases. Essas enzimas caracterizam-se pela hidrólise de resíduos de fosfato γ e β terminal de nucleotídeos formando difosfonucleotídeos e/ou monofosfonucleotídeos, são dependentes de cátions divalentes e insensíveis a inibidores clássicos de ATPases tipo P, F e V (Plesner, 1995).

A presença de enzimas que hidrolisam o ATP e/ou o ADP na superfície celular foi descrita há décadas (Pearson, 1985; Plesner, 1995; Zimmermann & Pearson, 1998). No entanto, a identificação molecular do primeiro membro da família das NTPDases somente ocorreu em meados da década de noventa. O protótipo dessa família foi clonado e seqüenciado em linfócitos e foi descrito como um antígeno de membrana (CD39/NTPDase) (Maliszewski et al., 1994).

Mas somente a partir de três abordagens independentes é que conseguiram caracterizar as NTPDases (Robson, Sévigny & Zimmermann, 2006). Handa e Guidotti (1996) purificaram e clonaram uma ATP difosfohidrolase solúvel (apirase) de *Sollanum tuberosum* e clonaram o seu cDNA. A análise da seqüência revelou 25% de identidade na sua seqüência de aminoácidos e 48% de homologia na sua seqüência de aminoácidos com o NTPDase descrito em humanos (Handa & Guidotti, 1996). Em paralelo, ectonucleotidases (denominado ATP difosfohidrolases) de pâncreas de suínos e aorta bovina foram purificados. As seqüências parciais de aminoácido para ambas ATP difosfohidrolases revelaram a identidade com a seqüência do CD39 (Kaczmarek et al., 1996). Os estudos funcionais e de trombo-regulação a partir do cDNA isolado de células endoteliais humanas confirmaram que as ectonucleotidase vasculares (ATP difosfohidrolase) eram idênticas as descritas anteriormente em linfócitos denominadas de CD39 (Kaczmarek et al.,1996). Quando se pensava que existia uma única ectonucleotidase do tipo NTPDase com potenciais modificações pós-traducionais (Wang, Rosenberg & Guidotti,1997) foi clonado uma NTPDase que revelava propriedades funcionais de uma ecto-ATPase (atualmente denominada NTPDase2) em vez de uma ecto-ATP difosfohidrolase (Kegel et al.,1997; Kirley, 1997).

A partir da análise de seqüências expressas ou ESTs (Expressed Sequence Tags) do genoma humano permitiu-se a identificação adicional dos genes dos membros da família NTPDase (Chadwick & Frischauf, 1997; Chadwick & Frischauf,1998; Chadwick et al.,1998). Esses genes foram originalmente chamados de CD39L (ike) 1 a CD39L4. Após seguiram-se a identificação, a

clonagem e a expressão de todos os membros da família E-NTPDase, sendo a última destas a NTPDase8 (Bigonnesse et al., 2004).

As NTPDases são originárias de um ancestral comum (Handa & Guidotti, 1996; Zimmermann & Braun, 1999; Paez et al., 2001; Bigonnesse et al., 2004; Kukulski et al., 2005) e possuem cinco domínios de sucessão altamente conservados denominados de ACR (regiões conservadas de apirase) (Handa & Guidotti, 1996; Esch, Lemmon & Banker, 1999; Burnstock & Williams, 2000; Communi et al., 2000; Kugelgen & Wetter, 2000; Abo-Salem et al., 2004) que são compartilhados e que se tornaram uma característica desta família (Zimmermann, 2001).

As NTPDases (1,2,3,8) são ancoradas a superfície celular possuem os domínios C e N terminal transmembrânicos, e possuem seus sítios catalíticos localizados na porção extracelular, diferenciando-se pela capacidade de hidrolisar nucleotídeos da adenina (Schulte et al., 1999; Grinthal & Guidotti, 2002; Arakaki et al., 2003). A NTPDase 1 hidrolisa os substratos ATP e ADP com a mesma velocidade, a NTPDase 3 e 8 demonstraram uma preferência pela hidrolisa do ATP em relação ao ADP, a NTPDase 2 hidrolisa preferencialmente o substrato ATP (Zimmermann, 2001; Kukulski et al., 2005). As NTPDases 5 e 6 exibem localização na superfície intracelular e são secretadas após expressão heteróloga, hidrolisam preferencialmente o ADP. As NTPDases 4 e 7 são de localização inteiramente intracelular (Robson, Sévigny & Zimmerman, 2006).

A NTPDase1 é uma proteína de massa molecular entre 70-100 kDa, altamente glicosilada com seis sítios potenciais para glicosilação e outros

domínios onde modificações pós-traducionais podem ocorrer (Maliszewski et al., 1994; Esch, Lemmon & Banker, 1999; Zimmermann, 2001).

As NTPDases são expressas no endotélio vascular e estão associadas a regulação dos nucleotídeos extracelulares e plasmáticos (Marcus et al., 1991; Kaczmarek et al., 1996, Robson et al., 1997; Marcus et al., 2003; Robson et al., 2005). Os nucleotídeos extracelulares são importantes mediadores de uma variedade de processos incluindo inflamação e trombose (Robson et al., 2001). A adenosina e o ATP medeiam mecanismos implicados no controle do tônus vascular, assim como migração, proliferação e diferenciação das células vasculares (Robson, Sévigny & Zimmerman, 2006).

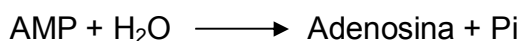
A NTPDase 1 é a nucleotidase mais importante na tromboregulação (Enjoji et al., 1999; Sévigny et al., 2002). Porém, outras NTPDases também desempenham papel importante nesse controle, recentemente estudos revelaram a presença da NTPDase 2 em endotélio vascular e da NTPDase 5 em monócitos (Chadwick & Frischauf, 1998; Mulero et al., 1999; Zimmermann, 1999). A NTPDase1 limita a ativação plaquetária por hidrolisar o ADP (Robson et al., 1997, Marcus et al., 1991, Robson et al., 2000). Em contraste, a NTPDase 2, hidrolisando preferencialmente o ATP e formando o ADP, teria um importante papel na ativação plaquetária (Sévigny et al., 2002)

A solução purificada de NTPDase 1 bloqueou *in vitro* a agregação plaquetária induzida por ADP (Enjoji et al., 1999). Acredita-se que isto se deva ao fato de a hidrólise do nucleotídeo ADP, um agregante plaquetário, constituir uma importante via para limitar a agregação plaquetária e a formação de trombos (Pilla et al., 1996). Trabalhos atuais descrevem alterações na hidrólise do ATP, ADP e AMP

em plaquetas de pacientes com diabetes, câncer de mama e níveis elevados de colesterol (Lunkes et al., 2003; Araújo et al., 2005; Duarte et al., 2007). Estudo recente, utilizando NTPDase 1 em formulação lipossomal, mostrou a amplificação da atividade dessa enzima e o seu potencial para uso terapêutico para tratamento de síndromes vasculares agudas (Haller et al., 2006).

1.13 Ecto-5'- Nucleotidase

A 5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5) é uma enzima de 70 kDa (Lai & Wong, 1991; Zimmermann, 1992), que está presente em inúmeros tecidos como o nervoso, o renal, o hepático, a placenta, o endotélio vascular e as plaquetas. Esta enzima catalisa a hidrólise de AMP a adenosina (Barman, 1969), conforme o esquema 1, abaixo:



Esquema 1. Hidrólise do AMP (monofosfato de adenosina).

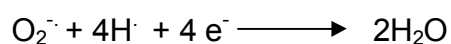
A 5'-nucleotidase é ativada por magnésio e participa da cadeia de hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP até a formação de adenosina, atuando em conjunto com enzimas que hidrolisam ATP e ADP, formam uma cascata hidrolítica (Shryock & Belardinelli, 1997).

A enzima ecto 5'-nucleotidase está ancorada na superfície celular via glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Zimmermann, 2001), está presente em membrana de plaquetas humanas e pode estar relacionada ao processo de agregação plaquetária (Bergamani & Grazi, 1980). Alguns estudos também relacionam

alterações da atividade da ecto-5'-nucleotidase a situações patológicas, como isquemia (Schetinger et al., 1994; Frasseto et al., 2000). Também, recentes estudos relacionam alterações da atividade em plaquetas de humanos com diabetes e câncer de mama (Lunkes et al., 2003; Araújo et al., 2005).

1.14 Estresse oxidativo

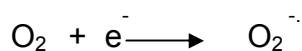
As moléculas de oxigênio diatômico na atmosfera terrestre são as maiores promotoras de reações celulares. Exceto aqueles organismos que são especialmente adaptados para viver sob condições anaeróbicas, todos os animais e plantas requerem oxigênio para uma eficiente produção de energia (Halliwell & Gutteridge, 1989; Halliwell & Gutteridge, 2006). Normalmente, em torno de 95 a 98% do oxigênio absorvido pelos organismos aeróbicos é reduzido, formando-se água na cadeia respiratória através do transporte de elétrons na mitocôndria, bem como no retículo endoplasmático, onde o sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede a redução tetravalente do O₂ pelo sistema citocromo oxidase, fornecendo simultaneamente quatro elétrons para o oxigênio, que se reduz diretamente à água (Halliwell & Gutteridge, 2006), conforme esquema 2:



Esquema 2. Redução do oxigênio.

As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons para a reação são, basicamente, o NADH, o FADH e a ubiquinona ou coenzima Q (Halliwell & Gutteridge, 1989; Halliwell, 2006). Todavia, de 2 a 5% do O₂ é reduzido

univalentemente, processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não parelhado, produzindo intermediários altamente reativos, denominados espécies reativa de oxigênio (ROS), que constituem os radicais livres (Halliwell, 2006). Forma-se então a primeira espécie tóxica reativa de oxigênio, o superóxido, conforme esquema 3:



Esquema 3. Formação do superóxido.

O radical livre nada mais é do que qualquer átomo, molécula ou íon que possuem um ou mais elétrons livres na sua órbita externa. Essas partículas, formadas por elétrons livres ou não pareadas têm uma instabilidade elétrica muito grande, e por esta razão, mesmo tendo meia vida muito curta, apresentam grande capacidade reativa, o que pode acontecer com qualquer composto que esteja próximo, a fim de captar um elétron desse composto para sua estabilização, independente de ser uma molécula, uma célula, ou tecido do organismo, a partir do que, acontecem reações em cadeia de lesão celular. Devido a esta característica, é denominado de substância oxidante. O oxigênio tem a sua atividade fundamental no metabolismo celular aeróbico. Desta forma, a formação de radicais livres pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são necessários no processo de respiração celular são produzidos pelos macrófagos e neutrófilos utilizados na defesa do organismo contra invasores (Halliwell & Gutteridge, 2006).

O estresse oxidativo é definido como o excesso de formação e ou remoção insuficiente de moléculas reativas, tais como: espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Turko, Marcondes & Murad, 2001; Whaieb, 2001; Maritim, Sanders & Watkins, 2003). As ROS incluem radicais livres, tais como: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil (OH^{\cdot}), peróxil ($\cdot RO_2$), hidroperóxil ($\cdot HRO_2$), assim como espécies não radicais, que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados são muito instáveis, tais como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hidrocloreto (HOCL) (Turko, Marcondes & Murad, 2001; Evans et al., 2002). As RNS incluem radicais livres, como: óxido nítrico ($\cdot ON$) e dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$), assim como espécies não radicais, tais como: peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), óxido nitroso (HNO_2) e peroxinitrato (RONOO) (Turko, Marcondes & Murad, 2001; Evans et al., 2002).

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é formado quando o O_2 sofre uma redução. Isoladamente, esse radical é pouco reativo. Porém, os efeitos deletérios vêm da habilidade deste em gerar radicais secundários, extremamente tóxicos como o radical OH^{\cdot} (Halliwell, 2006).

O radical hidroxil (OH^{\cdot}) é um dos mais reativos e é capaz de retirar átomos de hidrogênio do grupo metileno de ácidos graxos poliinsaturados, dando início à peroxidação lipídica que acaba provocando a lise da membrana celular. Este radical pode ser formado *in vivo* através de reações de íons de metais de transição (Fe^{++}) com peróxido de hidrogênio, através da reação de Fenton e de Haber-Weiss (Halliwell, 2006).

O óxido nítrico é normalmente produzido durante a conversão de arginina para citrulina pela enzima óxido nítrico sintetase (Turko, Marcondes & Murad, 2001). O $\cdot\text{ON}$ regula o vasorelaxamento do endotélio por atuar na guanilato ciclase nas células musculares lisas, iniciando uma cascata que leva ao vasorelaxamento (Beckman & Koppenol, 1996; Vasquez-Vivar, Kalyanaraman & Martasek, 2003). O $\cdot\text{ON}$ possui também propriedades antiproliferativas e inibe a adesão vascular de plaquetas e leucócitos (Turko, Marcondes & Murad, 2001).

O $\cdot\text{ON}$ reage com o superóxido, gerando moléculas altamente reativas como ONOO^- , que desencadeiam uma cascata de eventos prejudiciais à célula (Turko, Marcondes & Murad, 2001; Evans et al., 2002). Portanto, a presença de O_2^- determina se $\cdot\text{ON}$ exerce um efeito de proteção ou de prejuízo. Estudos relatam que o aumento de O_2^- possui um papel importante na patogênese da aterosclerose (Stocker & Keaney, 2004). O O_2^- pode inativar o óxido nítrico e diminuir a biodisponibilidade induzindo à disfunção endotelial. Alternativamente, O_2^- pode promover oxidação do cofator da $\cdot\text{ON}$ sintetase, levando a diminuição da produção de $\cdot\text{ON}$ e ao aumento de O_2^- (Vasquez-Vivar, Kalyanaraman & Martasek, 2003). A reação produzida entre O_2^- e $\cdot\text{ON}$ forma uma molécula oxidante forte, que é capaz de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, causando dano às células vasculares (Beckman & Koppenol, 1996; Halliwell, 2006). Finalmente, O_2^- pode provocar modificações oxidativas em lipoproteínas de baixa densidade que possuem um papel importante na formação de lesões ateroscleróticas (Stocker & Keaney, 2004).

A peroxidação lipídica é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este

processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e na pinocitose (Gutteridge & Halliwell, 2000; Halliwell, 2002). No entanto, a peroxidação lipídica também pode ser um indicador de processos deletérios que envolvem a participação de radicais livres, podendo ser utilizado para determinar efeitos citotóxicos (Ohkawa, Ohishi & Yagi, 1979). O estresse oxidativo está implicado na alteração da atividade de muitas enzimas, como a NTPDase 1, essa enzima está sujeita a alterações na sua forma sob condições de estresse oxidativo que levam a inibição da atividade enzimática (Robson et al., 1997; Fürstenau et al., 2004). Os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para evitar o acúmulo de espécies ativas de oxigênio e de seus efeitos deletérios (Halliwell, 1994).

Os sistemas de defesa primários estão relacionados com as enzimas removedoras de radicais livres. A superóxido dismutase remove o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), enquanto que a glutatona peroxidase e a catalase removem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A atividade catalásica é a principal reguladora dos níveis intracelulares de H_2O_2 (Gaetani et al., 1989). Assim, a catalase pode responder às condições que aumentam o estresse oxidativo, aumentando sua atividade (Jorns et al., 1999).

O H_2O_2 , quando presente, reage como o Fe^{+2} ou Cu^{+2} produzindo radicais hidroxil (OH^{\cdot}) altamente reativos, contra o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa (Jorns et al., 1999; Whaieb, 2001). Quando a atividade da superóxido dismutase é baixa, o OH^{\cdot} pode ser produzido a partir de $O_2^{\cdot-}$ pela reação de Haber Weiss (Whaieb, 2001).

Recentemente, vários estudos detectaram a presença de estresse oxidativo em pacientes com doença renal. Existem algumas evidências que indicam que a uremia está relacionada ao estresse oxidativo (Ichikawa, Kiyama & Yoshioka, 1994) e o tratamento de pacientes urêmicos com hemodiálise ou diálise peritoneal contribuiria para o estresse oxidativo e para a redução do nível de antioxidantes nesses pacientes (Toborek et al., 1992; Epperlein, Nourooz-Zadeh & Yayasena, 1998). Existem estudos indicando que a membrana de hemodiálise poderia ativar macrófagos durante as sessões de hemodiálise (Galle & Quaschnig, 2001). Porém, não existe um consenso na literatura sobre o papel da uremia e da diálise sobre o estresse oxidativo.

1.15 Atividade da enzima delta aminolevulinato (d-ALA-D)

A delta aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D, E.C.4.2.1.24) é uma enzima essencial para os organismos aeróbicos, ela participa da via biossintética do heme, catalisando a condensação de duas moléculas de ácido aminolevulínico (δ -ALA) produzindo porforbilinogênio (Gibson, Neuberger & Scott, 1955).

A δ -ALA-D é uma enzima sulfidrílica (Gibson et al., 1955) formada por oito subunidades idênticas apresentando o zinco como cofator (Shemim, 1976; Tsukamoto, Yoshinaga & Sano, 1979). Os resíduos de cisteína são sensíveis a metais pesados (Farina et al., 2003; Nogueira et al., 2003; Perottoni et al., 2005), moléculas de oxigênio e outros agentes oxidantes que induzem a formação de ligações dissulfeto e levam a inibição enzimática (Spencer & Jordan, 1994 e 1995). Trabalhos recentes têm indicado que estados pró-oxidantes, podem causar

inibição da δ -ALA-D *in vivo* (Flora & Seth, 1999; Folmer, Soares & Rocha, 2002; Folmer et al., 2003; Soares, Folmer & Rocha, 2003). Além da insuficiente produção de heme, a inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo do substrato ácido aminoleulínico (δ -ALA) no sangue, que está relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (Monteiro et al., 1989).

O δ -ALA, substrato da enzima δ -ALA-D, sofre enolização e maior oxidação aeróbica na presença de metais em pH fisiológico, produzindo radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) (Oteiza et al., 1995).

Rocha et al. (2003) propuseram um modelo de dano oxidativo que ocorre com a ferritina induzido pelo δ -ALA (Rocha et al., 2003). O δ -ALA é convertido para enol formando (ALA_{enol}) que catalisa o núcleo da ferritina pela presença de fosfato. O enol formado mais o ferro reagem com o oxigênio, produzindo ânion superóxido (O_2^-) e radical (ALA^\cdot), que reduzem o ferro e reagem com o oxigênio produzindo ácido dioxovalérico (DOVA). Enquanto a oxidação do δ -ALA produz ferro livre (Oteiza et al., 1995), o radical ALA e ânion superóxido, diretamente e/ou pela reação Haber-Weiss e Fenton, produzem modificações sítio específicos nos resíduos de triptofano e cisteína na ferritina.

A apoproteína da ferritina é um possível alvo para dano oxidativo catalisado pelo Fe^{2+} induzido pelo δ -ALA, levando a diminuição da habilidade para seqüestrar o ferro. Além da ação do ferro sobre a ferritina, existem estudos que indicam que o fosfato presente na ferritina pode contribuir para a oxidação do δ -ALA, facilitando a sua enolização (deSilva, Guo & Aust, 1993).

A insuficiência renal crônica é uma síndrome metabólica decorrente da perda progressiva, irreversível e geralmente lenta da função dos rins (glomerular, tubular e endócrina). Na doença renal crônica, observa-se uma complexa desordem hemostática (Mezzano et al., 1996), essas alterações podem estar relacionadas a atividade de enzimas que hidrolisam o ATP, o ADP e o AMP, devido à importância desses nucleotídeos no controle da agregação plaquetária e da vasodilação. Observa-se nesses pacientes um quadro inflamatório crônico, com elevação da produção de citocinas. Além disso, estudos indicam que esses pacientes têm uma produção alterada de radicais livres e/ou alterações nos sistemas antioxidantes. O aumento do estresse oxidativo pode influenciar a atividade de algumas enzimas, assim como, a inibição da atividade de algumas enzimas pode exacerbar a produção de radicais livres. Esse estudo pretende ajudar a caracterizar essas alterações e interligar-lás com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos.

