

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:**  
**NEFROLOGIA**

**EFEITO DO TRATAMENTO DA ÁGUA POR OSMOSE REVERSA  
OU DEIONIZAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E O  
ESTRESSE OXIDATIVO DE PACIENTES URÊMICOS EM  
HEMODIÁLISE**

**FERNANDO SALDANHA THOMÉ**

**Porto Alegre**  
**2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:**  
**NEFROLOGIA**

**EFEITO DO TRATAMENTO DA ÁGUA POR OSMOSE REVERSA  
OU DEIONIZAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E O  
ESTRESSE OXIDATIVO DE PACIENTES URÊMICOS EM  
HEMODIÁLISE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia da Faculdade de Medicina da UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Autor: Fernando Saldanha Thomé

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro

Porto Alegre  
2003

**Para Guilherme e Gustavo**

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS.....  | vi   |
| LISTA DE TABELAS.....   | viii |
| LISTA DE FIGURAS.....   | ix   |
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 1    |
| 1.1. Inflamação, aterosclerose e doença cardiovascular na<br>insuficiência renal crônica.....   | 3    |
| 1.2. Importância da aterosclerose no paciente urêmico.....  | 7    |
| 1.3. Fisiopatologia da aterosclerose.....   | 8    |
| 1.4. Proteína C-reativa, inflamação e aterogênese.....  | 10   |
| 1.5. Importância do estresse oxidativo.....   | 13   |
| 1.6. Estresse oxidativo na uremia.....  | 18   |
| 1.7. Conexão entre disfunção endotelial e inflamação.....   | 23   |
| 1.8. Efeito da água do dialisato sobre o estado<br>microinflamatório e o estresse oxidativo dos pacientes<br>urêmicos em diálise..... | 26   |
| 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 30   |
| 3. OBJETIVOS.....   | 41   |

|   |     |
|---|-----|
| 3.1. Geral.....   | 41  |
| 3.2. Específicos.....   | 41  |
| <br>  |     |
| 4. ARTIGO 1: Efeito da melhora do tratamento da água para hemodiálise sobre o estado microinflamatório da uremia.....   | 42  |
| <br>  |     |
| 5. ARTIGO 1 (TRADUÇÃO): <i>Effect of improvement of hemodialysis water on the uremia microinflammatory state</i> .....  | 63  |
| <br>  |     |
| 6. ARTIGO 2: Avaliação da atividade inflamatória e do estresse oxidativo em pacientes urêmicos dialisados com dois sistemas diferentes de purificação de água.....    | 83  |
| <br>  |     |
| 7. ARTIGO 2 (TRADUÇÃO): <i>Analysis of inflammatory activity and oxidative stress of uremic patients dialysed with two different water purification systems</i> ..... | 104 |
| <br>  |     |
| 8. CONCLUSÃO.....   | 124 |
| <br>  |     |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA CONCLUSÃO...   | 127 |
| <br>  |     |
| 10. ANEXO.....  | 129 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |  |
|---------------|--|
| AAMI          | - "Association for the Advancement of Medical Instrumentation"         |
| ADMA          | - Dimetilarginina assimétrica  |
| ADP           | - Difosfato de adenosina   |
| AGEs          | - Produtos finais de glicosilação avançada                             |
| ANG II        | - Angiotensina II  |
| ANTI-HCV      | - Anticorpos contra o vírus da hepatite C                              |
| ASG, SGA      | - Avaliação subjetiva global (" <i>Subjective global assessment</i> ") |
| ATP           | - Trifosfato de adenosina  |
| AT1           | - Receptor tipo 1 da angiotensina II                                   |
| CARB          | - Carbonilas   |
| C5            | - Fração 5 do complemento  |
| C5a           | - Fração 5 do complemento ativada                                      |
| DI, DE        | - Deionização  |
| DNA           | - Ácido desoxirribonucléico  |
| DP, SD        | - Desvio-padrão (" <i>standard-deviation</i> ")                        |
| Cps/mg        | - Contagens por segundo por miligrama                                  |
| ELISA         | - Enzima imuno-ensaio  |
| Hb            | - Hemoglobina  |
| HCV           | - Vírus da hepatite C  |
| HDL           | - Lipoproteína de alta densidade                                       |
| HOCl          | - Ácido hipocloroso  |
| ICAM, ICAM-1  | - Molécula de adesão intercelular (tipo 1)                             |
| IRC           | - Insuficiência renal crônica  |
| IL-1          | - Interleucina-1   |
| IL-6          | - Interleucina-6   |
| I $\kappa$ -B | - Proteína inibitória do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B   |
| IMC, BMI      | - Índice de massa corporal (" <i>Body mass index</i> ")                |
| Kt/V          | - Depuração fracional da uréia   |

|                   |   |
|-------------------|---|
| LDL               | - Lipoproteína de baixa densidade   |
| LOX-1             | - Receptor da lipoproteína de baixa densidade oxidada   |
| LPO               | - Peroxidação lipídica  |
| LPS               | - Lipopolissacarídeo  |
| MCP-1             | - Proteína quimiotática de monócitos 1  |
| MIA               | - Síndrome de má nutrição, inflamação e aterosclerose   |
| MICS              | - Síndrome complexa de má nutrição e inflamação   |
| mM                | - milimol por litro   |
| MPO               | - mieloperoxidase   |
| NADP              | - Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo   |
| NADPH             | - Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida  |
| NF- $\kappa$ B    | - Fator de transcrição nuclear $\kappa$ B   |
| OCl <sup>-</sup>  | - Hipoclorito   |
| ON                | - Óxido nítrico   |
| ONOO <sup>-</sup> | - Peroxinitrito   |
| OR, RO            | - Osmose reversa (" <i>reverse osmosis</i> ")   |
| oxLDL             | - Lipoproteína de baixa densidade oxidada   |
| PCR, CRP          | - Proteína C-reativa (" <i>C-reactive protein</i> ")  |
| PTH               | - Hormônio da paratireóide  |
| SOD               | - Superóxido dismutase  |
| Th1, Th2          | - Linfócitos auxiliares subgrupo 1, subgrupo 2  |
| TNF- $\alpha$     | - Fator de necrose tumoral alfa   |
| TRAP              | - Capacidade antioxidante total   |
| TROLOX            | - Vitamina E hidrossolúvel (padrão estável)   |
| UFC/ml, CFU/ml    | - Unidades formadoras de colônias por mililitro (" <i>Colony-forming units per mililiter</i> ") |
| VCAM, VCAM-1      | - Molécula de adesão das células vasculares (tipo 1)  |

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Fatores de risco para aterosclerose em urêmicos..... pág. 4

Tabela 2. Proteínas de reação de fase aguda..... pág. 6



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mortalidade geral e cardiovascular em pacientes americanos... pág. 2
- Figura 2. Síndrome M.I.A.: Má nutrição, inflamação e aterosclerose..... pág. 4
- Figura 3. Estrutura da proteína C-reativa.....pág. 11
- Figura 4. Modelo de inter-relação entre atividade inflamatória e estresse oxidativo.....pág. 14
- Figura 5. Reação de Fenton.....pág.16
- Figura 6. Ativação da NADPH oxidase na hemodiálise.....pág. 19

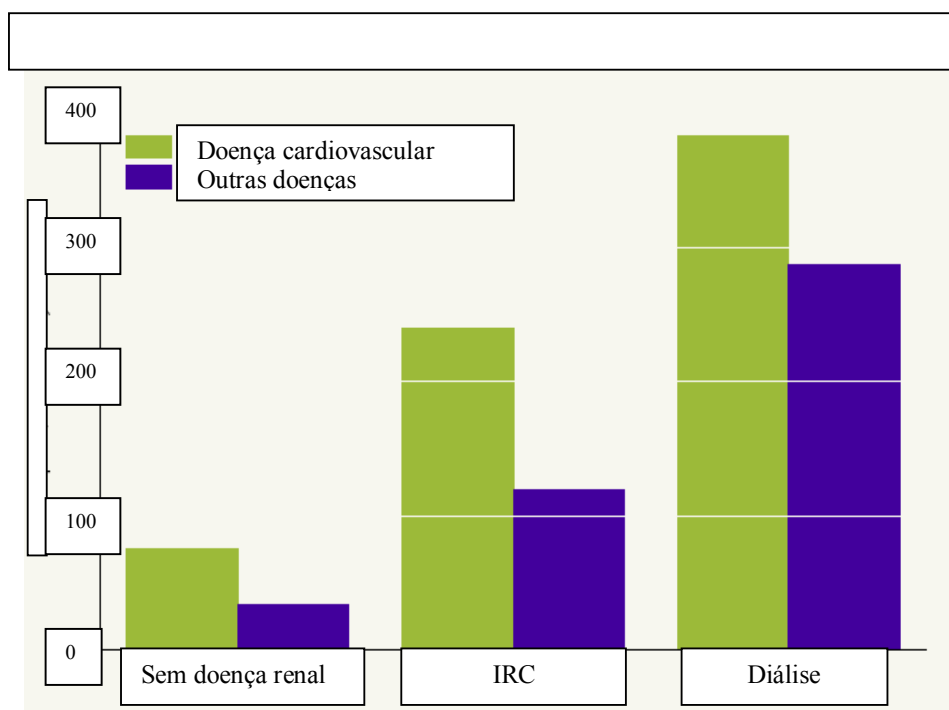
## 1. INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crônica (IRC) é uma síndrome causada por inúmeras doenças que têm em comum o fato de diminuírem a função renal de filtração glomerular (1). Independente do insulto inicial provocado pela doença de base, a lesão progride com esclerose glomerular e fibrose intersticial, levando a perda progressiva da filtração glomerular com reflexos variados e heterogêneos nas outras funções renais: tubulares, metabólicas, hormonais, homeostáticas em geral (2, 3). Em sua fase final, a IRC produz alterações em todo o organismo, com repercussões digestivas, neurológicas, cardiológicas, pneumológicas, imunológicas, hematológicas, endócrinas e metabólicas, cutâneas e osteomusculares, entre outras (4).

O surgimento dos processos de depuração extra-renal através de diálise e métodos correlatos permitiu a manutenção da vida em pacientes com função renal esgotada, o que se tornou uma rotina em todo o mundo a partir da década de 60. Hoje, no Brasil, cerca de 50.000 pessoas com função renal terminal permanecem vivas apenas por seguirem algum programa de diálise, particularmente a hemodiálise (5). A diálise possibilitou o transplante renal, que adicionou qualidade de vida, sobretudo a pacientes jovens, e esse conjunto de medidas permitiu aumento da sobrevivência de milhões de doentes renais em todo o mundo, provocando um grande avanço na Nefrologia na segunda metade do século XX. Por outro lado, a sobrevivência com insuficiência renal crônica parcialmente compensada pela diálise fez surgir complicações crônicas da uremia que foram progressivamente sendo melhor compreendidas nas últimas décadas (4). Um bom exemplo disso é a osteodistrofia renal, que acontece em pacientes em diálise crônica, e cuja prevenção vem sendo conseguida cada vez de forma mais eficiente. Outros exemplos de complicações que vêm sendo combatidas

com sucesso são: intoxicação por alumínio e sua prevenção com tratamento de água; anemia e seu controle com eritropoetina recombinante e reposição de ferro; desnutrição e sua melhora com diálise de boa qualidade e orientação nutricional.

Entretanto, apesar de todos esses avanços, a mortalidade na insuficiência renal crônica terminal permanece elevada (figura 1). A expectativa de vida para doentes renais crônicos terminais em diálise, segundo estatísticas americanas (6) é reduzida de 60 a 80 %, independente da faixa etária. O transplante melhora esta sobrevida, em parte por lidar com uma população mais selecionada, mas não normaliza a expectativa de vida. A mortalidade por insuficiência renal crônica se assemelha à de alguns tipos agressivos de câncer.



**Figura 1. Mortalidade em pacientes americanos acima de 65 anos sem doença renal, com doença renal crônica e em diálise ( mortes por mil pacientes-ano ). Modificado de (6).**

Portanto, apesar de todos os avanços da Nefrologia nos últimos cem anos, a IRC permanece incurável, progressiva, letal e causadora de inúmeros custos sociais, familiares e pessoais.

### **1.1. Inflamação, aterosclerose e doença cardiovascular na insuficiência renal crônica**

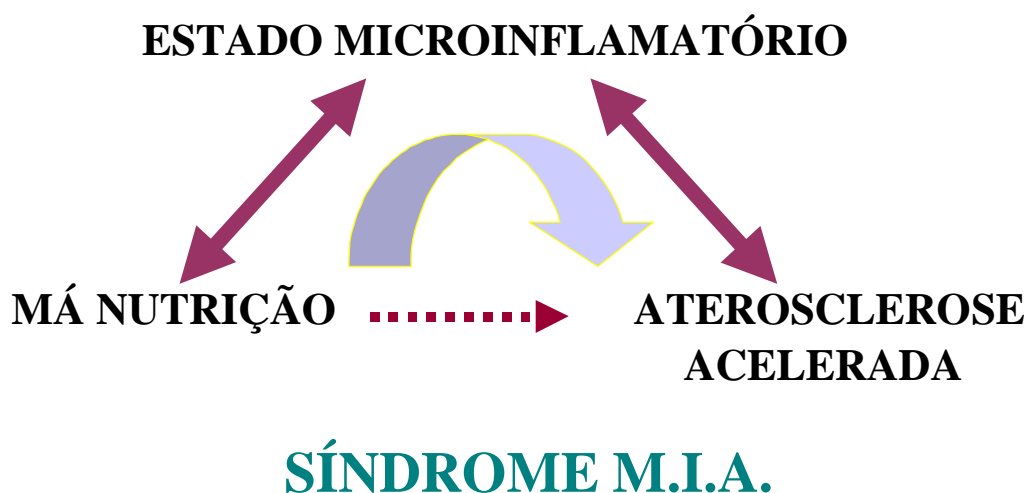
Dentre as inúmeras complicações da IRC, destaca-se a doença cardiovascular, a principal causa de morte em pacientes urêmicos sob tratamento dialítico (6-8). A aterosclerose é uma situação presente na maioria dos pacientes com IRC, que estão expostos a diversos riscos (tabela 1) muitas vezes associados à própria gênese da doença renal de base: hipertensão arterial, diabete, dislipidemia, tabagismo. Além disso, a insuficiência renal agrava alguns desses fatores, como a hipertensão e a dislipidemia, e introduz outros, como a hiperhomocisteinemia (9). Demonstrou-se que a IRC é um fator de risco independente para aterosclerose (10, 11). Mais recentemente, constatou-se também que pacientes urêmicos têm atividade inflamatória aumentada, o que tem sido um fator de risco adicional importante para aterosclerose (12, 13). Entre inúmeros achados, constatou-se que a atividade inflamatória se correlaciona com o número e a extensão de placas carotídeas, que a medida da proteína C reativa (PCR), um importante marcador dessa atividade, prediz doença cardíaca aterosclerótica em homens normais e em pacientes dialisados (13) e que a atividade inflamatória altera o colesterol HDL e aumenta o colesterol LDL oxidado.

Baseado em trabalhos que associavam albumina baixa a menor sobrevida em diálise, o paradigma tradicional dizia que a uremia, e talvez o seu tratamento inadequado levavam a um estado de má nutrição, que propiciava maior morbi-mortalidade em diálise (14).

**TABELA 1. Fatores de risco para aterosclerose em pacientes urêmicos.**

| <b>Fatores de risco tradicionais</b> | <b>Fatores de risco não tradicionais</b>                  |
|--------------------------------------|---|
| Sexo masculino*                      | Hipervolemia*   |
| Idade: Homens > 45 anos*             | Fatores trombogênicos (fator de von Willebrand e outros)* |
| Mulheres pós-menopausa               | Produto cálcio X fósforo, PTH*                            |
| Diabete melito*                      | Inflamação crônica (PCR e outros marcadores)*             |
| Hiperlipidemia*                      | Homocisteína*   |
| Tabagismo*                           | Hipercatabolismo, desnutrição*                            |
| Hipertensão arterial sistêmica*      | Infecções ( <i>Chlamydia pneumoniae</i> e outras)*        |
| Obesidade*                           | Óxido nítrico*  |
| Sedentarismo*                        | Produtos finais de glicosilação avançada*                 |
| Hereditariedade                      | Dimetil arginina assimétrica*                             |
| Estilo de vida                       | Proteinúria*  |
|                                      | Fibrinogênio  |
|                                      | Anemia*   |
|                                      | Marcadores de estresse oxidativo*                         |
|                                      | Redução da filtração glomerular *                         |
|                                      | Atividade do sistema renina-angiotensina*                 |

Observações: \* Fatores presentes com frequência aumentada em pacientes urêmicos.  
PTH = paratormônio; PCR = proteína C-reativa.