2. Objetivos

A alteração na agregação plaquetária em pacientes com insuficiência renal crônica está caracterizada, mas os mecanismos envolvidos não estão completamente elucidados, o presente estudo pretende verificar uma possível relação entre anormalidades hemostáticas e as alterações nas enzimas ectonucleotidases, assim como a relação entre a uremia e a presença de estresse oxidativo, para tanto pretende:

- 1 Verificar a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com insuficiência renal crônica em tratamento pré-dialítico e em tratamento regular de diálise.
- 2 Verificar uma possível relação entre alterações nas ectonucleotidases e a severidade da doença renal crônica.
- 3 Verificar a relação entre o tempo de hemodiálise e a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase.
- 4 Verificar qual é o papel da uremia e da hemodiálise sobre o estresse oxidativo.
- 5 Verificar a relação entre a atividade da enzima δ -ALA-D e a presença de anemia em pacientes com doença renal crônica.

PARTE II

Apresentação dos Artigos

Os resultados obtidos por esse trabalho deram subsídios para a publicação de dois artigos científicos. O primeiro artigo refere-se à atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidases em pacientes com doença renal crônica, e as alterações na agregação plaquetária evidenciadas nesses pacientes, bem como parâmetros bioquímicos. O segundo artigo apresenta as alterações observadas com relação a produção de espécies reativas de oxigênio e a atividade das enzimas catalase e δ -ALA-D.

Capítulo 1:

Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in chronic renal failure:

Relationship between hemostatic defects and renal failure severity

Adriane C. Silva, André L.B. Morsch, Rafael F. Zanin, Máisa C. Corrêa, Luís C.

Arantes, Maria C. Araujo, Vera M. Morsch, Maria R.C. Schetinger, artigo publicado

Biochimica et Biophysica Acta, v. 1741, p. 282 – 288, 2005.

Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in chronic renal failure: Relationship between hemostatic defects and renal failure severity

Adriane C. Silva^a, André L.B. Morsch^a, Rafael F. Zanin^a, Máisa C. Corrêa^a,
Luís C. Arantes^b, Maria C. Araujo^a, Vera M. Morsch^a, Maria R.C. Schetinger^{a,*}

^aDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima,
97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartamento de Nefrologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima,
97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Received 17 November 2004; received in revised form 8 June 2005; accepted 8 June 2005
Available online 27 June 2005

Abstract

The activities of the enzymes NTPDase (E.C.3.6.1.5, apyrase, ATP diphosphohydrolase, ecto-CD39) and 5'-nucleotidase (E.C.3.1.3.5, CD73) were analyzed in platelets from patients with chronic renal failure (CRF), both undergoing hemodialysis treatment (HD) and not undergoing hemodialysis (ND), as well as from a control group. The results showed an increase in platelet NTPDase activity in CRF patients on HD treatment (52.88%) with ATP as substrate ($P < 0.0001$). ADP hydrolysis was decreased (33.68% and 39.75%) in HD and ND patients, respectively. In addition, 5'-nucleotidase activity was elevated in the HD (160%) and ND (81.49%) groups when compared to the control ($P < 0.0001$). Significant correlation was found among ATP, ADP and AMP hydrolysis and plasma creatinine and urea levels ($P < 0.0001$). Patients were compared statistically according to the time of hemodialysis treatment. We found enhanced NTPDase and 5'-nucleotidase activities between 49 and 72 months on HD patients. Our result suggests the existence of alterations in nucleotide hydrolysis in platelets of CRF patients. Possibly, this altered nucleotide hydrolysis could contribute to hemostasis abnormalities found in CRF.

© 2005 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Chronic renal failure; NTPDase; 5'-nucleotidase; Platelet; Hemodialysis

1. Introduction

Hemostatic abnormalities are commonly encountered in patients with renal failure. Both a bleeding diathesis and the uremic prothrombotic state may be caused by renal disease [1]. Abnormalities of platelet function and platelet-endothelial interactions are probably the major cause of hemostatic failure in uremia [2,3]. Impaired platelet aggregation in response to different agonists has been described [4]. Diminished platelet aggregation in platelet-rich plasma (PRP) induced by ADP, collagen, arachidonic acid and ristocetin in uremic patients when compared to healthy volunteers [5] has also been observed.

Platelets are known to play a major role in the maintenance of endothelial integrity and hemostasis and they adhere to sites of vascular injury, undergo activation, and subsequently release ADP, thromboxane A₂, serotonin and several other biologically active substances. ADP, acting through P2 receptors [6–8], from this release may be responsible for the activation, recruitment, and induction of aggregation of additional platelets in the microenvironment [6]. Thus, the metabolism of ADP in the blood is important for the regulation of platelet functions [9].

NTPDase (E.C.3.6.1.5, ecto-CD39, ecto-apyrase, ATP diphosphohydrolase) is a glycosylated extracellular enzyme that hydrolyzes extracellular adenosine tri- and diphosphate (ATP, ADP) to adenosine monophosphate (AMP), which is subsequently converted into adenosine by 5'-nucleotidase (E.C.3.1.3.5, CD73) [10–13]. This enzyme was characterized by Pilla et al. [13] on human blood platelets, as

* Corresponding author. Fax: +55 5522 08031.

E-mail address: mariarosa@smail.ufsm.br (M.R.C. Schetinger).

hydrolyzing the nucleosides ATP and ADP equally well [11–15]. In the coagulation cascade NTPDase (CD39), and ecto-5'-nucleotidase (CD73) have an important role in the regulation of platelet aggregation. Published studies [8,11–14] have shown that CD39 inhibits platelet aggregation via two mechanisms: first by scavenging ATP and/or ADP, and secondly by favoring the eventual formation of the anti-aggregatory metabolite adenosine by 5'-ectonucleotidase activity. Recent publications reinforce the growing importance of NTPDase in thromboregulation [15–19]. Furthermore, there are conclusive lines of evidence showing that CD39 could be a potential therapeutic agent for the inhibition of platelet-mediated thrombogenesis [15–18]. It is also interesting to point out that, ATP and ADP levels in CD39 knockout mice were not changed compared to control [20], suggesting that, at least on macro biochemical level, CD39 does not contribute too much to overall ATP and ADP metabolism in circulation. However, those mice were prothrombotic, suggesting that probably on micro level of cell–cell interaction, CD39 plays an important role.

Ecto-5'-nucleotidase is a glycoprotein attached to the extracellular face of the plasma membrane of many cell types, including human platelets, by a glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) anchor [21]. A major role of the protein is the extracellular production of adenosine from AMP and the subsequent activation of P1 adenosine receptors [22,23].

Together, NTPDase and 5'-nucleotidase, control the availability of ligands (ATP, ADP, AMP and adenosine) for both nucleotide and nucleoside receptors, and, consequently, the duration and extent of receptor activation [24]. These enzymes may also have a protective function by keeping extracellular ATP/ADP and adenosine levels within physiological levels [25].

The progression of chronic renal failure (CRF) is complicated by a complex of hemostatic disorder, which is clinically expressed by both a bleeding tendency and increased thrombotic risk and whose pathogenesis is still poorly understood. Platelet activation during hemodialysis may be due to many factors, including shear stress, contact activation and agonist activation [26,27]. However, further examination is still needed to elucidate the more precise mechanism of platelet activation during hemodialysis.

The objectives of this study were to explore the relationship between platelet dysfunction in uremia with hemostatic abnormalities and the severity of kidney disease in patients with CRF under conservative treatment (non-dialysed) and hemodialysis treatment. Besides the fact that the NTPDase activity measured on platelets is low compared to that of the endothelial cells and leucocytes, we used platelets because they are intrinsically involved in the nucleotide release (mainly ADP). Consequently, platelet NTPDase might contribute directly in the micro extracellular level control of nucleotides and then in the regulation of platelet reactivity. Thus, biochemistry deter-

minations, platelet aggregation, NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelet-rich plasma (PRP) were determined in these patients.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Nucleotides, sodium azide, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and hydroxymethyl-aminomethane (Tris) were purchased from sigma (St. Louis, MO). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Patients

Enzyme activities, biochemical and hematological determinations were determined in the blood and plasma of healthy control subjects (group I), patients on hemodialysis treatment (HD, group II), and patients who do not receive hemodialysis (non-dialysed, ND, group III). The patients were selected from the Department of Nephrology, Hospital of the Federal University of Santa Maria. The study protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria and informed consent was obtained from the patients (Protocol number 037/2004). Group I comprised 60 healthy subjects considered as control (30 women, 30 men) aged 52.28 ± 11.83 (ranging between 30 and 78) with no clinical history of renal disease. Group II (HD) consisted of 51 patients on hemodialysis treatment (25 women, 26 men), whose mean age was 52.58 ± 13.75 (ranging between 24 and 82 years). Etiological causes of uremia included hypertensive nephropathy (8 patients), pyelonephritis (5), glomerulonephritis (5), diabetic nephropathy (5) and cases of unknown etiology (28). All the patients were clinically stable and were undergoing hemodialysis for an average of 4h, three times a week with hollow-fiber dialyzers equipped with cellulose acetate membranes (Baxter, Brazil). During dialysis, blood flow rates were generally between 200 and 300 mL/min. Anticoagulation was achieved by means of a loading dose and constant infusion of heparin. The dose of heparin varied from patient to patient. Blood samples were collected from arteriovenous fistulas before hemodialysis. Group III (ND) comprised 15 patients not undergoing hemodialysis (5 women, 10 men), whose mean age was 54.2 ± 12.48 (ranging between 30 and 70 years). The etiological causes of uremia were hypertensive nephropathy (2 patients), pyelonephritis (6), glomerulonephritis (1), diabetic nephropathy (3) and cases of unknown etiology (3). Patients presenting systemic lupus erythematosus, malignancy, infection, treated with corticosteroids or immunosuppressive drugs were excluded from the study.

2.3. Platelet-rich plasma (PRP) and washed platelet preparation

PRP was prepared from human donors according to Pilla et al. [13]. Briefly, blood was collected with 0.129 M citrate, was pooled and was centrifuged at $160\times g$ for 10 min. The platelet-rich plasma was centrifuged at $1400\times g$ for 15 min and washed twice by centrifugation at $1400\times g$ with 3.5 mM HEPES isomolar buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES isomolar buffer and protein was measured according to Bradford [28]. NTPDase and ecto-5'-nucleotidase are ecto-enzymes and thus platelet viability and integrity were confirmed by the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity using the enzymatic Cobas Integra-400 method (Cobas, Basel, Switzerland).

2.4. Hematological and biochemical determinations

Plasma albumin, creatinine, urea, potassium, inorganic phosphorus, alkaline phosphatase concentration were assayed by spectrophotometric methods, using available commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil), with a Cobas Integra-400 method (Cobas, Basel, Switzerland). Calcium concentrations were measured by ion electrode selective (AVL 9180 Series Electrolyte Analyzer-Diagnostic Roche). Platelet aggregation was determined by the technique of Biggs and Douglass [29] consisting of the in vitro macroscopic visualization of aggregates between intervals of 15 to 180 s by the addition of ADP (2 μg), serotonin (10–200 μM) and purified potato apyrase (0.023 μg) to platelets. Purified potato apyrase was pre-incubated for 15 min before to add ADP or 10–200 μM serotonin.

2.5. NTPDase and 5'-nucleotidase determinations

NTPDase activity was determined by the method of Pilla et al. [13] in a reaction medium containing 5.0 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 50 mM glucose, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, in a final volume of 200 μL . The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 1.0 mM. 5'-nucleotidase was determined by the method of Heymann et al. [30] in a reaction medium containing 10 mM MgCl_2 , 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 μL . For both assays, 6–10 μg of protein was used per tube to ensure linearity in the enzyme reaction. Inorganic phosphate was measured by the method of Chan et al. [31] using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Enzymes activities were expressed as nmol Pi/min/mg of protein.

2.6. Statistical analysis

All data were expressed as the mean value \pm S.D. Data were analyzed using the Duncan's multiple test, and also

subjected to multivariate analysis of variance (ANOVA). Correlation was evaluated with the Pearson test. Differences were considered significant when the probability was $P < 0.05$.

3. Results

The clinical characteristics of the patients are shown in Table 1. The albumin and alkaline phosphatase concentrations were in the normal range in both HD and ND patients. Creatinine and urea were increased ($P < 0.0001$), as expected in both HD and ND patients. Potassium and inorganic phosphorus contents were above the normal range ($P < 0.0001$).

Platelet integrity was determined by comparing the lactate dehydrogenase (LDH) activity obtained after lysis with Triton X-100 with that of intact platelets. Less than 4% of platelets were disrupted (data not shown), indicating that the platelets preparation was predominantly intact. The platelet aggregation induced by ADP was diminished [$F(2,123) = 212.53$, $P < 0.0001$] and post hoc comparisons by Duncan's test revealed that platelet aggregation had a significant reduction in regular hemodialysis treatment (HD) and non-dialyzed (ND) patients compared to control subjects (Table 2). Platelet aggregation induced by 10–200 μM serotonin caused a rapid aggregation, followed by disaggregation in all groups studied (data not shown). In all experiments conducted with apyrase, even in the presence of serotonin and ADP (synergistically inducers of platelet aggregation), the value was higher than 180s, time considered as a limit to visualize aggregation (Table 2).

ATP, ADP and AMP hydrolysis were measured in washed platelets, thus it is very unlikely that they were contaminated with plasma-derived nucleotidases. The results obtained with NTPDase and 5'-nucleotidase are

Table 1
Clinical parameters of the patients

| | Normal range | Control (n=60) | HD (n=51) | ND (n=15) |
|------------------------------|--------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| Creatinine (mg/dL) | 0.4–1.3 | 0.77 \pm 0.19 | 9.16 \pm 3.15* | 2.82 \pm 0.80* |
| Urea (mg/dL) | 15–39 | 27.05 \pm 6.41 | 145.47 \pm 47.50* | 108.40 \pm 49.16* |
| Calcium (mmol/L) | 1.0–1.3 | 1.14 \pm 0.15 | 1.25 \pm 0.14 | 1.21 \pm 0.03 |
| Inorganic phosphorus (mg/dL) | 2.7–4.5 | 3.49 \pm 0.65 | 5.28 \pm 1.84* | 3.52 \pm 0.79 |
| Alkaline phosphatase (U/L) | 26–117 | 83.03 \pm 15.76 | 113.27 \pm 119.56 | 112.50 \pm 40.97 |
| Albumin (g/dL) | 3.5–5.5 | 4.19 \pm 0.47 | 4.02 \pm 0.28 | 4.36 \pm 0.40 |
| Potassium (mmol/L) | 3.5–5.1 | 4.33 \pm 0.52 | 5.43 \pm 0.80* | 4.87 \pm 0.62 |

Values represent mean \pm standard deviation. Different from the control * ($P < 0.0001$) Duncan's multiple range test.

Table 2
Platelet aggregation time obtained from controls, HD and ND patients

| Groups | Control (n=5) | HD (n=5) | ND (n=5) |
|------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| ADP 2 µg | 37 ± 1 ^{Ab} | 49 ± 4 ^a | 60 ± 7 ^a |
| Apyrase+ADP | ↑ 180 | ↑ 180 | ↑ 180 |
| Serotonin 10 µM+apyrase | ↑ 180 | ↑ 180 | ↑ 180 |
| Serotonin 50 µM+apyrase | ↑ 180 | ↑ 180 | ↑ 180 |
| Serotonin 100 µM+apyrase | ↑ 180 | ↑ 180 | ↑ 180 |
| Serotonin 200 µM+apyrase | ↑ 180 | ↑ 180 | ↑ 180 |
| Serotonin 10 µM+apyrase+ADP | ↑ 180 | ↑ 180 | ↑ 180 |
| Serotonin 50 µM+apyrase+ADP | ↑ 180 | ↑ 180 | ↑ 180 |
| Serotonin 100 µM+apyrase+ADP | ↑ 180 | ↑ 180 | ↑ 180 |
| Serotonin 200 µM+apyrase+ADP | ↑ 180 | ↑ 180 | ↑ 180 |

Values represent mean ± standard deviation (n=5). Serotonin concentration varied from 10 to 200 µM, apyrase was 0.0023 µg and ATP was 2 µg per test.

^a Different from the others in the same column ($P < 0.0001$).

^b Different from the others in the same line ($P < 0.01$). Duncan's multiple range test.

shown in Fig. 1. As can be observed, ATP hydrolysis was enhanced [$F(2,120)=25.13$, $P < 0.0001$] and post hoc comparisons by Duncan's test revealed that ATP hydrolysis was significantly higher in hemodialysis patients (52.88%) compared to control subjects. ADP hydrolysis was decreased [$F(2,118)=53.63$, $P < 0.0001$] and post hoc comparisons in hemodialysis patients showed that ADP hydrolysis was significantly lower in patients with HD (33.68%) and ND (39.75%) compared to control subjects. 5'-nucleotidase activity was also altered [$F(2,114)=24.67$, $P < 0.0001$] and post hoc comparisons by Duncan's test revealed that AMP hydrolysis was significantly higher in HD (160%) and ND (81.49%) patients compared to control subjects.

Significant correlation was found between ATP hydrolysis and plasma creatinine level ($r=0.51$, $P < 0.0001$), Fig. 2 (ATP). Similarly, significant correlation coefficients were

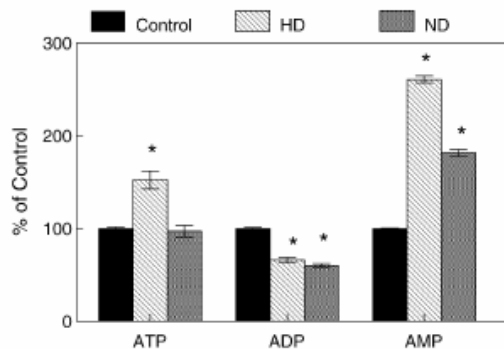


Fig. 1. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets obtained from CRF patients. Control (n=60), hemodialysis patients (HD) (n=51), non-dialyzed patients (ND) (n=15). Control values with ATP (15.97 ± 1.80), ADP (11.22 ± 1.38) and AMP (2.27 ± 0.73) as substrate. Values represent mean ± standard deviation. *Different from the control ($P < 0.0001$) Duncan's multiple test.

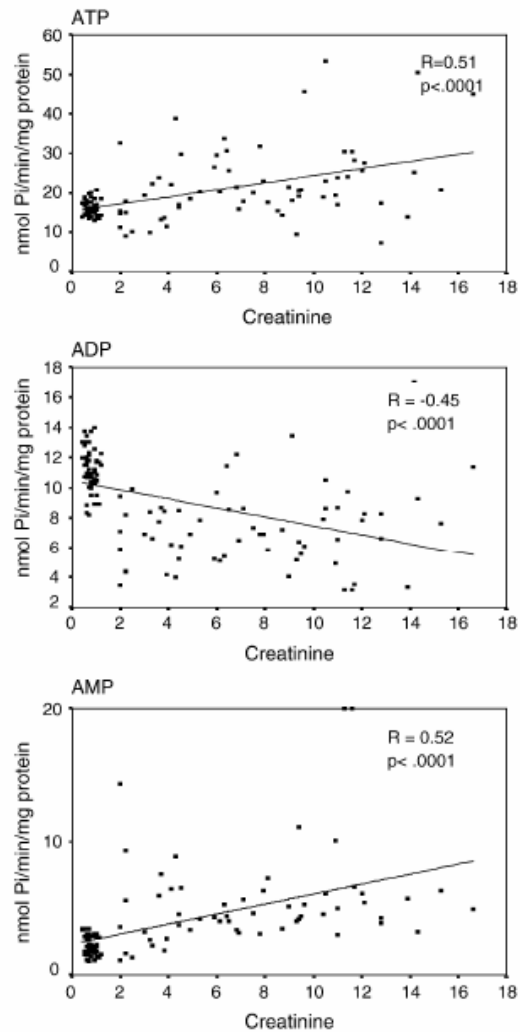


Fig. 2. Pearson's correlation between plasma levels of creatinine and ATP, ADP, AMP hydrolysis in HD, ND and control subjects.

found between plasma creatinine and ADP ($r=0.45$, $P < 0.0001$) and AMP ($r=0.53$, $P < 0.0001$), Fig. 2. In addition an association was found between plasma urea and ATP ($r=0.41$, $P < 0.0001$), ADP ($r=-0.56$, $P < 0.0001$) and AMP hydrolysis ($r=0.44$, $P < 0.0001$), Fig. 3.

ATP hydrolysis was enhanced as a function of length of hemodialysis [$F(5,117)=9.32$, $P < 0.0001$] and post hoc comparisons by Duncan's test revealed that ATP hydrolysis was significantly higher in regular hemodialysis patients being treated from 49 to 72 months (62.97%), Fig. 4 (ATP). Moreover, a decrease can be observed in the hydrolysis of ADP as a function of length of hemodialysis [$F(5,12)=23.10$, $P < 0.0001$] and post hoc comparisons by

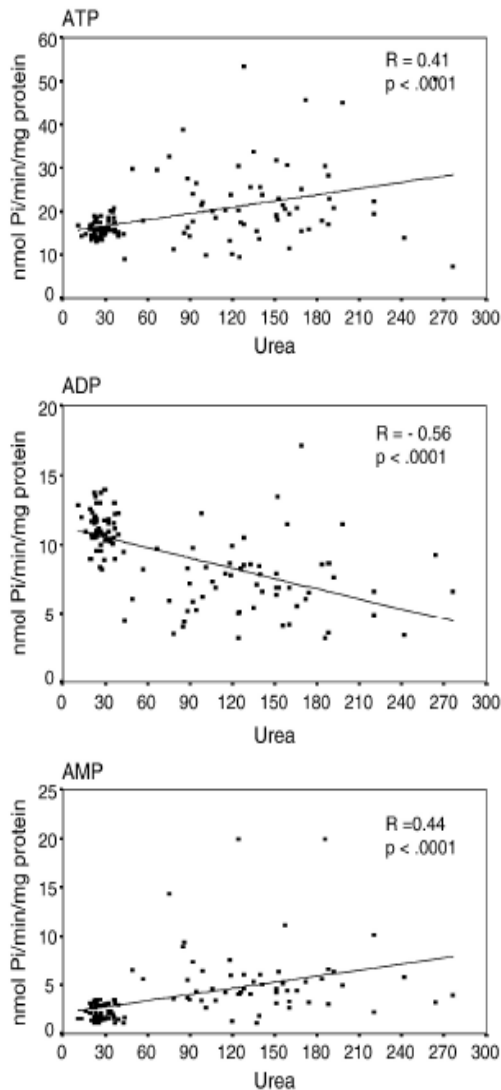


Fig. 3. Pearson's correlation between plasma levels of urea and ATP, ADP, AMP hydrolysis in HD, ND and control subjects.

Duncan's test revealed that ADP hydrolysis was significantly lower in regular hemodialysis patients being treated from 49 to 72 months (30%), Fig. 4 (ADP). Furthermore, an increase was observed in 5'-nucleotidase activity as function of length of hemodialysis treatment [$F(5,1) = 15.67$, $P < 0.0001$] and post hoc comparisons by Duncan's test revealed that AMP hydrolysis was significantly higher in regular hemodialysis patients being treated from 49 to 72 months (121.7%), Fig. 4 (AMP).

4. Discussion

Biochemical parameters obtained from the patients confirmed their clinical condition. As expected, creatinine

and urea levels were elevated in both HD and ND groups. In relation to platelet function, it was observed that HD and ND patients presented a lower platelet aggregation capacity induced by ADP when compared to the control group (Table 2). These results are in agreement with Malyszko et al. [5] and indicate a more delayed aggregation response. As expected, the presence of purified apyrase enhanced the aggregation time to values higher than 180s, confirming its activity as an antithrombotic agent, even when platelets were co-stimulated with ADP and 10–200 μM serotonin (Table 2).

Here, for the first time, we have shown that platelet ATP hydrolysis was enhanced in HD patients, conflicting with the reduction of ADP hydrolysis in HD and ND patients. The inhibition of extracellular ADP hydrolysis, as observed in CRF patients, could indicate a decrease in adenosine production from the extracellular ADP breakdown, and an accumulation of ADP, a proaggregatory agent. Perhaps, the increase in the activity of 5'-nucleotidase observed in HD and ND patients could be a compensatory mechanism once it culminates with adenosine production. Considering the results obtained in this study, perhaps the enhancement in

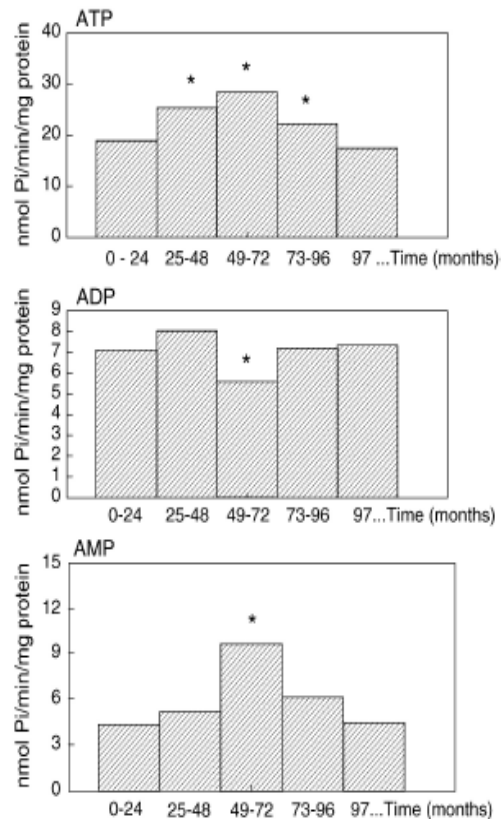


Fig. 4. Effect of hemodialysis length on NTPDase and 5'-nucleotidase activities in hemodialysis patients, ATP, ADP and AMP as substrate. Length hemodialysis in months 0–24, 25–48, 49–72, 73–96, 97 months. Values represent mean \pm standard deviation. *Different from the others $P < 0.0001$ Duncan's multiple test.

ATP hydrolysis demonstrates the presence of other NTPDase (preferentially hydrolyzing ATP).

In the context, the change of the ATP, ADP and AMP hydrolysis observed in the present study is very interesting. Since premature atherosclerosis is one of the most important causes of death at the end-stage of renal failure patients [32,33], and ADP is a signaling molecule, which activates platelet aggregation, we suggest that decreased local ability of platelet to metabolize ADP might result in higher local exposure of platelet P2Y1 receptors to ADP. Possibly, indicating a role of this factor in the etiology of atherosclerosis.

ATP can be an inducer of platelet aggregation because it induces platelet aggregation in the presence of norepinephrine (NE) or epinephrine [34] and it is known that in CRF there is an increase in NE release. Furthermore, ATP can be metabolized to ADP by CD39 and CD39-like enzymes [30]. At the initiation of vascular damage, ATP is hydrolyzed to ADP for ecto-CD39, resulting in platelet aggregation and the prevention of bleeding. Perhaps, the prevention of bleeding is being achieved by the inhibition of ADP hydrolysis. Relating the diminished platelet aggregation induced by ADP (Table 2) with the inhibition of ADP hydrolysis (Fig. 1), one can speculate that there could be a lower cellular response to ADP, as the inhibition of ADP hydrolysis causes an elevation on ADP levels and consequently the expected rapid aggregation response was not observed. Probably, a potential P2Y1 desensitization could occur in the platelets from renal disease patients by the heightened presence of ADP in the microenvironment of platelets from CRF.

The metabolism of extracellular nucleotides is an important regulatory tool to maintain a coagulant state as well as a homeostasis of platelet aggregation. Three main anti-aggregatory systems are involved in the control of platelet reactivity: prostaglandin production, nitric oxide and ecto-nucleotidase activity, respectively. The role of ecto-nucleotidases in platelet aggregation has been known for many years [8–13,35]. Recently, the importance was confirmed in CD39-deficient mice, which had prolonged bleeding times and platelet hypofunction [20]. Under a resting condition, the efficient turnover of ATP and ADP to AMP prevents the onset of an amplification cascade of platelet recruitment and activation induced by ADP and thus the formation of a hemostatic plug. Moreover, ecto-5'-nucleotidase may enhance the role of NTPDase by converting AMP to adenosine, a known inhibitor of platelet aggregation [36]. Recently, platelet altered nucleotide hydrolysis was observed by our laboratory in diabetic, hypertensive, diabetic/hypertensive [19] and breast cancer patients [37], suggesting that it could be an important physiological and pathological parameter.

In our study, we found that plasma creatinine and urea levels were positively correlated with ATP and AMP hydrolysis and negatively correlated with ADP hydrolysis. We then speculated that changes in NTPDase and 5'-

nucleotidase activities could play a role in the accelerated atherosclerosis and increased thrombotic risks of uremic patients, which correlates with the accumulation of metabolites.

We found enhanced ATP and AMP hydrolysis mainly between 25–96 and 49–72 months of hemodialysis treatment, respectively. After 97 months of hemodialysis, there is no change in nucleotide hydrolysis, indicating a normalization of such activities.

Ours results suggest the existence of defects in nucleotide hydrolysis in platelets, which might contribute to abnormal homeostasis in renal failure patients, thus contributing to the enhanced risk of thromboembolic complication and accelerated atherosclerosis in patients with renal failure. However, ours is the first study to investigate NTPDase and 5'-nucleotidase activity in CRF patients and more studies are necessary to elucidate the altered level of nucleotides in CRF patients.

Acknowledgements

The authors wish to thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- [1] M.M. Bem, Coagulation and coagulopathies in patients with renal disease, in: M.M. Bem (Ed.), *Urinary Tract Bleeding: Diagnosis and Control by Medical, Radiologic and Surgical Techniques*, Futura Publishing Co., Inc., Mount Kisco, NY, 1985, pp. 1–35.
- [2] W.G. Hocking, Hematologic abnormalities in patients with renal disease, *Hematol/Oncol. Clin. North Am.* 1 (1987) 229–260.
- [3] A.C. Carvalho, Acquired platelet dysfunction in patients with uremia, *Hematol/Oncol. Clin. North Am.* 4 (1990) 129–143.
- [4] G. DiMinno, J. Martínez, M. McKean, J. De La Rosa, J.F. Burke, S. Murphy, Platelet dysfunction in uremia. Multifaceted defect partially corrected by dialysis, *Am. J. Med.* 79 (1985) 552–559.
- [5] J. Malyszko, J.S. Malyszko, D. Pawlak, K. Pawlak, W. Buczek, M. Mysliwiec, Hemostasis, platelet function and serotonin in acute and chronic renal failure, *Thromb. Res.* 83 (1996) 351–361.
- [6] A.J. Marcus, M.J. Broekman, J.H.F. Drosopoulos, N. Islam, D.J. Pinsky, C. Sesti, R. Levi, Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 305 (2003) 9–16.
- [7] M. Cattaneo, A. Lecchi, M. Ohno, B.V. Joshi, P. Besada, S. Tchilibon, R. Lombardi, N. Bischofberger, T.K. Harden, K.A. Jacobson, Anti-aggregatory activity in human platelets of potent antagonists of the P2Y₁ receptor, *Biochem. Pharmacol.* 68 (2005) 1995–2002.
- [8] N.J. Cusack, S.M.O. Hourani, Platelet P2 receptors: from curiosity to clinical targets, *J. Auton. Nerv. Syst.* 81 (2000) 37–43.
- [9] A.J. Marcus, M.J. Broekman, J.H.F. Drosopoulos, N. Islam, D.J. Pinsky, C. Sesti, R. Levi, Heterologous cell–cell interactions: thromboregulation: inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD39/ecto-ADPase: significance for occlusive vascular disease, *Ital. Heart J.* 2 (2001) 824–830.
- [10] K. Poelstra, J.W. Baller, M.J. Hardonk, W.W. Bakker, Demonstration

- of antithrombotic activity of glomerular adenosine diphosphatase, *Blood* 78 (1991) 141–148.
- [11] E. Kaczmarek, K. Koziak, J. Sévigny, J. Siegel, J. Anrather, A. Beaudoin, F. Bach, S. Robson, Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 33116–33122.
- [12] S.C. Robson, E. Kaczmarek, J.B. Siegel, D. Candinas, K. Koziak, M. Millan, W.W. Hancock, F.H. Bach, Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 153–163.
- [13] C. Pilla, T. Emanuelli, S.S. Frassetto, A.M.O. Battastini, R.D. Dias, J.J.F. Sarkis, ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets, *Platelets* 7 (1996) 225–230.
- [14] M. Handa, G. Guidotti, Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218 (1996) 916–923.
- [15] D.J. Pinsky, M.J. Broekman, J.J. Peschon, K.L. Stocking, T. Fujita, R. Ramasamy, E.S. Connolly Jr., J. Huang, S. Kiss, Y. Zhang, T.F. Choudhri, R.A. McTaggart, H. Liao, J.H.F. Drosopoulos, V.L. Price, A.J. Marcus, C.R. Maliszewski, Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/octoprase in the ischemic brain, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1031–1040.
- [16] J. Sévigny, C. Sundberg, N. Braun, O. Guckelberger, E. Csizmadia, I. Qawi, M. Imai, H. Zimmermann, S.C. Robson, Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation, *Blood* 99 (2002) 2801–2809.
- [17] R.B. Gayle III, C.R. Maliszewski, S.D. Gimpel, M.A. Schoenborn, R.G. Caspary, C. Richards, K. Brasel, V. Price, J.H.F. Drosopoulos, N. Islam, T.N. Alyonycheva, M.J. Broekman, A.J. Marcus, Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 1851–1859.
- [18] A. Ramamurthi, R.S. Lewis, S.C. Robson, Effects of nitric oxide (NO) and soluble nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) on inhibition of platelet deposition in vitro, *Thromb. Res.* 102 (2001) 331–341.
- [19] G. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello, A. Morsch, V.M. Morsch, C.M. Mazzanti, M.R.C. Schetinger, Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies, *Thromb. Res.* 109 (2003) 89–94.
- [20] K. Enjyoji, J. Sévigny, Y. Lin, P.S. Frenette, P.D. Christie, J.S. Am Esch II, M. Imai, J.M. Edelberg, H. Rayburn, M. Lech, D.L. Beeler, E. Csizmadia, D.D. Wagner, S.C. Robson, R.D. Rosenberg, Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation, *Nat. Med.* 5 (1999) 1010–1017.
- [21] H. Zimmermann, Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature, *Drug Dev. Res.* 52 (2001) 44–56.
- [22] H. Zimmermann, Extracellular purine metabolism, *Drug Dev. Res.* 39 (1996) 337–352.
- [23] H. Zimmermann, N. Braun, Ecto-nucleotidases-molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system, *Prog. Brain Res.* 120 (1999) 371–385.
- [24] W. Chen, G. Guidotti, Soluble apyrase release ADP during ATP hydrolysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 (2001) 90–95.
- [25] H.J. Agteresch, P.C. Dagnelie, J.W. Van Den Berg, J.L. Wilson, Adenosine triphosphate; established and potential clinical applications, *Drugs* 58 (1999) 211–232.
- [26] R.E. Lynch, R.H. Bosl, A.J. Streifel, C.M. Kjellstrand, Dialysis thrombocytopenia: parallel plate vs. hollow-fiber dialyzers, *Trans. - Am. Soc. Artif. Intern. Organ.* 24 (1978) 704–708.
- [27] E.F. Leonard, C. Van Vrooren, D. Hauglustaine, S. Haumont, Shear rate induced formation of aggregates during hemodialysis, *Contrib. Nephrol.* 36 (1983) 34–45 (Basel, Karger).
- [28] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [29] R. Biggs, A.S. Douglass, The thromboplastin generation test, *J. Clin. Pathol.* 6 (1953) 23–29.
- [30] D. Heymann, M. Reddington, G.M. Kreutzberg, Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain, *J. Neurochem.* 43 (1984) 971–978.
- [31] K. Chan, D. Delfret, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375–380.
- [32] O. Ifudu, Care of patients undergoing hemodialysis, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 1054–1062.
- [33] S. Pastan, J. Bailey, Dialysis therapy, *N. Engl. J. Med.* 338 (1998) 1428–1437.
- [34] A.V. Birk, E. Leno, H.D. Robertson, V.M. Bolotina, H.H. Szeto, Interaction between ATP and catecholamines in stimulation of platelets aggregation, *Am. J. Physiol.* 284 (2003) H619–H625.
- [35] G.I. Lunkes, D.S. Lunkes, V.M. Morsch, C.M. Mazzanti, A.L. Morsch, V.R. Miron, M.R.C. Schetinger, NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 65 (2004) 1–6.
- [36] Y. Kawashima, T. Nagasawa, H. Ninomiya, Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells, *Blood* 96 (2000) 2157–2162.
- [37] M.C. Araújo, J.B.T. Rocha, A. Morsch, R. Zanin, R. Bauchspiess, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, Enzymes that hydrolyze nucleotides in platelets from breast cancer patients, *Biochem. Biophys. Acta* 1740 (2005) 421–426.

Capítulo 2 :

Oxidative stress and δ -ALA-D activity in chronic renal failure patients.

Adriane C. da Silva, André L. B. Morsch, Rafael F. Zanin, Rosilene Kaizer, Luís C.

Arantes, Luís A. Silva, Vera M. Morsch, João B.T. Rocha, Maria R.C. Schetinger.

Artigo publicado pelo periódico Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 61, p. 180-

185, 2007.

Original article

Oxidative stress and δ -ALA-D activity in chronic renal failure patients

Adriane C. da Silva^a, João B.T. Rocha^a, André L.B. Morsch^a, Rafael F. Zanin^a,
Rosilene Kaizer^a, Paula Acosta Maldonado^a, Luís C. Arantes^b, Luís A. Silva^b,
Vera M. Morsch^a, Maria R.C. Schetinger^{a,*}

^a Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria,
Av. Roraima, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Departamento de Nefrologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria,
Av. Roraima, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Received 3 August 2006; accepted 14 December 2006
Available online 21 February 2007

Abstract

In this paper, we studied the influence of uremia and hemodialysis on oxidative parameters and δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in control subjects, patients with chronic renal failure (CRF) on hemodialysis treatment (HD) and in patients not undergoing hemodialysis (ND). An increased lipid peroxidation was observed in the serum of HD and ND patients, as measured by the MDA serum levels. However, the level of MDA from erythrocytes was only elevated in HD patients. Blood catalase activity was increased in HD and ND groups. This study also showed a decreased activity of blood δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) in both groups of patients. This study demonstrated a positive correlation between ALA-D activity and hemoglobin, suggesting that inhibition of this enzyme might enhance anemia in CRF. A negative correlation was found between the alteration in δ -ALA-D activity and oxidative stress, which may indicate that the inhibition of ALA-D can be used as an index of oxidative stress.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Chronic renal failure; Oxidative stress; Catalase; δ -Aminolevulinic acid dehydratase; Lipid peroxidation; Uremia

1. Introduction

Evidence supports the hypothesis that reactive oxygen species are involved in the pathophysiology of uremic complications [1] and can be an important factor contributing to the pathogenesis of atherosclerosis in chronic renal failure [2]. In line with this, dialysis stimulates reactive oxygen production *in vitro* and *in vivo* [1–5] and is associated with increased serum concentrations of markers of lipid peroxidation [6,7], impairment of the antioxidant system [8], endothelial dysfunction [9] and increased oxidation of proteins [10]. A further source of increased oxidative stress in this pathology may be related to iron overload [11]. Iron supplementation is often indicated in the end-stage of renal failure to treat hemodialysis-associated

anemia [12], which is related to inadequate production of endogenous erythropoietin [13,14]. However, there is still a debate in the literature regarding the sources and mechanisms of elevated oxidative damage. Some authors assert that dialysis treatment is the main source of increased oxidative damage in patients with end stage renal disease [8–10], whereas other researchers maintain that the disease itself is the main reason for the elevated oxidative stress [15,16].