**Figura 2.** Comprovou-se que a relação entre má nutrição e aterosclerose acelerada observada em pacientes urêmicos está relacionada a um estado microinflamatório crônico. Baseado em (15).

De fato, se sabia há algum tempo que a hipoalbuminemia era fator de risco importante para morte em urêmicos. Posteriormente, trabalhos de Bergström e colaboradores (15) mostraram que a albumina é apenas um fator interveniente, e que o verdadeiro fator de risco para mortalidade geral, e em especial cardiovascular, é a atividade inflamatória medida pelos níveis de PCR (16, 17), um estado microinflamatório crônico encontrado em grande parte dos pacientes urêmicos. Assim, em modelos multifatoriais que avaliaram fatores de risco para morte em diálise, a PCR, um marcador de resposta inflamatória, estava fortemente associada a baixa sobrevida e a hipoalbuminemia, e o efeito desta última sobre a mortalidade era atenuado (18). Por outro lado, havia também uma correlação entre má-nutrição e microinflamação, fechando o círculo causal que tinha sido iniciado no passado. Cunhou-se, então, o termo síndrome MIA: má nutrição, inflamação e aterosclerose (19). A atividade inflamatória estaria na gênese da desnutrição e da hipoalbuminemia, da doença cardiovascular e de outros problemas associados, como resistência à eritropoetina e resistência à insulina (20).

Pacientes urêmicos, especialmente aqueles em tratamento dialítico (hemodiálise ou diálise peritoneal) têm marcadores inflamatórios alterados, associados a uma reação de fase aguda. Esta reação é uma resposta inespecífica primordial dos seres vivos, que induz à alteração de proteínas, chamadas proteínas de reação de fase aguda (tabela 2). Assim, proteínas de fase aguda positivas, como a PCR e outras têm seus níveis aumentados nestes pacientes (21). Outras substâncias de fase aguda negativas têm seus níveis diminuídos, como a albumina e outras (21). Além disso, essa atividade inflamatória parece ser induzida no fígado por citocinas que estão também elevadas, como interleucina-6, interleucina-1, fator de necrose tumoral alfa e outras. As causas para estimulação destas citocinas não são

conhecidas, mas várias possibilidades existem (21): o próprio estado urêmico, infecções comuns nestes pacientes (HCV, infecções estafilocócicas ou fúngicas, periodontites, outras), o contato com o sistema extracorpóreo de diálise, como linhas e filtros capilares com membranas não idealmente compatíveis, contaminação por resíduos da água usada no dialisato, principalmente o pirogênio (22), desnutrição, as doenças renais de base e comorbidades presentes.

**TABELA 2. Proteínas de reação de fase aguda**

| <b>Proteínas de fase aguda "positivas"</b>   | <b>Proteínas de fase aguda "negativas"</b> |
|--|--|
| $\alpha$ -1-antitripsina (4 X)   | Albumina                                   |
| $\alpha$ -1-antiquimiotripsina (6 X)   | Pré-albumina                               |
| Fatores de coagulação (8 X), como fator VIII, fibrinogênio, protrombina, plasminogênio | Colesterol                                 |
| Fatores do complemento (2 X)   | Lipase lipoprotéica                        |
| Haptoglobina (8 X)   | Transferrina                               |
| Hemopexina (2 X)   | Apolipoproteína AI                         |
| Ferritina (4 X)  | Apolipoproteína AII                        |
| Ceruloplasmina (4 X)   |  |
| Glicoproteína $\alpha$ -1-ácida (4 X)  |  |
| Proteína C-reativa (1.000 X)   |  |
| Amilóide sérico A (1.000 X)  |  |

Observações: Entre parênteses, a magnitude de elevação da proteína. Modificado de [www.axis-shield-poc.com/part1.htm](http://www.axis-shield-poc.com/part1.htm) e (21).

## **1.2. Importância da aterosclerose no paciente urêmico**

Pacientes com IRC apresentam incidência aumentada de eventos cardiovasculares (6), principalmente cardiopatia isquêmica, doença cerebrovascular, doença vascular periférica e calcificações vasculares. A origem destas doenças vasculares é a aterosclerose acelerada presente após o desenvolvimento da insuficiência renal crônica (7, 8, 10, 11), o que produz uma elevada morbidade e mortalidade. Há inúmeros fatores que induzem à formação de aterosclerose em urêmicos. Algumas doenças causadoras de IRC também são fatores de risco tradicionais para aterosclerose, em especial hipertensão arterial sistêmica e diabetes melito. Doenças causadoras de síndrome nefrótica podem cursar com períodos prolongados de hipercolesterolemia. Alguns fatores de risco estão associados a doença vascular e a progressão da IRC: tabagismo, hipertensão, síndrome plurimetabólica, hiperuricemia e fatores genéticos. Aterosclerose e IRC são mais frequentes em homens e têm incidência aumentada com a idade. A uremia traz alterações metabólicas que favorecem o desenvolvimento da aterosclerose por fatores de risco tradicionais: dislipidemia, intolerância a carboidratos, acidose, hiperfosfatemia, elevação do produto cálcio X fósforo e hiperparatireoidismo (4). Além disso, a uremia está também associada à presença de fatores de risco "não tradicionais" (23, 24): hiperhomocisteinemia, lipoproteína (a), troponinas cardíacas, PCR e a dimetilarginina assimétrica (ADMA), conforme mostra a tabela I. Como consequência, há o reconhecimento de que a aterosclerose tem uma base etiopatogênica em um estado inflamatório crônico e no desbalanço do estado redox normal do metabolismo, o assim chamado estresse oxidativo, o que tem levantado uma nova gama de explicações fisiopatogênicas para a aterosclerose acelerada do paciente urêmico.



### 1.3. Fisiopatologia da aterosclerose

A lesão precursora da aterosclerose ocorre em crianças e jovens, e é uma lesão inflamatória, consistindo de macrófagos derivados de monócitos e de linfócitos T (25). A hipótese anterior de que a lesão inicial dependia da desnudação, ou do dano físico do endotélio vascular, foi substituída pelo conceito de disfunção endotelial, que pode ser causada por vários fatores, e cuja marca característica é a dificuldade de vasodilatação por problemas relacionados ao óxido nítrico, como será abordado adiante. De qualquer modo, a resposta homeostática do endotélio fica alterada. Há aumento de adesividade endotelial em relação a leucócitos e plaquetas, aumento de sua permeabilidade, favorecimento de suas propriedades procoagulantes em detrimento das anticoagulantes. Além disso, há produção de moléculas vasoativas, citocinas e fatores de crescimento. Tais processos parecem ocorrer mais em áreas de turbulência do fluxo sanguíneo, onde, em resposta ao estresse, ocorre expressão de moléculas de adesão, como as selectinas, moléculas de adesão intercelular (ICAM) e moléculas de adesão das células vasculares (VCAM). Essas funcionam como receptores para substâncias presentes em monócitos e linfócitos T, ocasionando sua aderência, migração e acúmulo. Quimiocinas e outras moléculas de atração, como a MCP-1, - proteína quimiotática de monócitos-1-, levam à penetração dos mononucleares na parede celular, o que é facilitado pela sua elevada permeabilidade (26). As "bandas" (*streaks*) gordurosas se constituem de macrófagos repletos de lipídios e linfócitos T (Ver células espumosas, adiante). A etapa seguinte é a migração e proliferação de células musculares lisas, que, junto com o processo inflamatório, constitui o que se chama de lesão intermediária. A continuação do processo leva a espessamento e dilatação da artéria, um processo chamado de "remodelagem" (25). A ativação de macrófagos e linfócitos persiste, em um processo que se retroalimenta através de mediadores, enzimas, citocinas e fatores de

crescimento, o que leva a necrose focal. O ciclo proliferativo desemboca na formação de tecido fibroso que recobre um núcleo de lipídios e tecido necrótico, formando uma lesão avançada (25). Em algum momento, o processo de remodelagem não consegue mais manter a patência do lúmen, e a lesão protrui para o interior do vaso, prejudicando o fluxo sanguíneo. A adesão de plaquetas pode ocorrer em qualquer momento do processo, com liberação de grânulos que contêm outros fatores de crescimento, citocinas e substâncias vasoativas, o que amplifica o processo inflamatório e pode provocar trombose.