δ -Aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D), also known as porphobilinogen synthase (PBGs, EC 4.2.1.24), catalyzes the asymmetric condensation of two molecules of 5-aminolevulinic acid to produce porphobilinogen, which is the precursor of porphyrins [17,18]. The inhibition of ALA-D may unfavorably affect the heme biosynthesis pathway that, in turn, may have pathological consequences [19,20], such as anemia. Furthermore, the accumulation of ALA-D substrate 5-aminolevulinic acid may be implicated in the overproduction of active oxygen

* Corresponding author. Fax: +55 55 3220 8978.

E-mail address: mariaschetinger@gmail.com (M.R.C. Schetinger).

species [21–23]. In line with this, data from our group have indicated that ALA-D activity is decreased in situations associated with oxidative stress [24,25].

The aim of the present study was to investigate the effect of chronic renal failure on oxidative stress and ALA-D activity in patients both on regular hemodialysis treatment and not undergoing hemodialysis.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

5'-aminolevulinic acid, 2-Thiobarbituric acid, dithiothreitol (DTT), albumin and Coomassie were purchased from Sigma (St. Louis, USA). All other chemicals used in this study were of the highest purity available.

2.2. Patients

Blood samples were obtained from the Department of Nephrology, University Hospital of Santa Maria. A study protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria (protocol number: 037/2004), and informed consent was obtained from all the patients. Group I comprised 60 healthy control subjects (30 women, 30 men) with 52.28 ± 11.83 years of age (ranging between 30 and 78 years) with no clinical history of renal diseases or another pathologies. Group II (HD) consisted of 51 CRF patients on hemodialysis treatment (25 women, 26 men), whose mean age was 52.58 ± 13.75 (ranging between 24 and 82 years). All the patients were clinically stable and were undergoing hemodialysis for an average of 4 h, three times a week with hollow-fiber dialyzers equipped with cellulose acetate membranes (Baxter Laboratories, IL). During the dialysis, the blood flow rate was generally between 200 and 300 ml/min. Anticoagulation was achieved by means of a loading dose and constant infusion of heparin. The dose of heparin varied from patient to patient. Blood samples were collected from arterovenous fistulas before hemodialysis.

Group III (ND) comprised 15 CRF patients not undergoing hemodialysis (5 women, 10 men), whose mean age was 54.2 ± 12.48 (ranging between 30 and 70 years). Patients having systemic lupus erythematosus, malignancy, infection, or being treated with corticosteroids, or immunosuppressive drugs were excluded from this study.

2.3. Hematological and biochemical determinations

Blood used for MDA quantification were collected with EDTA, whereas citrate and heparin were used as anticoagulant agents for catalase and ALA-D assays, respectively. Plasma creatinine and urea were determined by spectrophotometry, using commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil), in a Cobas Mira plus chemistry analyzer (Diagnostic Roche). Hemoglobin (Hb) and hematocrit (Hct) were determined in Cobas Micros system, (Hematology Analyzer, Roche Diagnostics).

Transferrin and iron determinations were done using the nephelometric method (Dimension RXL). Ferritin and parathormone (PTH) concentrations were measured by the chemiluminescence method utilizing Immulite 2000 apparatus.

2.4. Lipid peroxidation

The malondialdehyde (MDA) levels in serum were determined by the method described previously by Jentzsch et al. [26]. An aliquot (0.2 mL) of serum was added to 0.250 mL of 0.11 mol/L 2-thiobarbituric-acid and 1 mL of 0.2 M phosphoric acid. The mixture was heated at 90 °C for 45 min and read at 532 nm. The results were expressed as nmol MDA/ml of serum. MDA in erythrocytes was determined by the method of Jentzsch et al. [26] with some modifications. Briefly, 0.5 mL of blood was treated with 0.5 mL of 40% TCA and centrifuged at $1700 \times g$ for 10 min. Then, 0.25 mL of the supernatant was incubated with 0.6 mL phosphoric acid 1% and 0.6 mL TCA 0.6% for 60 min at 100 °C. MDA levels were measured at 532 nm and expressed as nmol MDA/Hb.

2.5. Catalase activity

Catalase activity was measured as described previously by Nelson and Kiesow [27]. This assay involves the change in absorbance at 240 nm due to the catalase dependent decomposition of H_2O_2 . An aliquot (20 μ L) of blood was mixed with potassium phosphate buffer 50 mM, pH 7.0, and 70 μ L of 30 mM H_2O_2 was added to each sample. The change in absorbance at 240 nm was measured for 2 min and the slope of the curve at linearity was calculated. Data are expressed as $\Delta E/mg$ protein/min.

2.6. δ -ALA-D activity

δ -ALA-D activity was assayed according to the method of Sassa [28], by measuring the rate of product formation (porphobilinogen), except that 84 mM of potassium phosphate buffer, pH 6.4, and 2.0 mM of ALA were used. Incubations were carried out for 1 h at 37° in the presence and absence of the reducing agent dithiothreitol (2 mM DTT). All experiments were carried out after 10 min of pre-incubation with the biological sample. The reaction was started by adding ALA to the assay. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 M^{-1}$ for the Ehrlich-porphobilinogen salt.

2.7. Protein determination

Protein was measured according to Bradford [29] using bovine serum albumin as standard.

2.8. Statistical analysis

All data were expressed as the mean value \pm SEM. Data were analyzed using multivariate analysis of variance

(ANOVA) and the post-hoc comparisons were done using Duncan's multiple test. Correlation was evaluated with the Pearson test. Differences were considered significant when the probability was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Clinical condition of the patients

The clinical characteristics of the patients are shown in Table 1. Iron levels were in the normal range in both HD and ND patients. Creatinine, urea, ferritin and PTH were higher, whereas hematocrit and hemoglobin were lower in HD and ND patients than in control subjects. Transferrin was in the normal range only in HD patients.

3.2. Lipid peroxidation

Serum ($p < 0.0001$) and erythrocytic MDA levels ($p < 0.0001$) in HD patients were significantly higher than those found in the control group (Figs. 1 and 2). In ND patients, serum MDA levels were higher than in controls subjects, whereas the erythrocytic levels were similar to those of the control group (Figs. 1 and 2).

3.3. Catalase activity

Catalase activity was significantly higher in HD and ND patients than in controls subjects ($p < 0.0001$, Fig. 3).

3.4. ALA-D activity

Blood δ -ALA-D activity in HD and ND patients was significantly lower when compared to the control group $p < 0.0001$ (Fig. 4). The involvement of cysteinyl groups in δ -ALA-D inhibition was examined by testing the effect of dithiothreitol (DTT) on the enzyme. Addition of DTT (2.0 mM) to the assay mixture caused a 55% increase in δ -ALA-D activity in all groups.

ALA-D activity correlated positively with hemoglobin content (r values in the range of 0.42 and 0.55) measured either in

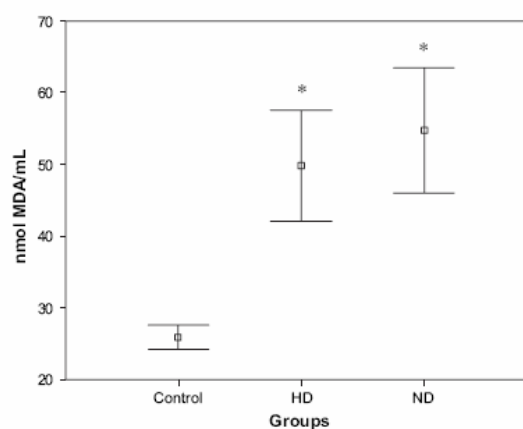


Fig. 1. Serum MDA in control, HD and ND groups. Results are expressed as means \pm SE, control ($n = 60$), HD ($n = 51$), ND ($n = 15$). *Significant differences ($p < 0.0001$) as assessed by Duncan's multiple test.

the presence or absence of DTT (Fig. 5). In contrast, ALA-D correlated negatively with creatinine (data not shown), urea (data not shown), TBARS and CAT activity with r values ranging from $r = -0.45$ to -0.63 (Fig. 6).

4. Discussion

This study clearly showed a strong relationship between oxidative stress parameters, ALA-D and chronic renal failure. Biochemical and hematological data from HD and ND patients were within the expected range for their clinical condition. Iron has long been thought to catalyze the formation of the highly reactive hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) radical via the Fenton reaction. This radical can initiate lipid peroxidation by abstracting a hydrogen atom from membrane phospholipids [30,31].

Lipid peroxidation is a hallmark of oxidative stress, which disrupts the structural integrity of cell membranes and can also lead to the formation of aldehydes, which in turn damage lipids, protein, and DNA. Indeed, lipid peroxidation was accelerated in both plasma [32,33] and erythrocytes [34,35] of

Table 1
Clinical parameters of control, HD and ND groups

| | Normal Range | Control ($n = 60$) | HD ($n = 51$) | ND ($n = 15$) |
|---------------------------------|--|--|---|---|
| Urea (g/dL) | 0.4–1.3 | 0.77 \pm 0.19 | 9.16 \pm 0.44* | 2.82 \pm 0.21* |
| Creatinine (g/dL) | 15–39 | 27.05 \pm 0.82 | 145.47 \pm 6.65* | 108.40 \pm 12.69* |
| Hb (g/dL) | Men 16.6 \pm 2.5 Women 15.3 \pm 2.5 | 14.80 \pm 0.12 13.44 \pm 0.12 | 10.98 \pm 0.32* 10.19 \pm 0.36* | 12.28 \pm 0.89* 12.18 \pm 1.39* |
| Hct% | Men 46 \pm 7 Women 41 \pm 6 | 43.48 \pm 0.59 40.68 \pm 0.44 | 32.99 \pm 0.84* 30.68 \pm 1.09* | 36.59 \pm 2.48* 36.60 \pm 4.11* |
| Transferrin ($\mu\text{g/L}$) | 250–450 | 324.70 \pm 9.92 | 224.76 \pm 6.53* | 321.48 \pm 3.00 |
| Iron ($\mu\text{g/dL}$) | 35–150 | 70.50 \pm 3.07 | 67.52 \pm 3.91 | 61.20 \pm 10.09 |
| Ferritin (ng/dL) | Men 30–323 Women 12–150 | 136.20 \pm 15.23 82.69 \pm 9.20 | 620.40 \pm 115.14* 593.83 \pm 68.53* | 225.55 \pm 50.84* 512.75 \pm 207.22* |
| PTH (pg/mL) | 12–72 | 42.38 \pm 2.21 | 132.41 \pm 18.44* | 321.48 \pm 205.21* |

Values represent mean \pm standard error of mean. Different from control * ($p < 0.0001$) Duncan's multiple range test.

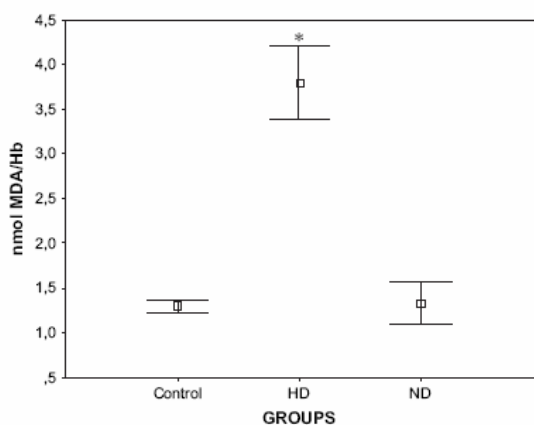


Fig. 2. MDA in erythrocytes of control ($n = 60$), HD ($n = 51$) and ND ($n = 15$) groups. Results are expressed as means \pm SE nmol MDA/Hg. *Significant differences ($p < 0.0001$) as assessed by Duncan's multiple test.

patients on regular hemodialysis treatment, characterized by elevated levels of MDA. In our work, serum TBARS levels were higher in HD and ND, when compared to control group. In erythrocytes, there was only a significant increase in MDA levels in HD patients, when compared with the ND and control group. These results suggest that erythrocytes of patients on regular hemodialysis treatment were more susceptible to oxidative stress than the non-dialysed patients. This probably can not be attributed only to the injury caused by the hemodialysis process, as several instances of evidence have demonstrated that CRF patients both treated with and without dialysis exhibited signs of oxidative stress [18,36–39]. Moreover, the hemoglobin content can not explain the differences, because the values were not different between HD and ND patients. We may suggest that enhanced lipid peroxidation could be related to the uremia itself.

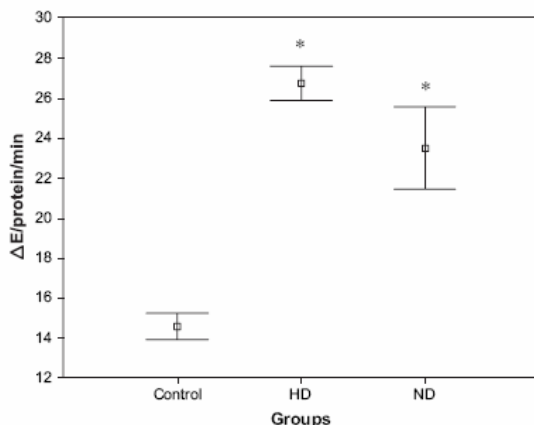


Fig. 3. Effect of uremia on antioxidant enzyme catalase in HD and ND patients, and control group. Control ($n = 60$), HD ($n = 51$) and ND ($n = 15$). *Different from the control $p < 0.0001$ Duncan's multiple test.

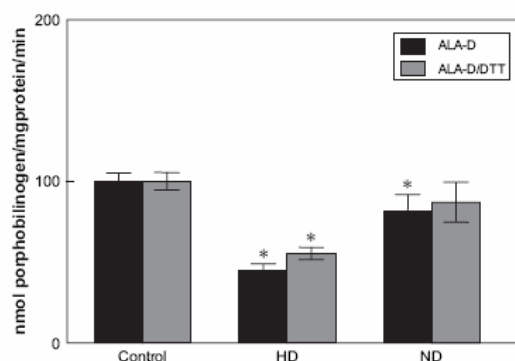


Fig. 4. δ -ALA-D activity in control, HD and ND groups in the absence or presence of 2 mM DTT. Results are expressed as means \pm SE, control $n = 60$, HD $n = 51$, ND $n = 15$. *Significant difference as assessed by Duncan's multiple test.

Altered antioxidant enzyme defense mechanisms seem to be one of the important factors associated with lipid peroxidation [34,35]. In our study, an increased catalase activity was reported in the blood of HD and ND patients, suggesting

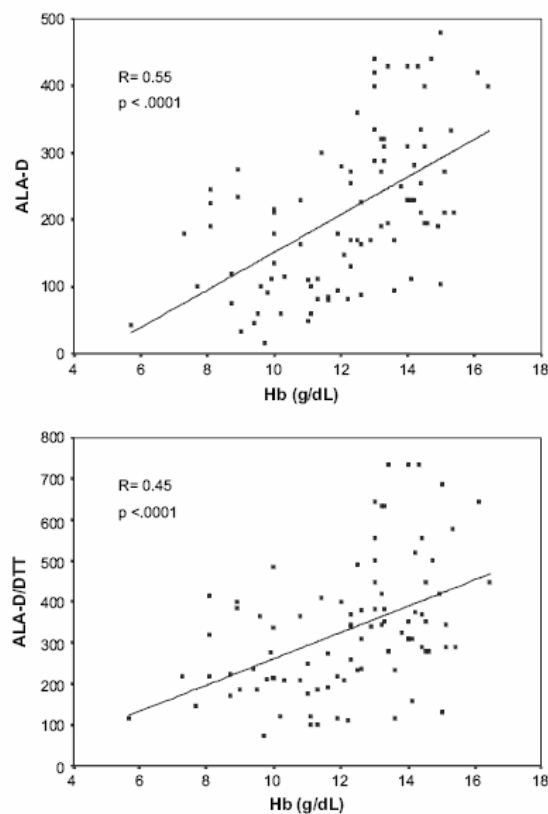


Fig. 5. Pearson's correlation between ALA-D in absence of DTT or presence of DTT and hemoglobin in patients with CRF.

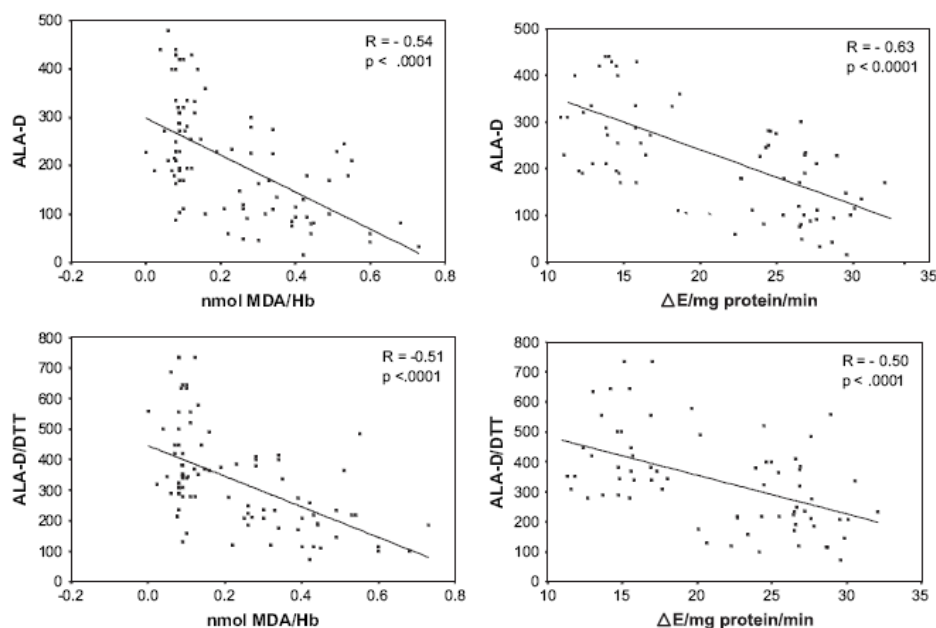


Fig. 6. Pearson's correlation among erythrocytes MDA levels, CATALASE activity with ALA-D enzymatic activity in absence or presence of DTT (2 mM).

that uremia per se could alter the antioxidant system. These results are in agreement with Richards et al. [40], who demonstrated an increase in blood catalase activity. This increased antioxidant enzyme activity would suggest a compensatory mechanism against oxidative stress.

Blood δ -ALA-D activity in HD and ND patients was significantly lower than that of the control group. δ -ALA-D activity in the absence/presence of DTT was negatively correlated with creatinine and urea levels (data not show). These results may suggest that the accumulation of these metabolites could promote enzyme inhibition. Moreover, the results demonstrated a positive correlation between δ -ALA-D activity and hemoglobin, showing the fundamental role of this enzyme in heme biosynthesis and the development of anemia in CRF patients. Reactive oxygen species produced in CRF can oxidize critical thiol groups located inside the active site of mammalian δ -ALA-D [41–44], inactivating enzyme activity as observed here. Finally, δ -ALA-D inhibition can result in ALA accumulation, which, under physiologically relevant conditions, can have pro-oxidant effects [21] and contribute to oxidative stress caused by uremia.

In conclusion, in this work, we showed that uremia itself could be the principal factor in generating oxidative stress in CRF patients. Besides this, the inhibition of ALA-D activity is positively correlated with hemoglobin levels, and consequently related with anemia and the low hematocrit levels found in the patients. These findings may contribute to the consideration of the existence of a decreased efficiency of the cellular defense mechanism against reactive oxygen species, leading to lipid peroxidation. Thus, we can suggest that

in CRF patients, a significant alteration in antioxidant defenses can lead to alterations in heme synthesis by inhibiting ALA-D activity and accumulating ALA, reinforcing this destructive cycle.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq, FAPERGS, CAPES and the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

References

- [1] Rigatto C, Singal PK. Oxidative stress in uremia: impact on cardiac disease in dialysis patients. *Semin Dialysis* 1999;12:91–6.
- [2] Loughrey CM, Young IS, Lightbody JH, McMaster PT, McNamee ER, Trimble QJ. Oxidative stress in haemodialysis. *Q J Med* 1994;87:679–83.
- [3] Foley RN, Parfrey PS, Samack MJ. Cardiovascular diseases in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1998;32(Suppl. 3):S112–9.
- [4] Kuwahara T, Market M, Wauters JP. Neutrophil oxygen radical production by dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant* 1988;3:661–5.
- [5] Nguyen AT, Lethias C, Zingraff J, Herbelin A, Naret C, Descamps-Latscha B. Hemodialysis membrane-induced activation of phagocyte oxidative metabolism detected in vivo and in vitro within microamounts of whole blood. *Blood Kidney Int* 1985;28:158–67.
- [6] Handelman GJ, Walter MF, Adhikarla R, Gross J, Dallal GE, Levin NW, et al. Elevated plasma F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney Int* 2001;59:1960–6.
- [7] Maggi E, Bellazzi R, Falaschi F, Frattoni A, Perani G, Finardi G, et al. Enhanced LDL oxidation in uremic patients: an additional mechanism for accelerated atherosclerosis? *Kidney Int* 1994;45:876–83.

- [18] Miyata T, Kurokawa C, Van Ypersele de Strihou C. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney Int* 2000;58(Suppl. 76):S120–5.
- [19] Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe M, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress: effects of vitamin E-coated dialyzer. *Circulation* 2000;101:1002–6.
- [10] Morane M, Cristol JP, Canaud B. Why are hemodialysis patients in a pro-oxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance. *Blood Purificat* 2000;18:191–9.
- [11] Euchant E, Carbonneau MA, Dubourg L, Thomas MJ, Perromat A, Clerc M. Lipoperoxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing haemodialysis: vitamin A, E and iron status. *Free Radic Biol Med* 1994;16:339–46.
- [12] Loge JP, Lance RD, Moore CV. Characterization of the anemia associated with chronic renal insufficiency. *Am J Med* 1958;24:4–18.
- [13] McGonagle RSR, Wallin JD, Shaddock RK, Fisher JW. Erythropoietin deficiency and erythropoiesis in renal insufficiency. *Kidney Int* 1984;25:437–44.
- [14] Beeliner N, Duffy TP, Abelson HT. Approach to the adult and child with anemia. In: *bu Benz Jr EJ, Shatill SJ, Furtie B, Cohen HJ, Silberstein LE, editors. Hematology: basic principles and practice*. New York: Churchill Livingstone; 1995. p. 980–90.
- [15] Gibson KD, Neuberger A, Scott JJ. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *Biochem J* 1955;230:625–33.
- [16] Barnard GF, Itoh R, Hohberger LH, Shemin D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Possible role of essential thiol groups. *J Biol Chem* 1977;252:8965–74.
- [17] Goering PL. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology* 1993;14L:45–60.
- [18] Sassa S, Fujita H, Kappas A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: *Kotyk A, Skoda J, Paces V, Kostka V, editors. Highlights of modern biochemistry, vol. 1*. Utrecht: VSP; 1989. p. 329–38.
- [19] Bechara EJH, Medeiros MHG, Monteiro HP, Her-mes-Lima M, Pereira B, Demasi M, et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quimica Nova* 1993;16:385–92.
- [20] Monteiro HP, Abdalla DSP, Augusto O, Bechara EJ. Free radical generation during δ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connection with porphyriopathies. *Arch Biochem Biophys* 1989;271:206–16.
- [21] Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJH. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 1992;72:226–30.
- [22] Hirayama A, Nagase S, Gotoh M, Takemura C. Hemodialysis does not influence the peroxidative state already present in uremia. *Nephron* 2000;86:436–40.
- [23] Himmelfarb J, McMenamin ME, Loseto G, Heinecke JW. Myeloperoxidase-catalysed 3-chlorotyrosine formation in dialysis patients. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1163–9.
- [24] Folmer V, Soares JC, Gabriel D, Rocha JBT. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *J Nutr* 2003;133:2165–70.
- [25] Gonçalves TL, Erthal F, Corte CL, Müller LG, Piovezan C, Nogueira CW, et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. *Clin Biochem* 2005;38:1071–5.
- [26] Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski H. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996;2: 251–6.
- [27] Nelson DP, Kiesow LA. Entalp of the composition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C. *Anal Biochem* 1972;49:474–9.
- [28] Sassa S. δ -aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 1982;28: 133–45.
- [29] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:218–54.
- [30] Halliwell B, Gutteridge JMC. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 1985;8: 89–193.
- [31] Halliwell B, Gutteridge JMC. Iron as a biological pro-oxide. *ISI Atlas of Sci Biochem* 1988;1:48–52.
- [32] Siesjo BK, Agardh CD, Bengtsson F. Free radicals and brain damage. *Brain Metab Rev* 1989;1:165–211.
- [33] Kern PA, Fishman RB, Song W, Brown AD. The effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on oxidative enzymes in adipocytes and liver. *Toxicology* 2002;171:117–25.
- [34] Asayama K, Shiki Y, Ito H. Antioxidant enzymes and lipoperoxide in blood in uremic children and adolescents. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:105–9.
- [35] Trznadel K, Pawlicki L, Kedziora J, Luciak M, Blaszczczyk J, Buczynski A. Superoxide anion generation, erythrocytes superoxide dismutase activity, and lipid peroxidation during hemoperfusion and hemodialysis in chronic uremic patients. *Free Radic Biol Med* 1989; 6:393–7.
- [36] Eiselt J, Racek J, Holocek V, Jerabek Z, Opatrny K. Lipid peroxidation and the antioxidant system in bicarbonate hemodialysis and acetate-free biofiltration. *Vnitr Lek* 1995;41:235–9.
- [37] Chauhan DP, Gupta PH, Napoothiri MNR, Singa P, Chugh C, Nair CR. Determination of erythrocyte superoxide dismutase, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, reduced glutathione and malondialdehyde in uremia. *Clin Chim Acta* 1982;123:153–9.
- [38] Chugh SN, Jain S, Agrawal N, Sharma A. Evaluation of oxidative stress before and after hemodialysis in chronic uremia failure. *J Assoc Phys India* 2000;48:981–4.
- [39] Annuk M, Fellstrom B, Akerblom O, Zilmar K, Vihalemm T, Zilmer M. Oxidative stress markers in pre-uremic patients. *Clin Nephrol* 2001;56: 308–14.
- [40] Richard MS, Arnaud J, Jurkovitz C, Hachache T, Meftahi H, Laporte F, et al. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1991;57:10–5.
- [41] Afonso SG, Polo CF, Salamanca RE, Battle AM. Mechanistic studies on uroporphyrin I-induced photoinactivation of some heme-enzymes. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:415–20.
- [42] Emanuelli T, Page FW, Alves LB, Regne A, Souza DO. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain. *Neurochem Int* 2001;38:213–8.
- [43] Douki T, Onuki J, Medeiros MHG, Bechara EJH, Cdet J, Di Mascio P. Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by -5 aminolevulinic acid. *FEBS Lett* 1998;428:93–6.
- [44] Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139–62.

PARTE III

1. Discussão

Nesse estudo, os dados obtidos resultaram de uma análise *in vitro* das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em plaquetas de pacientes com doença renal crônica. As enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase foram analisadas para verificar a participação dos nucleotídeos da adenina na função plaquetária de pacientes com insuficiência renal crônica que realizam hemodiálise e nos pacientes com doença renal crônica que não fazem hemodiálise, mas realizam tratamento conservador. Estes resultados foram comparados com o grupo controle constituído de indivíduos saudáveis de mesma faixa etária. Esse estudo teve por objetivo verificar uma possível relação entre as anormalidades hemostáticas e a severidade da DRC em pacientes que realizam hemodiálise e em pacientes que não realizam hemodiálise. Além disso, verificou-se a influência do tempo que o paciente realiza hemodiálise sobre a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria, resolução nº 196/96.

Também, avaliou-se o papel da uremia e da hemodiálise sobre o estresse oxidativo. Para tanto, foram determinados os níveis de TBARS em soro e em hemácias de pacientes com DRC e a atividade da enzima catalase. Além disso, analisaram-se a relação entre a atividade da δ -ALA-D e a presença de anemia em pacientes com DRC.

Foram realizadas dosagens bioquímicas de: creatinina, uréia, fósforo inorgânico, albumina, cálcio, potássio, transferrina, ferritina, ferro, PTH e dosagens hematológicas da hemoglobina e hematócrito.

1.1 Perfil bioquímico e hematológico

Na análise do perfil bioquímico pode-se afirmar que o grupo controle apresentou determinações bioquímicas dentro dos valores normais quanto a creatinina, uréia, cálcio, fósforo inorgânico, albumina, potássio, transferrina, ferro, ferritina e PTH. Além disso, os dados demonstraram valores normais para a hemoglobina e o hematócrito. Em conjunto, estes dados permitiram utilizar o grupo controle como referência para as análises posteriores.

Os pacientes que realizam hemodiálise (HD) demonstraram valores elevados para creatinina, uréia, fósforo, potássio, transferrina, ferritina e PTH. Este grupo apresenta valores reduzidos para transferrina, hematócrito e hemoglobina. Essas alterações apresentadas condizem com as alterações bioquímicas e hematológicas que normalmente são encontradas nesses pacientes.

Os pacientes que realizam tratamento conservador apresentaram um quadro bioquímico melhor do que o grupo que realiza hemodiálise, demonstrando valores elevados para creatinina e uréia, mas inferiores aos apresentados pelo grupo HD. Apresentaram, também, ferritina elevada, devido à presença de anemia, a qual foi evidenciada pela diminuição da hemoglobina e do hematócrito. O PTH também apresentou valores elevados. Normalmente, as alterações nos níveis de PTH aparecem precoce e progressivamente à medida que a função renal se reduz (Block & Port, 2000). Os pacientes ND apresentaram valores normais para o

fósforo e cálcio. Normalmente, observam-se alterações nesses íons somente em fases bem adiantadas da insuficiência renal crônica (Hsu & Chertow, 2002).

Na doença renal crônica, observam-se mecanismos adaptativos para aumentar a excreção de íon potássio nos néfrons remanescentes e também no intestino. Estes mecanismos têm limite e assim, a hipercalemia será observada quando a filtração glomerular atingir valores menores do que 10 ml/min. Entretanto, a hipercalemia também poderá ocorrer em certas situações em que a redução da filtração glomerular for moderada, ou seja, a FG estiver entre 10 e 60 ml/min. Tais situações podem estar associadas ao consumo de medicamentos que dificultam a eliminação do potássio pelos rins, a ingestão excessiva de íon potássio, a oligúria (diminuição do volume urinário), a lise celular, como ocorrem no caso de convulsões, traumas e hemólise (Kamel et al., 2000). Nesse estudo, o grupo HD apresentou valores elevados para potássio, porém, o grupo ND apresentou valores normais, porque a função renal nesses pacientes não está tão comprometida como no grupo HD.

O tempo de agregação plaquetária apresentou-se alterado nesses pacientes, demonstrando uma baixa capacidade de agregação plaquetária induzida pelo ADP quando comparado ao grupo controle, sendo que esses resultados estão de acordo com estudos prévios (Malyszko et al., 1996). Os resultados demonstraram que a adição de apirase purificada aumentou o tempo de agregação plaquetária, confirmando o papel anti-agregante da apirase, e ainda, a adição de serotonina provocou uma rápida agregação seguida de desagregação. Além disso, em todos os experimentos de agregação plaquetária realizados na presença da apirase, observaram-se valor superior a 180s, considerado um tempo limite para

agregação plaquetária, sendo que tais valores persistiram mesmo na presença de ADP e serotonina.

1.2 Atividade das enzimas NTPDase e 5'- nucleotidase em plaquetas de pacientes com DRC

O grupo controle apresentou valores da atividade da enzima NTPDase, para os substratos ATP e ADP, e da enzima 5'-nucleotidase, para o substrato AMP, dentro de valores previamente estabelecidos (Pilla et al., 1996).

A enzima NTPDase apresentou um aumento na sua atividade para os substrato ATP e uma redução da sua atividade para o substrato ADP em pacientes em programa regular de hemodiálise. Entretanto, os pacientes que realizam tratamento conservador (ND) apresentaram um valor normal de hidrólise para o substrato ATP e uma diminuição na atividade de hidrólise para o substrato ADP. A hidrólise excessiva do ATP pela NTPDase leva a formação de ADP e, juntamente com a inibição da hidrólise do ADP ocasiona um acúmulo de ADP, um agregante plaquetário. Os resultados sugerem que o acúmulo de ADP poderá ser maior em pacientes em HD, isto pode ser atribuído ao papel pontencializador da hemodiálise sobre a agregação plaquetária. Esse acúmulo de ADP pode resultar em ativação dos receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ em plaquetas, possibilitando inferir que esses nucleotídeos estão envolvidos no desenvolvimento precoce de DCV nesses pacientes. O acúmulo de ADP também poderia atuar prevenindo o sangramento que esses pacientes tendem a apresentar devido à uremia elevada.

A hidrólise aumentada do ATP pode estar relacionada também à atividade de outras ATPases que não a NTPDase1. A NTPDase 2 hidrolisa preferencialmente o ATP (Mateo, Harden & Boyer 1999; Kegel et al., 1997), promovendo a agregação plaquetária na presença do ATP e facilitando esse processo na presença do ADP (Sévigny et al., 2002). Sévigny et al. (2002) descreveram o papel das NTPDases em plaquetas e sugerem que a NTPDase1 e 2 provavelmente teriam efeitos opostos sobre a agregação plaquetária. Outra enzima que poderia estar envolvida na hidrólise excessiva do ATP é a NMPP (5'-Nucleosídeo monofosfato fosfoanidrolase fosfodiesterase) descrita por Birk et al. (2001 e 2002). Na presença dessa enzima o ATP é hidrolisado diretamente para AMP e, portanto, teria um efeito anti-agregante, devido a subsequente geração de adenosina. Apesar do acúmulo do ADP o tempo de agregação plaquetária foi estendido nesses pacientes isso pode estar relacionado a dessensibilização dos receptores P2 ou ao aumento de adenosina.

A atividade da enzima 5'-nucleotidase apresentou valores aumentados tanto em pacientes que realizam hemodiálise como em pacientes em tratamento conservador, que não realizam hemodiálise. O aumento da atividade da 5'-nucleotidase promoveu um incremento na hidrólise do AMP, proporcionando uma elevação nas concentrações de adenosina, um conhecido inibidor da agregação plaquetária que atua em receptores A₂ inibindo a atividade do ADP. A adenosina também é conhecida por possuir ação vasodilatadora. Esse aumento da atividade da 5'-nucleotidase pode ser uma resposta fisiológica na tentativa de inibir a agregação plaquetária e manter a vasodilatação (Kawashima, Nagasawa & Ninomiya, 2000).

Apesar do acúmulo do ADP o tempo de agregação plaquetária foi estendido nesses pacientes isso pode estar relacionado a dessensibilização dos receptores P2 ou pode ser atribuído ao aumento de adenosina.

Esse estudo também avaliou a correlação entre o nível de hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, e a concentração sérica de creatinina. Os resultados apresentados demonstraram uma correlação positiva entre o aumento da hidrólise do ATP e do AMP com a concentração de creatinina, e uma correlação negativa entre a hidrólise do ADP e a concentração de creatinina. Também foi realizada uma correlação entre a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP e a concentração sérica de uréia. Foi observada uma correlação positiva entre a hidrólise dos nucleotídeos ATP e AMP e uma correlação negativa com a hidrólise do ADP. Esses resultados permitiram inferir que uma elevação na uremia estaria relacionada com as anormalidades hemostáticas, como demonstrado pela alteração das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase. Assim, a hemodiálise pode ter uma ação secundária sobre a ativação plaquetária.

Para avaliar o papel da hemodiálise na degradação dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP foram comparados o tempo de hemodiálise e os níveis de hidrólise do ATP, ADP e AMP. Observou-se que no período de 25 a 96 meses houve alteração na hidrólise do ATP, sendo que houve um pico de hidrólise no tempo 49-72 meses de hemodiálise. Tais resultados demonstram que o tempo de hemodiálise influenciou na degradação do ATP e que a partir de 96 meses de hemodiálise provavelmente o organismo tenha sofrido uma adaptação. Houve uma diminuição acentuada na hidrólise do ADP no período entre 49-72 meses de tratamento com hemodiálise. Foi observado que esse período condiz com o período em que houve

maior hidrólise do ATP. Ainda, constatou-se que no período de 49-72 meses houve maior hidrólise do AMP. Considerando que os períodos de maiores alterações na atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase são condizentes, pode-se sugerir que em períodos anteriores e posteriores os mecanismos compensatórios estariam provavelmente limitando as anormalidades hemostáticas.

Os pacientes com doença renal crônica, quando comparados à população geral, apresentam maior prevalência de DCV, incluindo doença coronariana, cérebro-vascular, vascular periférica e insuficiência cardíaca (Levey et al., 1998). Alguns estudos demonstraram que o desenvolvimento da DCV é precoce no curso da DRC (Levin et al., 1996; Barrett et al., 1997; Culleton et al., 1999). Além disso, as doenças cardiovasculares constituem a principal causa de óbito nos pacientes com DRC (Shulman et al., 1989; Wannamethee, Shaper & Perry, 1997; Jungers et al., 1999).

Quando comparados à população em geral, os pacientes com DRC apresentaram uma maior prevalência de fatores de risco “tradicionais” para DCV (Levey et al., 1998; Parfrey, 2000). São considerados fatores de risco “tradicionais” aquelas variáveis definidas na população geral através de estudos, que se associam à ocorrência de DCV, tais como a presença de hipertensão e o diabetes mellitus. Outros fatores de risco associados à DCV são relacionados à DRC e foram denominados fatores de risco “não tradicionais”. Estes incluíram anormalidades hemodinâmicas e metabólicas decorrentes da disfunção renal. A prevalência de muitos dos fatores não tradicionais aumenta à medida que a função renal diminui. Entre eles estão a anemia, os distúrbios do metabolismo do cálcio e do fósforo, a hipervolemia, a hiperhomocisteína, a desnutrição, a

inflamação e o aumento do estresse oxidativo (Levey et al., 1998; Parfrey, 2000; Coresh, Wei & Mcquillan, 2001). Os dados encontrados nesse trabalho vêm a acrescentar fatores adicionais que levariam a uma DCV precoce nesses pacientes. Pode-se inferir que tanto uremia como a hemodiálise tem influência nas desordens hemostáticas apresentadas nesses pacientes.