A ruptura da placa fibrótica também pode provocar a formação de um trombo, o qual pode interromper completa e subitamente o fluxo arterial, com as conseqüências a jusante conforme o território irrigado pelo vaso. A evolução para uma placa aterosclerótica estável ou instável também depende da diferenciação das células T auxiliares em resposta a antígenos. Esta diferenciação pode ser realizada em duas direções, as células auxiliares Th1, que participam na imunidade celular e ativação de macrófagos e as células auxiliares Th2, que induzem as células B a secretarem anticorpos. As citocinas pró-inflamatórias estimulam o sub-grupo Th1, o que, além de amplificar a inflamação leva a uma limitação da síntese de colágeno, o que pode enfraquecer a cápsula fibrosa da placa, tornando-a suscetível a ruptura (28).

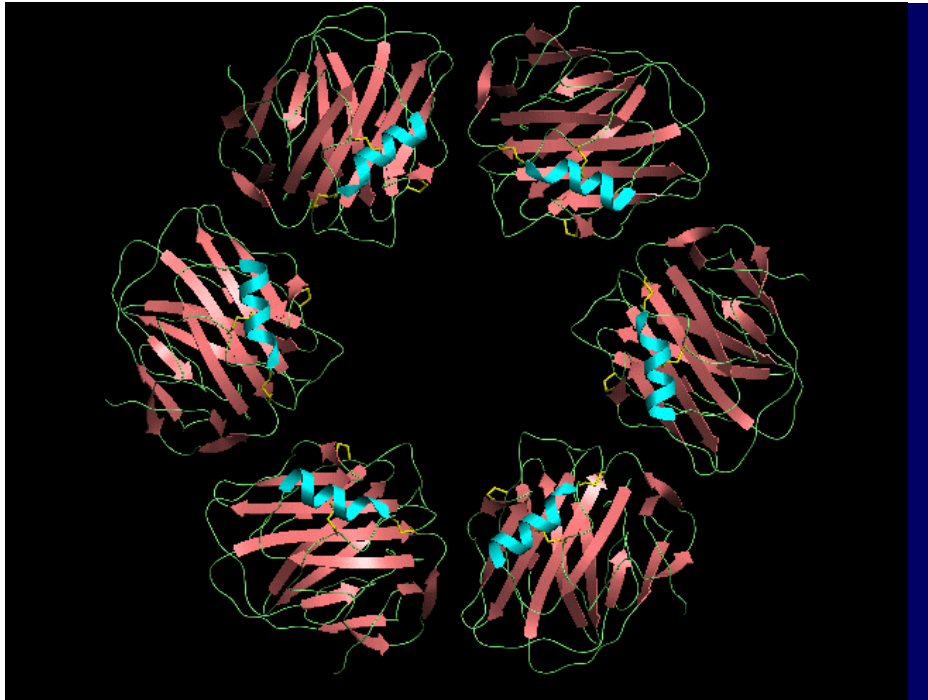
O colesterol LDL modificado por oxidação, glicação, agregação, modificação enzimática ou modificação imunológica é uma importante causa de dano endotelial. Partículas de LDL aprisionadas na parede arterial sofrem processo progressivo de oxidação e são fagocitadas por macrófagos, que as transformam, gerando as células espumosas. Estas células produzem fatores de crescimento e metaloproteinases, que induzem proliferação e alteração do colágeno (25). Além disso, o LDL modificado estimula ainda mais a proliferação mononuclear, estimula a expressão de MCP-1 em células endoteliais, favorece

a diferenciação de monócitos em macrófagos (29) e induzem macrófagos a liberarem citocinas que estimulam a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (30, 31). Este aspecto é um outro círculo vicioso de inflamação, modificação de lipoproteínas e mais inflamação. Este processo é alterado em vários pontos por antioxidantes, como a vitamina E. Por outro lado, o colesterol HDL funciona como fator protetor, promovendo efluxo de colesterol da íntima arterial, inibindo a oxidação do LDL e inibindo a expressão de moléculas de adesão. A homocisteína também é tóxica para o endotélio, sendo pró-trombótica, aumentando a produção de colágeno e diminuindo a disponibilidade do óxido nítrico. Pacientes com hiperhomocisteinemia têm risco aumentado de fenômenos ateroscleróticos (9). A angiotensina II é outra substância que participa desse processo, sendo um potente vasoconstritor, mas principalmente estimulando a hipertrofia e proliferação de células musculares lisas e ativando a lipooxigenase, que aumenta a oxidação do LDL, forma radicais oxidantes, inibe a formação de óxido nítrico e aumenta a adesão leucocitária (32). Algumas infecções, como aquelas por *Chlamydia pneumoniae*, têm sido associadas a inflamação crônica, levando também ao processo aterosclerótico. Além disso, muitas doenças inflamatórias crônicas têm sido associadas a maior incidência de aterosclerose, como artrite reumatóide (33) e lupus eritematoso sistêmico (34).

#### **1.4. Proteína C reativa, inflamação e aterogênese**

A PCR é uma proteína pentamérica, pertencente à família das proteínas pentraxinas, composta de 5 sub-unidades de 25 KDa cada (Figura 4). É o protótipo das substâncias de resposta de fase aguda e a primeira descrita. É produzida pelo hepatócito sob controle de citocinas pro-inflamatórias, especialmente a interleucina-6, mas também a interleucina-1 e o TNF-alfa. Seu nome deriva do fato de interagir com o polissacarídeo C do pneumococo.

Entre várias funções conhecidas, estão: opsonização do pneumococo, ligação à parede celular de células danificadas, ligação a produtos oriundos do músculo, em situações de trauma, ativação do complemento, agregação de lipoproteínas, estímulo a fatores teciduais por monócitos.



**Figura 3. Estrutura pentamérica da proteína C-reativa.**

Em 1996, um estudo transversal (35) demonstrou em uma população de homens entre 50 e 69 anos, que vários fatores de risco tradicionais cardiovasculares (idade, tabagismo, índice de massa corporal, colesterol total, triglicerídios, glicose) se associavam a níveis elevados de PCR. Além disso, esta se correlacionava também com sintomas de bronquite crônica, infecções por *Helicobacter pylori* ou *Chlamydia pneumoniae*, níveis de fibrinogênio, ácido siálico e apolipoproteína B. Mais interessante, houve uma forte correlação entre PCR e doença coronariana. Os autores concluíram que a resposta de fase

aguda poderia desempenhar papel importante na progressão da aterosclerose, e especularam sobre as influências de citocinas, como a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral alfa sobre a gênese deste fenômeno inflamatório. Alertavam que estudos prospectivos seriam necessários para testar esta hipótese de associação entre PCR e doença cardiovascular. Desde então, vários estudos confirmaram estes achados e a PCR passou a ser um importante marcador inflamatório e um poderoso preditor de risco cardiovascular, sendo considerado um dos principais fatores de risco "não tradicionais". Ridker e colaboradores (36) estudaram mais de 28.000 mulheres saudáveis após a menopausa por um período médio de três anos de seguimento e avaliaram o efeito de doze marcadores tradicionais e não tradicionais no desenvolvimento de eventos vasculares consistentes. De todos os fatores, a PCR foi o preditor mais forte de risco em análises univariadas. Também significantes, mas com risco relativo menor foram a interleucina-6, a homocisteína, o colesterol total, o LDL colesterol, e a razão entre colesterol total e HDL colesterol. Os marcadores inflamatórios foram preditores mais consistentes do que os relacionados a lipídios. A análise multivariada só confirmou dois fatores de risco: PCR e a razão entre colesterol total e o HDL colesterol.