1.3 Estresse oxidativo

Existem muitos estudos descrevendo o papel das espécies reativas de oxigênio sobre o dano renal e a doença DCV precoce nesses pacientes (Annuk et al., 2001; Morena et al., 2005; Zalba, Fortuno & Diez, 2006). As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas em várias alterações em nível renal como: na glomerulonefrite, na falência renal aguda ou progressiva, na nefrite tubulointersticial (Ichikawa, Kiyama & Yoshioka, 1994; Klahr, 1997). Além disso, devido ao impacto sobre a regulação do ciclo celular (Shakelford, Kaufmann & Paules, 2000), as espécies reativas de oxigênio podem contribuir para hipertrofia das células tubulares (Hannken et al., 2000). No sistema vascular, a interação de O_2^- com $\cdot ON$ parece ser muito importante. O papel do $\cdot ON$ na vasodilatação é inativado pela presença de O_2^- (Rubanyi, Romero & Vanhoutte, 1986) e produtos da sua reação ($ONOO\cdot$) favorecendo a formação de mais ROS, tais como $OH\cdot$ (Halliwell, Zhao & Whiteman, 1999). O produto da reação entre O_2^- e $\cdot ON$, o peroxinitrito, trata-se de uma molécula fortemente oxidante, que é capaz de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, causando dano à parede do vaso (Beckman & Koppenol, 1996). As conseqüências para o sistema vascular são as disfunções do endotélio e as alterações na renovação celular (Galle et al., 1995). O O_2^-

facilita modificações oxidativas de proteínas de baixa densidade que têm um papel importante na formação das lesões ateroscleróticas (Galle et al., 1995; Stocker & Keaney, 2004).

A peroxidação lípidica foi determinada em pacientes com DRC, medindo-se o nível de produção de TBARS em soro e em hemácias de pacientes com HD e ND. Os resultados encontrados demonstram aumento dos níveis de TBARS em soro e hemácias de pacientes HD. Já os pacientes ND apresentaram o nível de TBARS alterado somente em soro. Essa diferença pode estar relacionada com o quadro bioquímico mais grave nos pacientes HD. Esses pacientes possuem um quadro urémico mais complicado, com níveis de creatinina e uréia mais elevados que o grupo ND. Conforme dados demonstrados, a alteração do nível de TBARS em hemácias de pacientes HD pode estar correlacionada ao grau de anemia mais grave nesses pacientes que no grupo ND e a alteração na atividade de ALA-D presente nesses pacientes. Espécies reativas de oxigênio podem, parcialmente, explicar a diminuição da sobrevivência das hemácias. Outros trabalhos também relataram uma elevação no nível de MDA, um marcador de peroxidação lipídica (Weinstein et al., 2000) e um severo prejuízo no conteúdo da vitamina E em eritrócitos (Cristol et al., 1997; Gallucci et al., 1999).

A atividade da catalase apresentou-se elevada nos pacientes HD e ND. Esses resultados permitem inferir que essa ativação pode ser um mecanismo compensatório ao elevado nível de estresse oxidativo, conforme já descrito por outros estudos (Richard et al., 1991). Existem evidências sugerindo um aumento das enzimas antioxidantes e da severidade da DRC (Morena et al., 2005). Estudos indicaram que o prejuízo para o sistema enzimático antioxidante é principalmente

devido à uremia, ao passo de que hemodiálise promoveria alterações no nível de estresse oxidativo, principalmente devido a perdas de antioxidantes não enzimáticos no processo de hemodiálise (Morena et al., 2005).

As alterações enzimáticas e não enzimáticas apresentadas nesse trabalho demonstraram um quadro bioquímico que favorece o desenvolvimento de doenças cardiovasculares precoce nesses pacientes como evidenciado pela tendência à agregação plaquetária e à produção de espécies reativas de oxigênio. Esse trabalho permite inferir que a uremia é o principal determinante da elevação do estresse oxidativo apresentado por esses pacientes.

1.4 Atividade da enzima delta aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D)

A atividade da δ -ALA-D apresentou-se diminuída, em ambos os grupos HD e ND e esta inibição leva ao acúmulo de δ -ALA, uma substância que induz ao estresse oxidativo, conforme estudos anteriores (Rocha et al., 2003). Os dados desse trabalho confirmaram a relação entre o acúmulo de δ -ALA e o estresse oxidativo, como observado pela correlação negativa entre a inibição da atividade da δ -ALA-D e o aumento da peroxidação lipídica, e uma correlação também negativa entre a atividade da δ -ALA-D e o aumento da atividade da catalase. O acúmulo do δ -ALA está relacionado ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e pode contribuir para o estresse oxidativo causado pelo quadro urêmico. Esse trabalho também sugere que a uremia pode estar influenciando na alteração da atividade da δ -ALA-D.

Estudo anterior propôs que o acúmulo do substrato δ -ALA é um dos principais responsáveis pelas modificações nos resíduos de triptofano e cisteína na ferritina e o relacionaram também à presença de estresse oxidativo. Esse estudo apresentou também uma correlação entre o acúmulo de δ -ALA e o aumento da ferritina (Rocha et al., 2003). Nossos resultados mostraram que ambos pacientes apresentaram diminuição da δ -ALA-D e nível de ferritina elevado. Esse trabalho indicou, também, uma relação entre a diminuição da atividade da δ -ALA-D e a presença de anemia, demonstrando o papel preponderante da δ -ALA-D na síntese do heme, como já proposto por outros autores (Zaman, Zaman & Batcabe et al., 1993). Esse trabalho sugere que o acúmulo de δ -ALA leva a alterações na síntese do heme e no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, sugerindo também que a alteração nas defesas antioxidantes, assim como o efeito do acúmulo de metabólitos tóxicos, estão envolvidos na alteração da enzima δ -ALA-D e conseqüentemente na elevação do estresse oxidativo. Tais achados sugerem que se forma um ciclo de dano celular que pode explicar a presença de doença cardiovascular acentuada nesses pacientes com morte prematura.

A doença renal crônica caracteriza-se por alterações nas ectonucleotidasas e essas estão implicadas na hemostasia, a alteração na atividade dessas enzimas pode estar relacionada não somente à uremia e ao efeito secundário da diálise, mas ao aumento do estresse oxidativo, que ficou caracterizado nesse trabalho pelo aumento da produção de malondialdéido e alterações nas enzimas catalase e δ -ALA-D. A alteração da atividade da δ -ALA-D pode estar relacionado ao aumento

do estresse oxidativo e essa alteração da atividade da δ -ALA-D pode estar exarcebando o estresse oxidativo formando um ciclo de dano celular, essas alterações em conjunto explicam o desenvolvimento de DCV precoce nesses pacientes.

2. Conclusões

Os dados obtidos no presente estudo permitem apresentar as seguintes considerações:

1. Esses resultados permitem inferir que a uremia está relacionada às anormalidades hemostáticas, como demonstrado pela alteração das enzimas NTPDase e 5'-Nucleotidase, e a diálise exerceria um efeito secundário sobre essas alterações.
2. Essas anormalidades na ativação plaquetária podem estar relacionadas ao desenvolvimento e a elevada mortalidade por doenças cardiovasculares apresentadas por esses pacientes.
3. Pode-se inferir que a uremia tem um papel determinante sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e a hemodiálise possui um efeito potencializador, como observado pela alteração na produção de malondialdeído elevada em hemácias de pacientes que realizam diálise, isso pode ser atribuído ao processo de hemodiálise e o uso de membranas não inteiramente biocompatíveis.
4. O aumento da atividade da catalase provavelmente está relacionada a uma medida compensatória devido o aumento de radicais livres.

5. A atividade da δ -ALA-D apresentou-se diminuída, em ambos os grupos HD e ND. O acúmulo de ALA pode estar influenciando o estresse oxidativo observado nesses pacientes ao mesmo tempo, que o nível de estresse oxidativo pode estar influenciado na atividade da δ -ALA-D, formando um ciclo de destruição.
6. A inibição da δ -ALA-D pode estar correlacionada à presença de anemia observada nesses pacientes.
7. Os resultados apresentados por esse trabalho permitem inferir que as alterações tanto em nível de hemostasia como a presença de estresse oxidativo podem estar exercendo influência sobre a presença de DCV precoce nesses pacientes.
8. Porém esse trabalho foi o primeiro a abordar as alterações apresentadas sobre a atividade de ectonucleotidases e colaborou para explicar melhor as alterações no nível de estresse oxidativo, sendo necessários mais estudos para compreender melhor as alterações apresentadas por esses pacientes.

3. Perspectivas

Esse estudo demonstrou várias alterações em pacientes com insuficiência renal crônica. Muitas delas ajudam a explicar a tendência a desenvolver doença cardiovascular precoce nesses pacientes e o nível inflamatório elevado. A partir desse estudo espera-se que outros venham a agregar conhecimentos necessários para explicar essas alterações. Com base nos resultados apresentados nesse trabalho, faz-se necessário:

1. Verificar o efeito da administração de heparina em plaquetas de camundongos sobre a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase.
2. Verificar a atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase em pacientes que realizam hemodiálise utilizando membrana sintética de polissulfona e poliacrilonitrila.
3. Investigar o efeito da administração do ferro, vitamina C e eritropoetina sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em pacientes com doença renal crônica.
4. Determinar a oxidação LDL.
5. Determinar a atividade da glutathione peroxidase em hemácias de pacientes com doença renal crônica.

6. Determinar e acompanhar a dosagem de alumínio em pacientes com insuficiência renal crônica e correlacionar com as alterações sobre a produção de espécies reativas de oxigênio.

7. Verificar a influência da presença de doenças infecciosas e as alterações na produção de espécies reativas de oxigênio em pacientes com doença renal crônica.

4. Bibliografia

ABO-SALEM, O.M.; HAYALLAH, A.M.; BILKEI-GORZO, A.; FILIPEK, B.; ZIMMER, A.; MULLER, C.E. Antinociceptive effects of novel A2B adenosine receptor antagonist. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 308, p. 358-366, 2004.

AGGARWAL, A.; KABBANI, S.S.; RIMMER, J.M.; GENNARI, F.J.; TAATJES, D.J.; SOBEL, B.E.; SCHNEIDER, D.J. Biphasic effects of hemodialysis on platelet reactivity in patients with end-stage renal disease: a potential contributor to cardiovascular risk. **Am J Kidney Dis**, v. 40, p. 315-322, 2002.

AJZEN, H. AND SCHOR, N. **Guias de Medicina ambulatorial e hospitalar UNIFESP/Escola Paulista de Medicina – Nefrologia 1ª edição Manole 2002** Baueri - SP.

ALVES, M.A.R. Diagnóstico de Doença Renal Crônica: Avaliação de proteinúria e sedimento urinário. **J Bras Nefrol**, v. 26, supl 1, p. 6-7, 2004.

ANAWEKAR, N.S. AND PFEFFER, M.A. Cardiovascular risk in chronic kidney disease. **Kidney Int**, v. 92, p. S11-S15, 2004.

ANNUK, M.; ZILMER, M.; LIND, L.; LINDE, T.; FELLSTRÖM, B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, p. 2747-2752, 2001.

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

ARAKAKI, N.; NAGAO, T.; NIKI, R.; TOYOFUKU, A.; TANAKA, H.; KURAMOTO, Y.; EMOTO, Y.; SHIBATA, H.; MAGOTA, K.; HIGUTI, T. Possible role of cell surface H⁺-ATP synthase in the extracellular ATP synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. **Mol Cancer Res**, v. 1, p. 931–939, 2003.

ARAÚJO, M. C.; ROCHA, J. B. T.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BAUCHSPIESS, R.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochem Biophys Acta**, v. 1740, p. 421– 426, 2005.

ARICI, M. AND WALLS, J. End-stage renal disease, atherosclerosis, and mortality: is C-reactive protein the missing link? **Kidney Int**, v. 59, p.407-14, 2001.

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

ATTMAN, P.O.; SAMUELSSON, O. AND ALAUPOVIC, P. Lipoprotein metabolism in renal failure. **Am J Kidney Dis**, v. 21, p. 573-592, 1993.

AUSTIN, S.M.; LIEBERMAN, J.S.; NEWTON, L.D.; MEJIA, M.; PETERS, W.A.; MYERS, B.D. Slope of serial glomerular filtration rate and the progression of diabetic glomerular disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 3, p.1358-1370, 1993.

BARMAN, T.E. **Enzyme Handbook**. v.2. New York: Springer Verlag, 1969.

BARRETT, B.J.; PARFREY, P.S.; MORGAN, J.; BARRE, P.; FINE, A.; GOLDSTEIN, M.B.; HANDA, S.P.; JINDAL, K.K.; KJELLSTRAND, C.M.; LEVIN, A.; MANDIN, H.; MUIRHEAD, N.; Richardson, R.M. Prediction of early death in end-stage renal disease patients starting dialysis. **Am J Kidney Dis**, v. 29, p.214-22, 1997.

BAYÉS, B.; PASOR, M.C.; BONAL, J.; ROMERO, R. "New" cardiovascular risk factors in patients with chronic kidney disease: Role of folic acid treatment. **Kidney Int**, v.67 (suppl 93), p. S39-S43, 2005.

BECKMAN, J. S. AND KOPPENOL. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. **Am J Physiol**, v. 271, p. C1424-C1437, 1996.

BELLOMO, G.; LIPPI, G.; SARONIO, P.; REBOLDI, G.; VERDURA, C.; TIMIO, F.; TIMIO, M. Inflammation, infection and cardiovascular events in chronic hemodialysis patients: a prospective study. **J Nephrol**, v. 16, p. 245-51, 2003.

BERGAMANI, C. AND GRAZI, E. Human platelets 5'-nucleotidase: a cell membrane ectoenzyme with a possible regulatory role in the aggregation reaction. **Ital J Biochem**, v. p. 273-288, 1980.

BIGONNESSE, F.; LÉVESQUE, S.A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S.C.; FERNANES, M.J.G.; SÉVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, v. 43, p. 5511-5519, 2004.

BIRK, A. V.; LENO, E.; ROBERTSON, H.D.; BOLOTINA, V.M.; SZETO, H.H. Interaction between ATP and catecholamines in stimulation of platelet aggregation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 284, p. H619-H625, 2003.

BIRK, A.V.; BROEKAMN, M.J.; GLAKEK, E.M.; ROBERTSON, H.D.; DROSOPOULOS, J.H.F.; MARCUS, A.J.; SZETO, H.H. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **J Lab Clin Med**, v. 140, p. 166-175, 2002.

BIRK, A.V.; BUBMAN, D.; BROEKAMN, M.J.; ROBERTSON, H.D.; DROSOPOULOS, J.H.F.; MARCUS, A.J.; SZETO, H.H. Role of a novel soluble nucleotide phosphohydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: Hemostasis, thrombosis, and vascular biology. **J Lab Clin Med**, v. 139, p. 116-123, 2001.

BLOCK, G. A. AND PORT, F.K. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: recommendations for a change in management. **Am J Kidney Dis**, v.35, p. 1226-1237, 2000.

BLOOM, A.L. AND EVANTS, E.P. Relationship of platelet retention in glass bead columns to the rate of aggregation with adenosine diphosphate and thrombin. **J Clin Path**, v. 22, p. 560-562, 1969.

BODOR, E.T.; WALDO, G.L.; HOOKS, S.B.; CORBITT, J.; BOYER, J.L.; HARDEN, T.K. Purification and functional reconstitution of the human P2Y₁₂ receptor. **Mol Pharmacol**, v. 64, p. 1210-1216, 2003.

BREGMAN, R. Prevenção da progressão da doença renal crônica (DRC). **J Bras Nefrol**, v. 26 supl, p.11-13, 2004.

BRENNER, B.M.; MEYER, T.W. AND HOSTETTER, T. H. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease. The role of hemodynamically

mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation and intrinsic renal disease In: **N Engl J Med**, v. 307, p. 652-659, 1982.

BURKART, J.M. **Adequacy of peritoneal dialysis** . In: Henrich, W.L. Ed Principles and Practice of dialysis 2^o ed Baltimore, Williams & Wilkins, 1999.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling. **Brit J Pharmacol**, v. 147, p. S172-S181, 2006.

BURNSTOCK, G. AND WILLIAMS, W. P2 purinergic receptors modulation of cell function and therapeutic potential. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 295, p. 862-868, 2000.

BUSCAROLI, A.; COLI, L.; CIANCIOLO, G.; GROSSI, G.; BONETTI, M.; NANNI, COSTA, A.; BORGNINO, L.C.; STEFONI, S.; BONOMINI, V. Biocompatibility of artificial membranes: Platelet function evaluation. **Biocyber Biomed eng**, v. 11, p. 5-12, 1991.

BUSCH, M.; FRANKE, S. AND MÜLLER, A. Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein. **Kidney Int**, v. 66, p. 338-347, 2004.

CAEN, J.P. AND ROSA, J.P. Platelet-vessel wall interaction: from the bedside to molecules. **Thromb Haem**, v. 74, p. 18-24, 1995.

CALLANDER, N. AND RAPAPORT, S.I. Trousseau's syndrome. **West J Med**, v. 158, p. 364-371, 1993.

CARVALHO, A.C. Acquired platelet dysfunction in patients with uremia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 4, p.129-143, 1990.

CASTALDI, P.A.; ROZENBERG, M.C. AND STEWART, J. H. The bleeding disorder of uaemia. **Lancet**, v. 2, p. 66-69, 1966.

CASTALDI, P.A.; ROZENBERG, M.C. AND STEWART, J.H. The bleeding disorder of uraemia: A qualitative platelet defect. **Lancet**, v. 2, p. 66-69, 1966.

CATTANEO, M.; MARCHESE. P.; JACOBSON, K.A.; RUGGERI, Z. New insights into the role of P2X1 in platelet function. **Haematologica**, v. 87, p. 13-14, 2002.

CECIL, R. AND BENNETT, G. **Textbook of Medicine**, Goldman, L. and Bennetti, J.C. 21ª Edição, Philadelphia, p. 1-2308, 2001.

CHENEY, K. AND BONNIN, J.A. Haemorrhage, platelet dysfunction and other coagulation defects in uraemia. **Br J Haemost**, v. 8, p. 215-222. 1962.

COMMUNI, D.; JANSSENS. R.; SUAREZ-HUERTA, N.; ROBAYE, B.; BOEYNAEMS, J.M Advances in signalling by extracellular nucleotides. The role and transduction mechanisms of P2Y receptors. **Cell Signal**, v.12, p. 351-360, 2000.

CORESH, J.; WEI, G.L. AND MCQUILLAN, G. Prevalence of high blood pressure and elevated serum creatinine level in the united States: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). **Arch Intern Med**, v. 161, p. 1207-1216, 2001.

CRISTOL, J.P.; BOSC, J.Y.; BADIOU, S.; LEBLANC, M.; LORRHO, R.; DESCOMPS, B.; CANAUD, B. Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: Beneficial effects of vitamin E supplementation. **Nephrol Dial Transplant**, v. 12, p. 2312-2317, 1997.

CULLETON, B.F.; LARSON, M.G.; WILSON, P.W.; EVANS, J.C.; PARFREY, P.S.; LEVY, D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. **Kidney Int**, v.56, p. 2214-219, 1999.

CHADWICK, B.P. AND FRISCHAUF, A.M. Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. **Mamm Genome**, v. 8, p. 668–672, 1997.

CHADWICK, B.P. AND FRISCHAUF, A.M. The CD39-like gene family: Identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. **Genomics**, v. 50, p. 357–367, 1998.

CHADWICK, B.P.; WILLIAMSON, J.; SHEER, D.; FRISCHAUF, A.M. Molecular Analysis of Mammalian Mutation, Imperial Cancer Research. cDNA cloning and chromosomal mapping of a mouse gene with homology to NTPases. **Mamm Genome**, v. 9, p.162–164, 1998.