Com o reconhecimento que a aterosclerose é uma doença inflamatória, a busca por marcadores foi intensa, e as pesquisas consistentemente demonstraram ser a PCR a medida preditiva mais eficiente. A PCR apresenta várias características que a tornam clinicamente útil (21). Correlaciona-se bem com outras proteínas de fase aguda e com as citocinas pró-inflamatórias. O método de dosagem é simples e tem um custo relativamente baixo, com uma variabilidade intra-ensaio pequena, de alta confiabilidade. Sua variabilidade na população é grande, até mil vezes, refletindo mais sensivelmente variações no estado inflamatório (20). Outras proteínas variam bem menos para os mesmos estímulos inflamatórios. A albumina, por exemplo, varia em torno de 20 % em média. A PCR é "ágil"

em representar o estímulo inflamatório, que pode ser transitório. Enquanto o estímulo inflamatório eleva fugazmente as citocinas circulantes, que logo voltam a valores normais, a PCR se eleva rapidamente (em até 6 a 12 horas), intensamente, e sua vida média é de 19 horas. Sua depuração é relativamente constante em variadas situações clínicas. Apesar da sua grande variabilidade no mesmo indivíduo ao longo do tempo, ela tem o poder de prever mortalidade global e cardiovascular na população em geral, bem como na população em diálise. Demonstrou-se que uma única determinação de PCR é um fator de risco cardiovascular consistente (18, 37). A PCR prediz eventos cardiovasculares, como doença coronariana, acidentes encefálicos e doença arterial periférica em pessoas inicialmente saudáveis, complicações em pacientes com doença aterosclerótica estabelecida, complicações após intervenções terapêuticas, e eventos cardiovasculares em pacientes com insuficiência renal crônica (12). A PCR tem sido associada também a resistência à insulina, à síndrome plurimetabólica, e estaria envolvida na fisiopatogênese do diabetes melito. De fato, talvez a PCR não seja simplesmente um marcador inflamatório de doença vascular, mas esteja diretamente envolvida na patogênese da aterosclerose e dos fenômenos trombóticos que a sucedem (20). Dados recentes sugerem que a dosagem seriada da PCR pode ser útil em prevenção primária, embora para prevenção secundária o seu uso clínico pareça ser mais limitado, pois não alteraria os cuidados preventivos (38). Enfim, de acordo com o "Oxford Textbook of Medicine", a PCR é considerada um "índice objetivo preciso da atividade inflamatória global e um indicativo de estímulo por citocinas subjacentes" (39).

### **1.5. Importância do estresse oxidativo**

Oxirredução é uma reação química, onde uma molécula ou átomo (o agente oxidante) retira elétrons de uma outra molécula ou átomo (o agente redutor). Oxidação é o

processo pelo qual uma substância perde elétrons. Redução é o processo pelo qual uma substância ganha elétrons. Ambas ocorrem simultaneamente, como dois lados da mesma reação. A reação de substratos oriundos dos alimentos com oxigênio molecular fornece a maior parte da energia para a célula (41). Essa energia é obtida e se torna utilizável pela

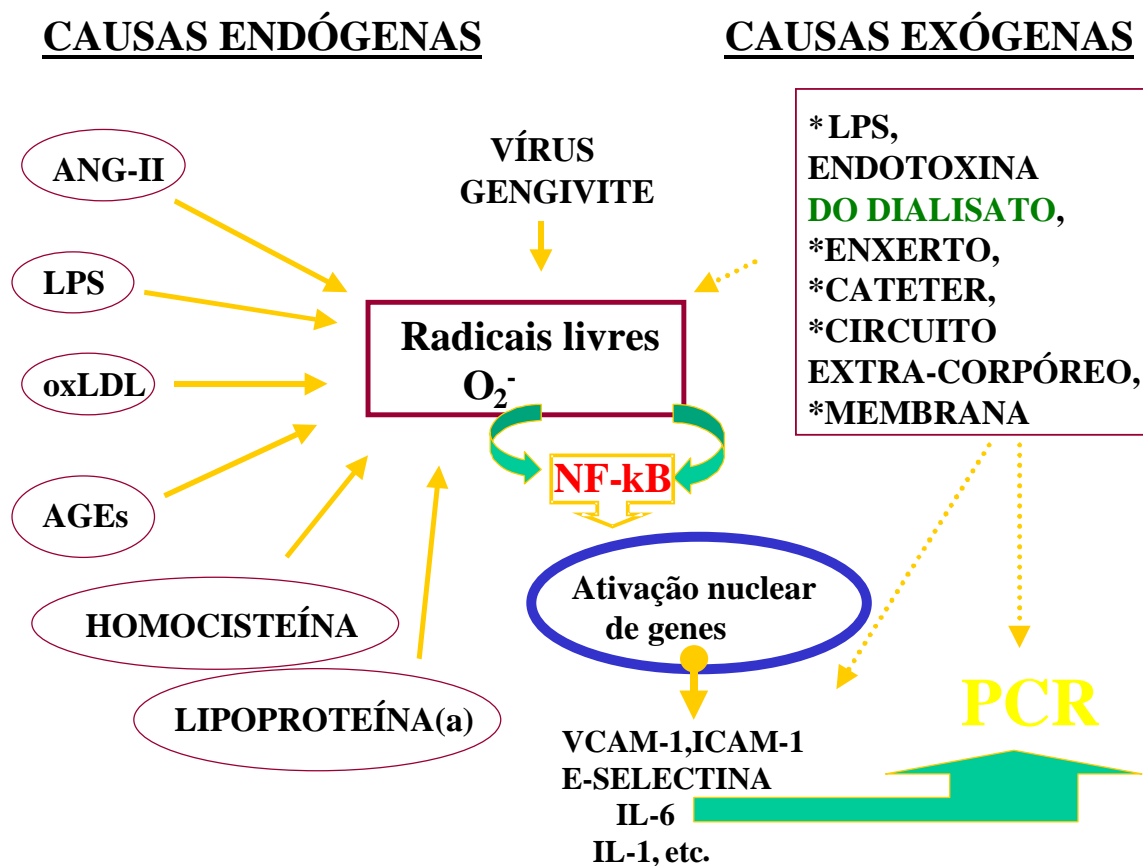


Figura 4. Causas de ativação da cascata inflamatória em pacientes urêmicos. A geração de radicais livres ocupa uma via comum na indução de moléculas inflamatórias. Por outro lado, as citocinas também estimulam a formação de radicais oxidantes (Modificado de Wanner e Metzger, 40).

fosforilação do ADP, produzindo ATP. Esse processo requer a transferência de elétrons dos substratos para o oxigênio em várias etapas, usando agentes oxidantes cada vez mais fortes.

Os processos de fosforilação e transferência de elétrons estão acoplados, e um não pode ocorrer sem o outro (41). Enzimas de fosforilação estão presentes na membrana interna das mitocôndrias, onde também ocorrem as reações de oxirredução. Um transportador é reduzido pela adição de elétrons e então reoxidado, transferindo os elétrons ao próximo transportador, que fica então reduzido, e assim sucessivamente. No início da cadeia de transferência de elétrons está o fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADP), que recebe elétrons dos substratos oriundos da alimentação, ficando reduzido (NADPH). A seguir, o NADPH se reoxida, reduzindo uma flavoproteína e ficando disponível para uma nova reação. Neste processo, é liberada energia química, que é utilizada para fosforilação do ADP, e transformação em ATP. No final da cadeia de transferência de elétrons, três moléculas de ATP são formadas, e o oxigênio fica em sua forma reduzida final, a água (41).

As espécies reativas de oxigênio são produtos dos processos metabólicos normais das células. As cadeias de transporte de elétrons nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático deixam escapar radicais com capacidade oxidante. Em baixas concentrações, essas espécies reativas de oxigênio são mediadoras fisiológicas de respostas celulares, como ativação de linfócitos. Entretanto, em concentrações elevadas produzem dano celular e aparentemente estão envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças, como diabetes melito, hipertensão, aterosclerose, amiloidose, má-nutrição, anemia e infecções de pacientes em diálise, doenças inflamatórias crônicas e nefrites (42) (Figura 4). O sistema citocromo C oxidase é um eficiente sistema redutor de oxigênio que transforma oxigênio molecular em água em apenas um passo, com adição de quatro elétrons. Entretanto, uma parte do oxigênio usado no metabolismo é reduzido em etapas, com um elétron por vez. Assim, oxigênio molecular com um elétron se transforma em radical superóxido. Este



recebe mais um elétron numa reação chamada de dismutação, catalizada pela enzima superóxido dismutase (SOD) e se transforma em peróxido de hidrogênio. Um novo elétron se agrega, através de reações que envolvem metais de transição, como cobre e ferro (reação de Fenton) e forma o radical hidroxila, que é altamente reativo (Figura 5). Finalmente, o último elétron produz água. Estes compostos intermediários têm alto poder oxidante, especialmente o radical hidroxila. São também chamados de radicais livres, pois podem ter existência independente com um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais externos, o que os torna muito reativos, podendo interagir com outras moléculas orgânicas.



**Figura 5. Reação de Fenton, pela qual os íons ferroso ou cúprico reagem com o peróxido de hidrogênio e formam o radical hidroxila, altamente reativo.**

Existem substâncias antioxidantes, que, em baixas concentrações, retardam ou evitam a oxidação de algum substrato. Elas mantêm sob controle a concentração de espécies reativas de oxigênio e preservam a atividade celular. Podem ser enzimas que metabolizam radicais livres, como a própria superóxido dismutase, e também a catalase e as peroxidases, especialmente a glutatíon peroxidase, importante porque o glutatíon é regenerado pela interação com o NADP oxidado através da enzima glutatíon redutase. A glutatíon peroxidase tem duas formas: uma que usa selênio como cofator e outra selênio-independente. Em pacientes com doença arterial coronariana, um baixo nível de atividade da glutatíon peroxidase 1 de eritrócitos está independentemente associada a risco aumentado de eventos cardiovasculares (43). Algumas proteínas agem como antioxidantes diminuindo a disponibilidade de íons ferro e cobre, como as transferrinas e haptoglobinas. A albumina é o principal alvo proteico do estresse oxidativo em pacientes urêmicos em

diálise ou em tratamento conservador (44). Também têm este efeito outras substâncias de baixo peso molecular, como o glutatíon, o alfa-tocoferol (vitamina E), o ácido úrico, a bilirrubina e o ácido ascórbico (vitamina C). A vitamina E é o principal agente lipossolúvel responsável pela proteção dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares contra oxidação por espécies reativas de oxigênio. A oxidação do alfa-tocoferol produz o tocoferil, que reage com o ascorbato (vitamina C) facilmente. O ascorbil resultante é hidrossolúvel e pode ser eliminado pelo organismo ou regenerado pelo sistema NADP.

Esse processo ininterrupto de consumo de oxigênio, com resultante produção de energia (ATP) e água, produz continuamente espécies reativas de oxigênio, que devem ser combatidas pelo sistema de defesa antioxidante. Em condições normais, ocorre um equilíbrio entre os dois sistemas. No entanto, quando ocorre aumento de produção de oxidantes (espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, e compostos clorinados), diminuição das defesas anti-oxidantes ou ambas as situações, existe o chamado estresse oxidativo. Este pode danificar os sistemas biológicos por lipoperoxidação de membranas celulares, degradação de proteínas, inativação de enzimas ou dano ao DNA. As espécies reativas de oxigênio induzem apoptose em células mesangiais glomerulares e em células musculares lisas dos vasos (45, 46).

O fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B é importante na expressão de muitos genes que modificam a transcrição de proteínas envolvidas no controle do processo apoptótico, no desenvolvimento de células B e T, nas respostas antivirais e antibacterianas, em respostas a múltiplos estresses, no desenvolvimento embrionário e em respostas inflamatórias. Produtos decorrentes da ativação do NF-  $\kappa$ B incluem citocinas inflamatórias importantes no recrutamento e na ativação de leucócitos, fator de necrose tumoral, óxido nítrico sintase e outros. Com isso ele interfere na regulação do tônus vascular, expressão de moléculas de

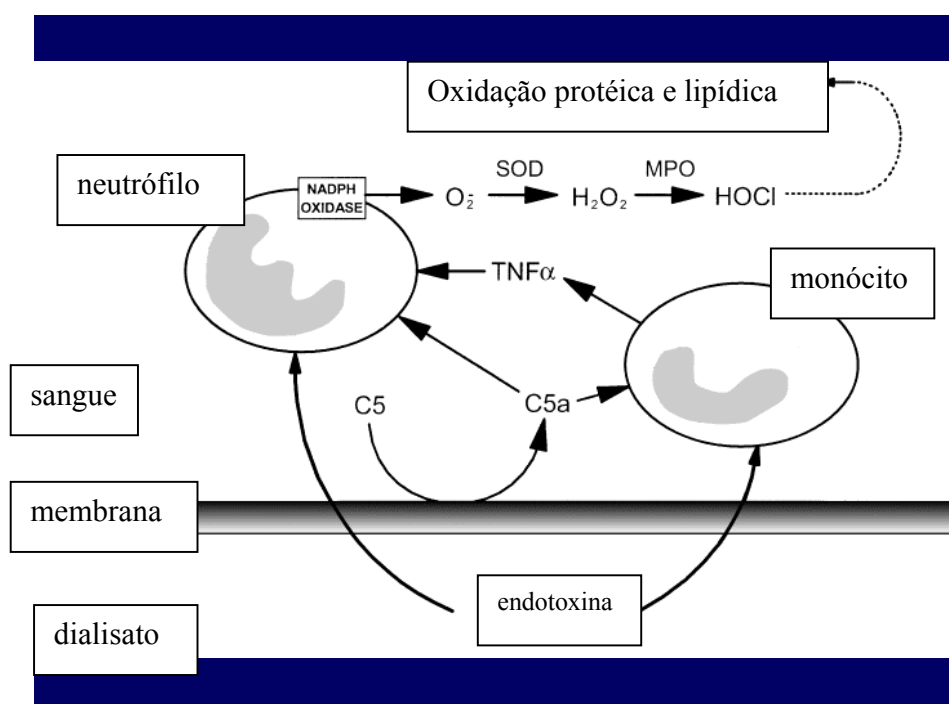
adesão celular envolvidas nas respostas inflamatórias, e ativação viral tal como acontece com o vírus da imunodeficiência humana.

Radiação ultra-violeta, tabagismo, ozônio, citocinas inflamatórias e muitos outros estímulos ativam o NF- $\kappa$ B. Esta ativação parece ser mediada através da produção de espécies reativas de oxigênio (Figura 4). O NF- $\kappa$ B existe no citosol como um complexo trimérico pré-formado. O dímero protéico P50/P65 está associado com uma proteína inibitória, conhecida como I- $\kappa$ B. Substâncias oxidantes desencadeiam uma alteração na célula que resulta em fosforilação da sub-unidade I- $\kappa$ B. Após esta fosforilação, um processo de digestão proteolítico desta sub-unidade é ativado, o que resulta no seu deslocamento do heterodímero P50/P65 e na migração do NF- $\kappa$ B ao núcleo, onde se liga ao DNA, iniciando a transcrição. Tioredoxina reduzida é um componente essencial para a redução do NF- $\kappa$ B ativado que permite sua ligação com o DNA. Há muitos passos que são sensíveis ao sistema redox nas rotas transdutoras de sinais. A ação dos oxidantes pode ser contraposta por antioxidantes, como a vitamina E e o ácido dihidrolipóico, os quais modulam a ativação do NF- $\kappa$ B.

### **1.6. Estresse oxidativo na uremia**

A insuficiência renal crônica está associada a diversas alterações no equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes. Diversos estudos demonstram que há estresse oxidativo em pacientes com insuficiência renal crônica terminal. (42, 47) As reduções de atividade da superóxido dismutase, da glutatíon peroxidase e da catalase têm sido descritas (43). Níveis espontâneos e estimulados de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio intracelulares estão aumentados na IRC, mas não se alteram após uma sessão de hemodiálise com membrana biocompatível (42, 43). Um aspecto fundamental parece ser a preparação

("priming") de polimorfonucleares de pacientes urêmicos para a liberação de espécies reativas de oxigênio. Este processo, considerado uma resposta adaptativa apropriada, produz uma explosão ("burst") de atividade respiratória dependente do complexo NADPH oxidase, sistema enzimático que induz à formação de ânion superóxido, de peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e cloraminas (47) (Figura 6). Essa reação oxidativa provavelmente é importante do ponto de vista patológico, especialmente para a ruptura de placas ateroscleróticas, o que foi reforçado recentemente por um estudo que evidenciou que uma única medida de mieloperoxidase plasmática, uma enzima abundante em leucócitos e crítica para desestabilização da placa, é preditora de risco de infarto do miocárdio e outros



**Figura 6.** A retrofiltração de endotoxinas do dialisato e a ativação de complemento pela membrana do dialisador estimulam polimorfonucleares a produzirem radicais oxidantes, através das enzimas NADPH oxidase, superóxido dismutase (SOD) e mieloperoxidase (MPO).

eventos cardíacos maiores em pacientes com dor torácica (48). Tais reações oxidativas, benéficas para exterminar bactérias, estão exacerbadas na IRC e são deletérias. Os fatores causadores desta resposta exagerada não são claros, mas suspeita-se que sejam toxinas urêmicas.