D'AVILA, D. O.O. AND FIGUEIREDO A. E. **Métodos de depuração extra-renal; hemodiálise, diálise peritoneal e novas técnicas**, 3º ed Rio de Janeiro, editora Guanabara Koogan, 1996.

DeSILVA, D.; GUO, J. H. AND AUST, S.D. Relationship between iron and phosphate in mammalian ferritins. **Arch Biochem Biophys**, v. 303, p. 451-455, 1993.

DOBASHI, K.; GHOSH, B.; ORAK, J.K.; SINGH, I.; SINGH, A.K. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. **Mol Cell Biochem**, v. 205, p. 1-11, 2000.

DRAIBE, S. AND CENDOROGLO, M. Tratamento conservador da insuficiência renal crônica. **Rev Diagn Tratam**, v. 6, p.17-23, 2001.

DUARTE, M.M.F.; LORO, V.; ROCHA, J.B.T.; LEAL, D.B.R.; BEM, A.F.; DORNELE, A. MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **FESB J**, v. 274, p. 2707-2714, 2007.

DUBYAK, G.R. AND ELMOATASSIM, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. **Am J Physiol**, v. 265, p. C577-C606, 1993.

EKNOYAN, G. AND BROWN, C.H. Biochemical abnormalities of platelets in renal failure. **Am J Nephrol**, v. 1, p. 17-23, 1981.

ENJOJI, K.; SEVIGNY, J.; LIN, Y.; FRENETTE, P.S.; CHRISTIE, P.D.; ESCH, J.S. 2nd.; IMAI, M.; EDELBERG, J.M.; RAYBURN, H.; LECH, M.; BEELER, D.L.; CZIZMADIA, E.; WAGNER, D. D.; ROBSON, S.C.; ROSENBERG, R.D. Targeted

disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nat Med**, v. 5, p. 101-1017, 1999.

EPERLEIN, M.M.; NOUROOZ-ZADEH, J. AND YAYASENA, S.D. Nature and biological significance of free radicals generated during bicarbonate hemodialysis. **J Am Soc Nephrol**, v. 9, p. 457-463, 1998.

ESCH, T. ; LEMMON, V. AND BANKER, G. Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. **J Neurosci**, v. 19, p. 6417-6426, 1999.

ESMON C.T . Cell mediated events that control blood coagulation and vascular injury. **Ann Rev Cel Biol**, v. . p. 1-26, 1993.

EVANS JL, GOLDFINE ID, MADDUX BA, GRODSKY GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr Rev**, v. 23, p. 599-622, 2002.

FARINA, M.; BRANDÃO, R.; DE LARA, F.S.; PAGLIOSA, L.B.; SOARES, F.A.; SOUZA, D.O.; ROCHA, J.B.T. Profile of nonprotein thiols, lipid peroxidation and

delta-aminolevulinatase activity in mouse kidney and liver in response to acute exposure to mercuric chloride and sodium selenite. **Toxicology**, v. 3, p. 179–187, 2003.

FILHO, P. R. Diagnóstico de Doença Renal Crônica: Avaliação da Função Renal. **J Bras Nefrol**, v. 26 supl 1, p. 4-5, 2004 .

FILIPPOV, A.K.; BROWN, D.A. AND BARNARD, E.A. The P2Y2 receptor closes the N-type Ca²⁺ channel in neurons, with both adenosine triphosphates and diphosphates as potent agonists. **Br J Pharmacol**, v. 129, p. 1063-1066, 2000.

FISBANE, S. AND PAGANINI, E.P. **Hematologic abnormalities in Handbook of Dialysis**, Daugirdas, J.T., Blake, P. G., Ing, T.S. Third edition, Pippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001.

FLORA, G.J.S. AND SETH, P.K. Beneficial effects of S-adenosyl-L-methionine on aminolevulinic acid dehidratase, glutathione, and lipid peroxidation during acute lead–ethanol administration in mice. **Alcohol**, v. 18, p. 103–108, 1999.

FOLMER, V.; SOARES, J.C.M.; GABRIEL, D.; ROCHA, J.B.T. High-fat diet causes d-aminolevulinatase dehidratase inhibition and lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). **J Nutr**, v. 133, p. 2165–2170, 2003.

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

FRANK, R.D.; WBER, J.; DRESBACH, H.; THELEN, H.; WEISS, C.; FLOEGE, J. Role of contact system activation in hemodialyzer-induced thrombogenicity. *Kidney Int*, v. 60, p. 1972-1981, 2001.

FRASSETO, S.S.; SCHETINGER, M.R.C.; SCHIERHOLT, R.; WEBBER, A.; BONAN, C.D.; WYSE, A. T.; DIAS, R.D.; NETTO, C.; SARKIS, J.J. Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 33, p. 1369-1377. 2000.

FÜRSTENAU, C. R.; SPIER, A.P.; RÜCKER, B.; BERTI, S. L.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F. The effect of ebselen on adenine nucleotide hydrolysis by platelets from adult rats. *Chem Biol Inter*, v. 148, p. 93–99, 2004.

GACHET, C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 46, p. 277-300, 2006.

GAETANI, G.F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A.M.; KIRKAMAN, H.N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocyte. *Blood*, v.73, p. 334-339, 1989.

GALLE, J. AND QUASCHNING, T. Angiotensin II and atherosclerosis: relevance for renal disease. **Contrib Nephrol**, v. 135, p. 235-49, 2001.

GALLE, J.; BENGEN, J.; SCHOLLMAYER, P.; WANNER, C. Impairment of endothelium-dependent dilation in rabbit renal arteries by oxidized lipoprotein (a) – role of oxygen-derived radicals. **Circulation**, v. 92, p. 1582- 1589, 1995.

GALLICE P. FOURNIER N. CREVAT A, BRIOT M, FRAYSSINET R. MURISASCO A: In vitro” inhibition of platelet aggregation by uremic middle molecules. **Biomedicine**, v. 33, p. 1 85- 188, 1980.

GALLUCCI, M.T.; LUBRANO, R.; MELONI, C.; MOROSETTI, M.; MANCA, di Villahermosa S; SCOPPI, P.; PALOMBO, G.; CASTELLO, M.A.; CASCIANI, C. Red blood cell membrane lipid peroxidation and resistance to erythropoietin therapy in hemodialysis patients. **Clin Nephrol**, v. 52, p. 239-245, 1999.

GIBSON, K.D.; NEUBERGER, A. AND SCOTT, J.J. The purification and properties of delta aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem J**, v. 61, 618–629, 1955.

GORDGE, M.P. AND NEILD, G.H. Platelet function in uremia. **Platelet**, v. 2, p. 115-123, 1991.

GRIS, J.C.; BRANGER, B.; VÉCINA, F.; SABADINI, B.A.; FOURCADE, J.; SCHVED, J.F. Increased cardiovascular risk factors and features of endothelial activation and dysfunction in dialyzed uremic patients. **Kidney Int**, v.46, p. 807-813, 1994.

GRINTHAL, A. AND GUIDOTTI, G. Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras. **Biochemistry USA**, v. 41, p.1947–1956, 2002.

GUTTERIDGE, J.M. AND HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 136-47, 2000.

GUYTON, A.C & HALL, J.E.H. **Tratado de Fisiologia Médica**, 11^a Edição, Editora Elsevier, 2006, São Paulo – SP.

HALLER, C.A.; WANXING, C. M.D.; JING, W. M.D.; ROBSON, S.C.; CHIKOF, E.L. Reconstitution of CD39 in liposomes amplifies nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity and restores thromboregulatory properties. **J Vasc Surg**, v. 43, p. 816-823, 2006.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr Rev**, v. 52, p. 253, 1994.

HALLIWELL, B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? **Free Radic Biol Med**, v. 32, p 968–974, 2002.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. **Oxford: Clarendon Press**, p. 543, 1989.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and medicine, Ed 4. **Clarendon Press, Oxford**, 2006.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, p. 312–322, 2006.

HALLIWELL, B.; ZHAO, K. AND WHITEMAN, M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good – a personal view of recent controversies. **Free Radic Biol Res**, v. 31, p. 651-609, 1999.

HANDA, M. AND GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apirase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 218, p. 916-923, 1996.

HANNEDOUCHE, T.; CHAUVEAU, P.; KALOU, F.; ALBOUZE, G.; LACOUR, B.; JUNGERS, P. Factors affecting progression in advanced chronic renal failure. **Clin Nephrol**, v. 39, p. 312-320, 1993.

HANNKEN, T.; SCHROEDER, R.; ZAHNER, G.; STAHL, R.A.K.; WOLF, G. Reactive oxygen species stimulate p44/42 mitogen-activated protein kinase and induce p27^{Kip1}: role in angiotensin II – mediated hypertrophy of proximal tubular cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 11, p. 1387-1397, 2000.

HECHLER, B.; ECKLY A.; OHLMANN, P.; GAZENAVE, J.P.; GACHET, C. The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. **Br J Haematol**, v. 103, p. 858-866, 1998a.

HECHLER, B.; LENAIN, N.; MARCHESE, P.; VIAL, C.; HEIM, V.; FREUND, M.; CAZENAVE, J.P.; CATTANEO, M.; RUAGGERI, Z.M.; EVANS, R.; GACHET, C. A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. **J Exp Med**, v. 198, p. 661-667, 2003.

HECHLER, B.; LÉON, C.; VIAL, C.; VIGNE, P.; FRELI, C.; CAZENAVE, J.P.; GACHET, C. The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. **Blood**, v. 92, p. 152-159, 1998b.

HELD, P.J.; PORT, F.K.; TURENNE, M.N.; GAYLIN, D.S.; HAMBURGER, R.J.; WOLFE, R.A. Continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis: comparison of patient mortality with adjustment for comorbid conditions. **Kidney Int**, v.45, p.1163-1169, 2004.

HELOU, C.M.B. Potássio e bicarbonato. **J Bras Nefrol**, v. 26 supl 1, p. 22-24, 2004.

HOEBERTZ, A.; ARNETT, T.R. AND BURNSTOCK, G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, p. 290-297, 2003.

HONG, S.Y. AND YANG, D.H. Insulin levels and fibrinolytic activity in patients with end-stage renal disease. **Nephron**, v. 68, p. 329-333, 1994.

HOROWITZ, H.I.; STEIN, L.M.; COHEN ,B.D.; WHITE, J.G. Further studies on the platelet-inhibitory effect of guanidinosuccinic acid and its role in uremic bleeding. **Am J Med**, v. 49, p. 336-345, 1970.

HOVIND, P.; ROSSING, P.; TARNOW, L.; SMDT, U.M.; PARVING, H.H. Progression of diabetic nephropathy. **Kidney Int**, v. 59, p.702-709, 2001.

HSU, C. AND CHERTOW, G.M. Elevations of serum phosphorus and potassium in mild to moderate chronic renal insufficiency. **Nephrol Dial Transplant**, v.17, p. 1419-25, 2002.

HUNSICKER, L.G.; ADLER, S.; CAGGIULA; A.; ENGLAND, B.K.; GREENE, T.; KUSEK, J.W.; ROGERS, N.L.; TESCHAN, P.E. Predictors of the progression of renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study. **Kidney Int**, v. 51, p.1908-1919, 1997.

HUTCHINSON, F.N. AND JONES, W.J. A cost-effectiveness analysis of anemia screening before erythropoietin in patients with endstage renal disease: **Am J Kidney Dis**, v. 29, p.651-657, 1997.

ICHIKAWA, I.; KIYAMA, S. AND YOSHIOKA T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. **Kidney Int**, v.45, p. 1-9, 1994.

ISHII, H.; UCHIYAMA AND H.; KAZAMA, M. Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. **Thromb Haem**, v. 65, p. 618-623, 1991.

JIN, J. AND KUNAPULI, S.P. Coactivation of two different G protein-couple receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 8070-8074, 1998.

JIN. J.; DANIEL J.L. AND KUNAPULI, S.P. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. **J Biol Chem**, v. 273, p. 2030-2034, 1998.

JORNS, A.; TIEDGE, M.; LENZEN, S.; MUNDAY, R. Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro. **Free Radic Biol Med**, v. 26, p. 1300-1304, 1999.

JUNGERS, P.; KHOA, T.N.; MASSY, Z.A.; ZINGRAFF, J.; LABRUNIE, M.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; MAN, N.K. Incidence of atherosclerotic arterial occlusive accidents in predialysis and dialysis patients: a multicentric study in the Ile de France district. **Nephrol Dial Transplant**, v.14, p.898-902, 1999.

JUNIOR, J.E.R. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação.

J Bras Nefrol, v. 26 supl 3, p. 1-3, 2004.

KACZMAREK, E.; KOZIAK, K.; SÉVIGNY, J.; SIEGEL, J.B.; ANRATHER, J.;
BEAUDOIN, A.R.; BACH, F.H.; ROBSON, S.C. Identification and characterization
of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. **J Biol Chem**, v. 271, p.33116–33122,
1996.

KAMEL, K.S.; HALPERIN, M.L.; FABER, M.D.; STEIGERWALT, S.P.; HERLIG,
C.W.; NARINS, R.G. **Disorders of Potassium Balance**. In Brenner B.M. (ed.) *The
Kidney*, 6th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp., 2000.

KANSAS, C.S.; WOOD, G.S. AND TEDDER, T.F. Expression, distribution, and
biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of
lymphocytes. **J Immunol**, v. 146, p. 2235-2244, 1991.

KATES, D.M.; SHERRARD, D.J. AND ANDRESS, D.L. Evidence that serum
phosphorus is independently associated with serum PTH in patients with chronic
renal failure. **Am J Kidney Dis**, v. 30, p. 809-813, 1997.

KAUFFENSTEIN, G.; HECHLER, B.; CAZENAVE, J.P.; GACHET, C. Adenosine
triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y12 receptor. **J Thromb Haem**,
v. 2, p 1980-1988, 2004.

KAWABATA, K.; NAKAI, S.; MIWA, M.; SUGIURA, T.; OTSUKA, Y.; SHINZATO, T.; HIKI, Y.; TOMIMATSU, I.; USHIDA, Y.; HOSONO, F.; Maeda, K. Platelet GPIIb/IIIa is activated and platelet-leukocyte coaggregates formed in vivo during hemodialysis. **Nephron**, v. 90, p. 391-400, 2002.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T. AND NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v. 96, p. 2157-2162, 2000.

KAYSEN, G.A. Role of inflammation and its treatment in ESRD patients. **Blood Purif**, v.20, p.70-80, 2002.

KEGEL, B.; BRAUN, N.; MALISZEWSKI, C.R.; ZIMMERMANN, H. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. **Neuropharmacologys**, v.36, p. 1189-1200, 1997.

KIRLEY, T.L. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase-homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. **J Biol Chem**, v. 272, p.1076-1081, 1997.

KLAHR, S. Oxygen radicals and renal disease. **Miner Eletrolyte Metab**, v. 23, p. 140-143, 1997.

KOENIG, W. Update on C-reactive protein as risk marker in cardiovascular disease. **Kidney Int**, v. 63, p. 58-61, 2003.

KUGELGEN VON, I. AND WETTER A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 362, p. 310-323, 2000.

KUKULSKI, F.; LEVESQUE, S.A.; LAVOIE, E.G.; LECKA, J. BIGONNESSE, F.; KNOWLES, A.F.; ROBSON, S.C.; KIRLEY, T.L.; SÉVIGNY, J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1,2,3, and 8. **Purinergic Signal**, v.1, p. 193-204, 2005.

LAI, K.M. AND WONG, P.C.L. A comparison of the properties of 5'-nucleotidase purified from the cytosolic and synaptic plasma membrane fractions of rat forebrain. **Int J Biochem**, v. 23, p. 1123-1130, 1991.

LAI, K.N. Protein C, protein S, and antithrombin III metabolism in dialysis patients. **Int J Artif Organs**, v. 16, p. 4-6, 1993.

LARSSON, S.O. Coagulation and fibrinolysis in renal failure. **Scand J Haematol**, v. 15, p. 1-9, 1971.

LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N.;
Wintrobe Hemotologia Clin, Vol.I e II. São Paulo: Manole, p. 2623, 1998.

LEON, C.; HECHLER, B.; VIAL, C.; LERAY, C.; CAZENAVE, J.P.; GACHET, C.
The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in
platelets and megakaryoblastic cells. **FEBS Lett**, v. 403, p. 26-30,1997.

LEVEY, A.S. Clinical practice. Nondiabetic kidney disease. **N Engl J Med**, v. 347,
p. 1505-1151, 2002.

LEVEY, A.S. Nephrology Forum: Measurement of renal function in chronic renal
disease. **Kidney Int**, v. 38, p. 167-184, 1990.

LEVEY, A.S.; BETO, J.A.; CORONADO, B.E.; EKNOYAN, G.; FOLEY, R.N.;
KASISKE, B.L.; KLAG, M.J.; MAILLOUX, L.U.; MANSKE, C.L.; MEYER, K.B.;
PARFREY, P.S.; PFEFFER, M.A.; WENGER, N.K.; WILSON, P.W.; WRIGHT, J.T.
J.R. 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?
National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease. **Am J Kidney
Dis**, v. 32, p.853-906, 1998.

LEVEY, A.S.; GREENE, T.; BECK, G.J.; CAGGIULA, A.W.; KUSEK, J.W.;
HUNSICKER, L.G.; KLAHR, S. Dietary protein restriction and the progression of
chronic renal disease: What have all of the results of the results of the MDRD study

show. Modification of Diet in Renal Disease Study group. In: **J Am Soc Nephrol**, v. 11, p. 2426-2439, 1999.

LEVIN, A.; SINGER, J.; THOMPSON, C.R.; ROSS, H.; LEWIS, M. Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: identifying opportunities for intervention. **Am J Kidney Dis**, v. 27, p.347-354, 1996.

LEWIS, I.H.; ZUCKER, M.B. AND FERGUSON, I.H. Bleeding tendency in uremia. **Blood**, v. 11, p. 1073-1076, 1956.

LINDNER, A.; CHARRA, B.; SHERRARD, D.; SCHRIBER, B.H. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. **New Engl J Med**, v. 290, p. 697-701, 1974.

LINDSAY, R.M.; MASON, R.G.; KIM, S.W.; ANDRADE, J.D.; HAKIM, R.M. Painel conference: Blood surface interaction. **Trans Am Soc Artif Intern Organs**, v. 26, p. 603-610, 1980.

LINDSAY, R.M.; FRIESEN, M.; KOENS, F.; LINTON, A. L.; OREOPOULOS, D.; DE VEBER, G. Platelet function in patients on long term peritoneal dialysis. **Clin Nephrol**, v. 6, p. 335-339, 1976.

LONGENECKER, J.C.; CORESH, J. AND 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. 1918-1927, 2002.

LUNKES, G.I.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORSCH, A.; MORSCH, V.M.; MAZZANTI, C.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thromb Res**, v. 109, p.189–194, 2003.

MAHAUT-SMITH MP, ENNION SJ, ROLF MG, EVANS RJ. ADP is not an agonista P2X(1) receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets. **Br J Pharmacol**, v.131, p.108–14, 2000.

MAHAUT-SMITH, M.P.; TOLHURST, G. AND EVANS, R.J. Emerging roles for P2X1 receptors in platelet activation. **Platelets**, v. 15, p. 131-144, 2004.

MALISZEWSKI, C.R.; DELESPESE, G.J.; SCHOENBORN, M.A.; ARMITAGE, R.J.; FANSLOW, W.C.; NAKAJIMA, T.; BAKER, E.; SUTHERLAND, G.R.; NAKAJIMA, T.; BAKER, E.; SUTHERLAND, G.R.; POINDEXTER, K.; BIRKS, C.; ALPERT, D. FRIEND, S.D. GIMPEL, AND R.B. GAYLE, III . The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. **J Immunol**, v. 153, p. 3574-3583, 1994.