Aparentemente, o sistema extracorpóreo de diálise também pode induzir a atividade pró-oxidante, especialmente com sistemas bioincompatíveis. A importância da contaminação bacteriana do dialisato na produção de fatores pró-oxidantes é menos clara (49).

A água ultrapura reduz fatores inflamatórios, que podem estar relacionados ao estresse oxidativo (50). Por outro lado, um grupo de pesquisadores de Taiwan desenvolveu um sistema de tratamento de água para hemodiálise que produz água com atividade redutora. Esta "água reduzida eletrolizada" teria capacidade de reduzir as espécies reativas de oxigênio e diminuir o estresse oxidativo da uremia terminal. De fato, o uso deste tratamento provocou aumento das defesas antioxidantes, redução do peróxido de hidrogênio e do hipoclorito, como também redução de marcadores inflamatórios (51). Shimomura e colaboradores demonstraram em diabéticos urêmicos em hemodiálise que só os níveis mais elevados de superóxido dismutase extra-celular diminuem com uma sessão de hemodiálise. Neste estudo houve uma correlação positiva entre os níveis de superóxido dismutase e os níveis de ácidos graxos livres e da massa de lipase lipoproteica. Além disso, os níveis foram maiores em pacientes hemodialisados há mais de 20 anos (52). Entretanto, Blankenberg e colaboradores não encontraram valor prognóstico da superóxido dismutase para eventos cardiovasculares em pacientes com suspeita de doença arterial coronariana (43). Outros autores não encontraram diferenças nos níveis séricos de carbonilas, que refletem a oxidação proteica e de malondialdeído, que refletem a oxidação lipídica. Além

disso, encontraram aumento na atividade antioxidante total (53). Provavelmente diferenças metodológicas possam explicar estas discrepâncias, já que o efeito oxidante não é generalizado na bioquímica de pacientes urêmicos. Por exemplo, Himmelfarb e colaboradores encontraram níveis elevados de carbonilas protéicas em pacientes com insuficiência renal crônica, e verificaram que a albumina plasmática era significativamente mais oxidada em pacientes com IRC, em hemodiálise ou não, do que em controles, mas não detectaram nestes pacientes oxidação significativa de transferrina, fibrinogênio e imunoglobulinas (44). Já Spittle e colaboradores, avaliando marcadores de estresse oxidativo encontraram níveis maiores de F2-isoprostanos esterificados no plasma e etano no ar expirado dos pacientes urêmicos antes de uma sessão de hemodiálise, quando comparados com os controles. Houve correlação entre os níveis de F2-isoprostanos esterificados plasmáticos com os níveis de PCR (54). Outros pesquisadores também encontraram correlação entre a PCR, e os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, marcador de peroxidação lipídica (55). Além disso, esses autores encontraram correlações inversas de alfa-tocoferol com a PCR e com a duração do tratamento dialítico, concluindo que a inflamação e o tempo em hemodiálise são importantes fatores associados a estresse oxidativo em urêmicos. Por outro lado, idade, diabetes e sobrecarga de ferro não foram fatores contribuidores ao estresse oxidativo. De qualquer modo, estes autores também encontraram níveis elevados de marcadores de oxidação protéica e lipídica em pacientes em diálise, quando comparados aos controles. Também foram encontrados níveis menores do que nos controles de vários elementos antioxidantes, como o alfa-tocoferol, o ubiquinol, o ascorbato, a glutatíon peroxidase, a glutatíon redutase plasmáticos e a superóxido dismutase eritrocitária. Quando comparados aos controles, os eritrócitos de pacientes em hemodiálise apresentaram níveis maiores de

glutatião oxidado e menores de glutatião reduzido (55). Bianchi e colaboradores (56) compararam urêmicos em diálise com controles não urêmicos, detectando baixos níveis de superóxido dismutase e catalase, e níveis elevados de lipoperoxidação por quimiluminescência, de carbonilas e de nitritos. A capacidade antioxidante total foi maior em urêmicos, mas reduziu-se significativamente com uma sessão de hemodiálise. Enzimas antioxidantes e marcadores de oxidação protéica e lipídica não se alteraram com uma sessão de hemodiálise, mas os níveis de nitrito se elevaram. Os nitritos seriam produtos da oxidação do óxido nítrico, que estariam associados a dano endotelial. Entretanto, o papel do óxido nítrico não está claro, com algumas evidências apontando-o como antioxidante e outras como agente oxidante (53).

A rotina que se tornou comum de suplementação venosa de ferro em pacientes em diálise pode ser um fator adicional a contribuir para a atividade pró-oxidante, em virtude da reação de Fenton descrita anteriormente. Após a administração de ferro endovenoso, a concentração plasmática de ferro livre aumenta enormemente, antes que possa ser captado pelas suas proteínas carreadoras (57). Aparentemente isso depende da quantidade e da velocidade de administração. De qualquer modo, há evidências de estresse oxidativo em pacientes em hemodiálise recebendo ferro por via endovenosa (58). Há também uma correlação entre marcadores ecográficos de aterosclerose carotídea e produtos protéicos de oxidação avançada, níveis de ferritina sérica e carga de ferro administrada endovenosa (59). Além disso, o ácido ascórbico endovenoso usado em alguns centros para reduzir a resistência à eritropoetina em pacientes sobrecarregados de ferro poderia potencializar o efeito pró-oxidante (60).

As causas de estresse oxidativo no paciente urêmico, suas interações com outros fatores endógenos, exógenos, inflamatórios e ainda sua participação no dano endotelial que ocorre na IRC são complexas, redundantes e pouco esclarecidas (32).

Neutrófilos e monócitos podem ser ativados por produtos protéicos de oxidação avançada, e estudos recentes mostram que a atividade respiratória oxidativa de polimorfonucleares estimulada por estes produtos pode ser inibida por N-acetilcisteína, substância que supostamente impediria o dano oxidativo. Estes achados abrem novos caminhos para a abordagem terapêutica do estresse oxidativo em pacientes urêmicos (61).

### **1.7. Conexão entre disfunção endotelial, estresse oxidativo e inflamação**

O endotélio vascular não é simplesmente uma membrana passiva, mas funciona como um verdadeiro "órgão" ativo, com funções endócrinas e parácrinas. Produz substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico (ON), a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio, produz substâncias antiagregantes plaquetárias, como o ON e a prostaciclina, e produz substâncias vasoconstritoras, como a endotelina-1 e o tromboxane. Controla a coagulação, a fibrinólise, as respostas imunes, o crescimento e o tônus vasculares (32).

A disfunção endotelial é definida em um senso estrito como pouca capacidade de vasodilatação, freqüentemente associada a uma redução na atividade do ON. Há uma correlação estreita entre disfunção endotelial e o desenvolvimento futuro de aterosclerose. Pode-se detectar esta disfunção por medidas do fluxo sanguíneo no antebraço, por exemplo, antes que surjam as lesões iniciais de aterosclerose (62). É também um indicador de doença cardiovascular e um preditor prognóstico. Não se sabe se a disfunção endotelial é simplesmente um marcador de doença vascular ou se está envolvida na fisiopatologia da



aterosclerose, sendo que as evidências atuais apontam para esta última hipótese (32). Existe uma relação entre estresse oxidativo e disfunção endotelial (63). Em situações de estresse oxidativo, o excesso de radicais livres de oxigênio, especialmente o ânion superóxido, remove o ON, transformando-o em peroxinitrito (ONOO-), que pode eventualmente ser degradado em nitrato e uma hidroxila. De fato, demonstrou-se que radicais de oxigênio provocam prejuízo na dilatação dependente do endotélio (64), efeito que é bloqueado pela enzima superóxido dismutase. A infusão de vitamina C atenua o efeito vasoconstritor da angiotensina II. A angiotensina II é um potente estimulador da produção de radicais de oxigênio (45), provavelmente por estimulação da NADPH oxidase da membrana plasmática das células endoteliais e musculares lisas, mediada pelo receptor AT1. Pacientes com hipertensão reno-vascular e excesso de angiotensina II têm fluxo sanguíneo do antebraço com menor reatividade à acetilcolina, e um estudo recente demonstrou melhora após angioplastia, associada a diminuição de marcadores de lipoperoxidação (65). Além disso, a angiotensina II causa hipertrofia das células musculares lisas. Recentemente, demonstrou-se que ela produz disfunção endotelial mediada pelo radical superóxido em arteríolas de cérebro de coelhos, sugerindo que a fonte desta espécie reativa de oxigênio é realmente a NADPH oxidase (66).