MALYSZKO, J.; MALYSZKO, J.S.; PAWLAK, D.; PAWLAK, K.; BUCZKO, W.; MYSLIWIEC, M. Hemostasis, platelet function and serotonin in acute and chronic renal failure. **Thromb Res**, v. 83, p. 351– 361, 1996.

MARCUS, A.J. AND SAFIER, L.B. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. **FASEB J**, v.7, p. 516-522, 1993.

MARCUS, A.J.; SAFIER, L.B.; HAJJAR, K.A; ULLMAN, H.L.; ISLAM, N.; BROEKMAN, M.J.; EIROA, A.M. Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells. **J Clin Invest**, v. 88, p. 690–1696, 1991.

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.F.; MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.; ISLAM, N.; PINSKY, D.J.; SESTI, C.; LEVI, R. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: Implications for ischemic vascular diseases. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 305, p. 9–16, 2003.

MARITIM, A.C., SANDERS, R.A. AND WATKINS, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 17, p. 24-38, 2003.

MATEO, J.; HARDEN T.K. AND BOYER, J.L. Functional expression of a cDNA encoding a human ectoATPase. **Br J Pharmacol**, v. 128, p. 396-402, 1999.

MATTHIAS, F.R. AND PABINSKI, W. Prostaglandin-endoperoxides and cyclic 3'5'-AMP in platelets of patients with uremia. **Thromb Haem**, v. 38, p. 34, 1977.

MCGONIGLE, R.J.; WALLIN, J.D.; SHADDUCK, R.K.; FISHER, J.W. Erythropoietin deficiency an inhibition of erythropoiesis in renal insufficiency. **Kidney Int**, v. 25, p.437-444, 1984.

MEYERHOF, O. The origin of the reaction of harden and young in cell-free alcoholic fermentation. **J Biol Chem**, v. 157, p. 105-119, 1945.

MEZZANO, D.; TAGLE, R.; PANES, O.; PÉREZ,M.; DOWNEY, P.; MUNOZ, B.; ARANDA, E.; BARJA, P.; THAMBO, S.; GONZAEZ, F.; MEZZANO, S.; PEREIRA, J. Hemostatic disorder of uremia: The platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis. **Thromb Haem**, v. 76, p. 312-321, 1996.

MONTEIRO, H.P.; ABDALLA, D.S.; AUGUSTO, O.; BECHARA, E.J. Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin

and connections with porphyriopathies. **Arch Biochem Biophys**, v.15; p. 206-16, 1989.

MORENA, M.; BELDOSC, S.; DUPY, A.M.; CANAUD, B.; CRISTOL, J.P. Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. **Hemodialysis Int**, v. 9, p. 37-46, 2005.

NAKAMURA, Y.; TOMURA, S.; TACHIBANA, K.; CHIDA, Y.; MARUMO, F. Enhanced fibrinolytic activity during the course of hemodialysis. **Clin Nephrol**, v. 38, p. 90-96, 1992.

NENCI, G.G.; BERRETTINI, M.; AGNELLI, O.; PARISE, P.; BUONCRISTIANI, U.; BALLATORI, E. Effect of peritoneal dialysis, hemodialysis and kidney transplantation on blood platelet function. **Nephron**, v. 23, p. 287- 292. 1979.

NESTEL, P.J.; FIDGE, N.H. AND TAN, M.H. Increased lipoprotein remnant formation in chronic renal failure. **N Eng J Med**, v.307, p.329-333, 1982.

NOGUEIRA, C.W.; SOARES, F.A.; NASCIMENTO, P.C.; MULLER, D.; ROCHA, J.B.T. 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3- dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicology**, v. 184, p. 85–95, 2003.

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

OLBRICH, C.; AEPFELBACHER, M. AND SIESS, W. Epinephrine potentiates calcium mobilization and activation of protein kinases in platelets stimulated by ADP through a mechanism unrelated to phospholipase C. **Cell Signal**, v.1, p. 483-492, 1989.

OTEIZA, P.I.; KLEINMAN, C.G.; DEMASI, M.; BECHARA E.J.H. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Arch Biochem Biophys** v. 316, p. 607-611, 1995.

OURY, C.; TOTH-ZSAMBOKI, E.; THYS, C.; TYTGAT, J.; VERMYLEN, J.; HOYLAERTS, M.F. The ATP-fated P2X1 ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen. **Thromb Haem**, v. 86, p. 1264-1271, 2001.

PAEZ, J. G.; RECIO, J.A.; ROUZAUT, A.; NOTARIO, V. Identity between the PCPH proto-oncogene and the CD30L4 (ENTPD5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene. **Int J Oncol**, v. 19, p. 1249-1254, 2001.

PARFREY, P.S. Cardiac disease in dialysis patients: diagnosis, burden of disease, prognosis, risk factors and management. **Nephrol Dial Transplant**, v. 15, p. 58-68, 2000.

PEREIRA, J.; SHAPIRO, L.; KING, A.; FALAGAS, M.; STROM, J.; DINARELLO, C. Plasma levels of IL-1 β , TNF- α and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure. CAPD, and hemodialysis patients. **Kidney Int**, v. 45, p. 890-896, 1994.

PEROTTONI, J.; MEOTTI, F.C.; FOLMER, V.; PIVETTA, L.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Ebselen and diphenyl diselenide do not change the inhibitory effect of lead acetate on delta aminolevulinic acid dehydratase. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 19, p. 239–248, 2005.

PILLA, A.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S.S.; BATASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225-230, 1996.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **Int Rev Cytol**, v. 58, p. 141-214, 1995.

RABELINK, T.J.; ZWAGINGA, J.J.; KOOMANS, H.A.; SIXMA, J.J. Thrombosis and hemostasis in renal disease. **Kidney Int**, v. 46, p. 287-296, 1994.

RADTKE, H.W.; CLAUSSNER, A.; ERBES, P.M.; SCHEUERMANN, E.H.; SCHOEPPE, W.; KOCH, K.M. Serum erythropoietin concentration in chronic renal failure: Relationship to degree of anemia and excretory renal function. **Blood**, v. 54, p.877-884, 1979.

RALEVIC, V. AND BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines **Pharmacol Rev**, v. 50, p. 413-492, 1998.

REMUZZI, G. Bleeding disorders in uremia: Pathophysiology and treatment. *Adv Nephrol*, v. 18, p. 171-186, 1989.

REMUZZI, G.; BENIGNI, A.; DODESINI, P.; SCHIEPPATI, A.; LIVIO, M.; DE GAETANO, G.; DAY, S.S.; SMITH, W.L.; PINCA, E.; PATRIGNANI, P.; PATRONO, C. Reduced platelet thromboxane formation in uremia: Evidence for a functional cyclooxygenase defect. **J Clin Invest**, v. 71, p. 762-768, 1983.

REMUZZI, G.; CAVENAGHI, A.E.; MECCA, G.; DONATI, M.B.; DE GAETANO, G. Prostacyclin-like activity and bleeding in renal failure. **Lancet**, v. 2, p.1195-1197, 1977.

REMUZZI, G.; LIVIO, M.; MARCHIARO, G.; MECCA, G.; DE GAETANO, G. Bleeding in renal failure: Altered platelet function in chronic uraemia only partially corrected by haemodialysis. **Nephron**, v.22, p.347-353, 1978.

RICHARD, M.J.; ARNAUD, J.; JURKOVITZ, C.; HACHACHE, T.; MEFTAHI, H.; LAPORTE, F.; FORET, M.; FAVIER, A.; CORDONNIER, D. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. **Nephron**, v. 57, p. 10-15, 1991.

ROBSON, S.C.; DAOUD, S.; BEGIN, M.; CÔTÉ, Y.P.; SIEGEL, J.B.; BACH, F.H.; BEAUDOIN, A.R. Modulation of vascular ATP diphosphohydrolase by fatty acids. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 8, p. 21–27, 1997.

ROBSON, S.C.; ENJYOJI, K.; GOEPFERT, C.; IMAI, M.; KACZMAREK, E.; LIN, Y.; SÉVIGNY, J.; WARNY, M. Modulation of extracellular nucleotide-mediated signaling by CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1. **Drug Dev Res**, v. 53, p.193–207, 2001.

ROBSON, S.C.; WU, Y.; SUN, X.F.; KNOSALLA, C.; DWYER, K.; ENJYOJI, K. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. **Semin Thromb Hemost**, v. 31, p. 217–233, 2005.

ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J. AND ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v. 2, p.409–430, 2006.

ROCHA, M.E.M.; DUTRA, F.; BANDY, B.; BALDINI, R.L.; GOMES, S.L.; ALÁRIO-FALJONI, A.; LIRIA, C.W.; MIRANDA, M.T.M.; BECHARA, E.J.H. Oxidative

damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. **Arch Biochem Biophys**, v. 409, p. 349-356, 2003.

ROLF, M. G.; BREARLEY, C.A. AND MAHAUT-SMITH, M.P. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha, beta-methylene ATP. **Thromb Haem**, v. 85, p. 303-308, 2001.

ROTH, G.J. Platelet and blood vessels: the adhesion event. **Immunol today**, v. 13, p. 100-105, 1992.

RUBANYI, G.M.; ROMERO, J.C. AND VANHOUTTE, P.M. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. **Am J Physiol**, v. 250, p.H1145-H1149,1986.

RUGGENENTI, P.; PERNA, A.; ZOCCALI, C.; GHERARDI, G.; BENINI, R.; TESTA, A.; REMUZZI, G. Chronic proteinuric nephropathies. II.Outcomes and response to treatment in a prospective cohort of 352 patients: Differences between women and men in relation to the ACE gene polymorphism. Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia (GISEN). **J Am Soc Nephrol**, v. 11, p.88-96, 2000.

SAGRIPANTI, A.; CUPISTI, A.; BAICCHI, U.; FERDEGHINI, M.; MORELLI, E.; BARSOTTI, G. Plasma parameters of the prothrombotic state in chronic uremia. **Nephron**, v. 63, p. 273-278, 1993.

SAKAI, T. AND USHIO, K. Restoration of lead-inhibition delta aminolevulinatase activity in whole blood by heat, zinc ion and (or) dithiothreitol. **Clin Chem**, v.26, p. 625–628, 1980.

SALZMAN, E.W. AND NERI, L.L. Adhesiveness of blood platelets in uremia. **Thromb Diath Haemorrh** , v.15 , p. 84 -92, 1966.

SAVI, P.; BEAUVERGER, P.; LABOURET, C.; DELFAUD, M.; SALEL, V.; KAGHAD, M.; HERBERT, J.M. Role of P2Y1 purinoreceptor in ADP-induced platelet activation. **FEBS Lett**, v. 422, p. 291-295, 1998.

SCHETINGER, M. R. C.; BARCELLOS, C. K.; BARLEM, A.; ZWESTCH, G.; GUBERT, A.; BERTUOL, C.; ARTENI, N.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F.; A NETTO, C. Activity of synaptosomal ATP diphosphohydrolase from hippocampus of rats tolerant to forebrain ischaemia. **Bras J Med Biol Res**, v. 27, p. 1123-1128, 1994.

SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; NORBERT, B.; OLAF G.; CSIZMADIA, E.; QAWI, I.; IMAI, M.; ZIMMERMANN, H.; ROBSON, S.C. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1) and NTPDase2 have implications for trombo-regulation. **Blood**, v. 99, p. 2801-2809, 2002.

SHACKELFORD, R.E.; KAUFMANN, W. AND PAULES, R.S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. **Free Radic Biol Med**, v. 28, p. 1387-1397, 2000.

SHAH,B.H.; SIDDIQUI, A.; QURESCHI, K.A.; KHAN, M.; RAFI, S.; UJAN, V.A.; YAQUB, Y.; RASHEED, H. AND SAEED, S.A. Co-activation of Gi and Gq proteins exerts synergistic effect on human platelet aggregation through activation of phospholipase C and CA²⁺ signaling pathways. **Exp Mol Med**, v. 31, p. 495-500, 1999.

SHEMIM, D. 5-Aminolevulinic acid dehydratase: structure, function, and mechanism. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B**, v 273, p. 109–115, 1976.

SHRYOCK JC AND BELARDINELLI L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. **Am J Cardiol**,v.79,p.2-10,1997.

SHULMAN, N.B.; FORD, C.E.; HALL, W.D.; BLAUFOX, M.D.; SIMON, D.; LANGFORD, H.G.; SCHNEIDER, K.A. Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function. Results from the hypertension detection and follow-up program. The hypertension detection and follow-up program cooperative group. **Hypertension**, v. 13, p. 180-93, 1989.

SIESS W. Molecular mechanisms of platelet activation. **Physiol Rev**, v. 69, p. 58-178, 1989.

SLOAND, E.M.; SBOAND, I.A.; PRODOUZ, K.; KLEIN, H.G.; YU, M.W.; HARVATH, L.; FRICKE, W. Reduction of platelet glycoprotein Ib in uraemia. **Br J Haemost**, v. 77, p. 375-381, 1991.

SOARES, J.C.M.; FOLMER, V. AND ROCHA, J.B.T. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. **Nutrition**, v. 19, p. 627–632, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA - SBN (<http://www.sbn.org.br>).

SPENCER, P. AND JORDAN, P.M. Characterization of the 2,5-aminolevulinic acid-binding sites, the A-site and P-site, of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem J**, v.305, p.151–158, 1995.

SPENCER, P. AND JORDAN, P.M. Investigation of the nature of the 2 metalbinding sites in 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem J**, v.300, p.373–381, 1994.

STIGANT, C.; STEVENS, L. AND LEVIN, A. Nephrology. 4. Strategies for the care of adults with chronic kidney disease. **Can Med Assoc J**, v. 168, p. 1553-60, 2003.

STOCKER R AND KEANEY JF, JNR. The role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, p. 1381-1478, 2004.

SCHULTE AM ESCH, J.; SÉVIGNY, J.; KACZMAREK, E.; SIEGEL, J.B.; IMAI, M.; KOZIAK, K.; BEAUDOIN, A.R.; ROBSON, S.C. Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. **Biochemistry USA**, v. 38, p. 2248–2258, 1999.

TAKAGI, M.; WADA, H.; MUKAI, K.; KIHIRA, H.; YANO, S.; MINAMIKAWA, K.; WAKITA, Y.; NAKASE, T.; NAGAYA, S.; DEGUCHI, K.; SUZUKI, K. Increased vascular endothelial cell markers in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 5, p. 713-717, 1994.

TAKANO S, KIMURA J, MATSUOKA I, ONO T. 1999. Norequirement of P2X1 purinoceptors for platelet aggregation. **Eur J Pharmacol**, v. 372, p. 305–9, 1999.

TETTA, C.; DAVID, S.; MARIANO, F.; DE NITTI, C.; PANICHI, V. Alterations of the cytokine network in hemodialysis. **J Nephrol**, v.14, p. S22-S29, 2001.

THOMÉ, F.S.; SENGER, M.; GARCEZ, C.; GARCEZ, J.; CHEMELLO, C.; MANFRO, R.C. Dialysis water treated by reverse osmosis decreases the levels of C-reactive protein in uremic patients. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, p. 789-94, 2005.

TOBOREK, W.; WASIK, T.; DRÓZDZ, M.; Klin, M.; MAGNER-WRÓBEL, K.; KOPIECZNA-GRZEBIENIAK, E. Effect of hemodialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure. **Metabolism**, v.41, p.1229-1232, 1992.

TOMURA, S.; NAKAMURA, Y.; DEGUCHI, F.; ANDO, R.; CHIDA, Y.; MARUMO, F. Coagulation and fibrinolysis in patients with chronic renal failure undergoing conservative treatment. **Thromb Res**, v. 64, p. 81-90, 1991.

TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T. AND SANNO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in d-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochem Biophys Acta**, v. 570, p. 167– 178, 1979.

TURKO I.V.; MARCONDES, S. AND MURAD, F. Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, p. H2289-H2294, 2001.

VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN B. AND MARTASEK, P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. **Free Radic Res**, v 37, p. 121-127, 2003.

VIAL, C.; PITT, S.J.; ROBERTS, J.; ROLF, M.G.; MAHAUT-SMITH, M.P.; EVANS, R.J. Lack of evidence for functional ADP-activated human P2X1 receptors

supports a role for ATP during hemostasis and thrombosis. **Blood**, v. 102, p3646–51, 2003.

VONESH, E.F. AND MORAN, J. Mortality in end-stage renal disease: a reassessment of differences between patients treated with hemodialysis and peritoneal dialysis. **Am Soc Nephrol**, v. 10, p. 354-65, 1999.

WALDO, G.L. AND HARDEN, T.K. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. **Mol Pharmacol**, v. 65, p. 426-436, 2004.

WALSER, M. Progression of chronic renal failure in man. **Kidney Int**, v. 37. p.1195-1210, 1990.

WANG, T.F.; ROSENBERG, P.A.; GUIDOTTI, G. Characterization of brain ectoaprase: Evidence for only one ectoaprase (CD39) gene. **Mol Brain Res**, v. 47, p. 295–302, 1997.

WANNAMETHEE, S.G.; SHAPER, A.G. AND PERRY, I.J. Serum creatinine concentration and cardiovascular disease: A possible marker for increased risk of stroke. **Stroke**, v. 28, p.557-563, 1997.

WANNER, G.A.; MULLER, P.E.; ERTEL, W.; BAUER, M. MENGER, M.D.; MESSMER, K. Differential effect of anti-TNF-alpha antibody on proinflammatory cytokine release by Kupffer cells following liver ischemia and reperfusion. **Shock**, v. 11, p. 391-395, 1999.

WASQUES-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B. AND MARTASEK, P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation formed NOS: enzymology and physiological implications. **Free Radic Res**, v. 37, p. 121-127, 2003.

WEINSTEIN, T.; CHAGNAC, A.; KORZETS, A.; BOAZ, M.; ORI, Y.; HERMAN, M.; MALACHI, T.; GAFTER, U. Haemolysis in haemodialysis patients: Evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress. **Nephrol Dial Transplant**, v. 15, p. 883-887, 2000.

WHAIEB, S.A. H₂O₂ exposure during pregnancy: the effect of vitamin against oxidative stress in the off spring of rats. **Iraqi J Veterinary Sciences**, v. 14, p. 17-28, 2001.

WU, K.K. Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. **J Int Med**, v. 239, p. 17-34, 1996.

YAMAMOTO, K.; SOKABE, T.; MATSUMOTO, T.; YOSHIMURA, K.; SHIBATA, M.; OHURA, N.; FUKUDA, T.; SATO, T.; SEKINE, K.; KATO, S.; ISSHIKI, M.; FUJITA, T.; KOBAYASHI, M.; KAWAMURA, K.; MASUDA, H.; KAMIYA, A.; ANDO, J. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. **Nat Med**, v. 12, p. 133-137, 2006.

ZALBA, G.; FORTUNO, A. AND DIEZ, J. Oxidative stress and atherosclerosis in early chronic kidney disease *Nephrol. Dial Transplant*, v. 2,1 p. 2686 – 2690, 2006.

ZAMAN, K.; ZAMAN, A. AND. BATCABE, J. Hematological effects of aluminum on living organisms. **Comp Biochem Physiol**, v.106, p.285-293, 1993.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **Biochem J**, v. 285, p. 345-365, 1992.

ZIMMERMANN, H. AND PEARSON, J. Extracellular metabolism of nucleotides and adenosine in the cardiovascular system. In: Burnstock G, Dobson JG, Liang BT et al (eds) *Cardiovascular Biology of Purines*. Kluwer, Dordrecht, Boston, London, pp 342–358, 1998.

ZIMMERMANN, H. AND BRAUN, N. Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. **Prog Brain Res**, v. 120, p. 371-85, 1999.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Develop Res**, v.52, p. 44-56, 2001.