Outro fator que desencadeia a disfunção endotelial é o LDL oxidado. Vários estudos experimentais demonstraram que o colesterol induz à formação do radical superóxido. Células endoteliais incubadas produzem o radical superóxido em resposta ao LDL oxidado ou à lipoproteína (a), e o LDL oxidado reduz a vasodilatação dependente do endotélio (32). Tsai e colaboradores demonstraram disfunção endotelial em voluntários saudáveis após uma refeição rica em gorduras, associada a depleção de enzimas antioxidantes e excreção aumentada de produtos oxidados. Não houve alterações nos níveis de PCR ou de moléculas

de adesão (67). O LDL oxidado, assim como a angiotensina II, também estimula a proliferação de células endoteliais, e parece haver uma sinergia entre ambos, com um elemento estimulando a expressão dos receptores celulares do outro, receptores AT1 e LOX-1, respectivamente, o que amplifica os seus efeitos.

Dois ensaios clínicos randomizados controlados por placebo, realizados em Berlim e Tel-Aviv, demonstraram algum benefício do uso de antioxidantes, acetilcisteína ou vitamina E respectivamente, na prevenção de eventos cardiovasculares em pacientes com insuficiência renal crônica terminal em hemodiálise (68, 69).

Pacientes urêmicos podem ter disfunção endotelial por vários motivos, além do estresse oxidativo: estado microinflamatório, retenção de inibidores da L-arginina, que é precursora do ON, hiperhomocisteinemia, dislipidemia, hiperglicemia, e hipertensão, entre outros (70). O tratamento hemodialítico é um fator relacionado à disfunção endotelial que tem sido estudado. Miyazaki e colaboradores (71) mostraram que uma sessão de hemodiálise prejudica a vasodilatação, e que esta se correlaciona com o nível de LDL oxidado. Além disso, o uso de dialisadores recobertos com vitamina E impede o efeito prejudicial à vasodilatação. Estes autores concluíram que a hemodiálise prejudica a função endotelial através do estresse oxidativo. Outros autores (72) demonstraram disfunção endotelial em pacientes urêmicos em diálise ou não, mas não a correlacionaram com a oxidação do LDL, mas sim com os níveis circulantes de interleucina-6, fator de necrose tumoral alfa e proteína C reativa. Adicionalmente, os pacientes em diálise apresentaram aumento dos níveis do fator de von Willebrand e de moléculas de adesão.

### **1.8. Efeito da água do dialisato sobre o estado microinflamatório e o estresse oxidativo dos pacientes urêmicos em diálise**

Além do próprio estado urêmico, pacientes com insuficiência renal crônica estão sujeitos a indução de inflamação por várias razões. A bioincompatibilidade do circuito extra-corpóreo, especialmente do dialisador é um fator reconhecidamente ativador do sistema imunológico (27). Além disso, impurezas presentes no dialisato podem passar a membrana dialisadora e atingir a corrente sanguínea, provocando alterações fisiopatológicas. Inúmeros estudos *in vitro* têm demonstrado o efeito de dialisato contaminado sobre a ativação de monócitos, indução da produção de interleucina-1 $\beta$ , de fator de necrose tumoral-alfa, e de interleucina-6 (73, 74). A endotoxemia tem sido detectada em pacientes em diálise, mas seu significado ainda é incerto (75). Um estudo demonstrou a presença de anticorpos anti-endotoxina no sangue de pacientes dialisados (76). Nubé e colaboradores interpretaram que a biocompatibilidade da membrana dialisadora é mais importante do que a contaminação do dialisato (77). Tais estudos associaram desfechos clínicos desfavoráveis, tais como mortalidade, taxa de infecções e doença cardiovascular ao uso de membranas de cuprofan e a outros fatores, como o estresse mecânico, e não ao uso de dialisato contaminado. Outros estudos, entretanto, demonstraram que o uso de dialisato ultrapuro diminuiu níveis de PCR e interleucina-6, e houve redução da necessidade de eritropoetina em pacientes em hemodiálise (78). Se considerarmos que microinflamação é uma causa de resistência a eritropoetina, pode-se valorizar esta como uma evidência indireta de atividade inflamatória. Assim, enquanto Richardson e colaboradores não conseguiram demonstrar o efeito de diferentes membranas de diálise sobre a resposta eritropoiética (79), outros evidenciaram redução de doses com uso de dialisato mais puro (80, 81). Por outro lado, Schouten e colaboradores estudaram o

efeito do dialisador e do dialisato sobre as proteínas de reação de fase aguda (82), e concluíram que o tipo de membrana, mais do que a qualidade bacteriana do dialisato era responsável pela indução da resposta de fase aguda da hemodiálise. O fato é que o dialisato com bicarbonato é contaminado por organismos gram-negativos que liberam substâncias pirogênicas, tais como endotoxinas, peptidoglicanos, exotoxinas e outros fragmentos, os quais, em conjunto com a estimulação do complemento induzida pela membrana dialisadora, ativam células mononucleares, que liberam citocinas pró-inflamatórias, que são mediadoras do estado microinflamatório crônico encontrado em pacientes urêmicos em diálise (83, 84). Assim, Schiffel e colaboradores demonstraram que o dialisato contaminado tem um impacto negativo sobre pacientes em hemodiálise, pois ao trocar para dialisato produzido com água ultra-pura, os pacientes apresentaram redução dos níveis de interleucina-6 e de PCR, além de aumentarem os níveis de albumina, a circunferência muscular do braço e o peso seco estimado (50).

Água ultra-pura pode ser definida como aquela que contém menos do que 0,1 unidades formadoras de colônias por mililitro como medida de contaminação microbiana, e menos do que 0,03 ng/ml de endotoxinas (85). A fim de se obter água ultra-pura, tem-se empregado filtros, desinfecção com raios ultra-violeta, além dos cuidados habituais de desinfecção e limpeza. De modo geral, sistemas que envolvem apenas a deionização têm perfil bacteriológico pior do que aqueles que envolvem osmose reversa (83, 85). Apesar disto, até há pouco tempo no Brasil as unidades de hemodiálise ainda usavam majoritariamente sistemas de deionização para purificar a água usada para dialisato. Ainda atualmente, cerca de 10% das unidades ainda usam este sistema (5). Em todo o mundo se discute neste momento, se nossos padrões de pureza deveriam ser melhorados, a fim de evitar complicações crônicas. Demonstrou-se que a produção de líquido de substituição

ultrapuro em hemodiafiltração reduz a liberação de fator de necrose tumoral-alfa e de interleucina-6 em pacientes urêmicos (86).

Do ponto de vista prático, a detecção de endotoxina no líquido de diálise ou na água usada para produzi-lo é feita pelo teste do lisado de amebócitos de *Limulus* (87). O *Limulus* (*Limulus polyphemus*) é um caranguejo comum na costa leste dos Estados Unidos, denominado "*Horseshoe crab*", devido à sua forma de ferradura. Seu sangue possui células transportadoras chamadas de amebócitos. O lisado destas células é capaz de provocar coagulação quando em contato com o lipopolissacarídeo, componente da parede celular de bactérias gram negativas, também chamado de endotoxina. Esta coagulação, induzida por enzimas presentes nos grânulos dos amebócitos dos caranguejos, produz um gel, típico da positividade do teste do lisado. A "*Association for the Advancement of Medical Instrumentation*" (AAMI) recomenda que a água para produção do dialisato tenha menos do que 200 unidades formadoras de colônias por mililitro, e os limites máximos de endotoxina permitidos são de 1 ng/ml (ou 5 unidades de endotoxina [EU]/ml) (88). A portaria 82/2000 do Ministério da Saúde do Brasil confirmou estes limites como os recomendados para o uso em unidades de hemodiálise no território nacional. Entretanto, outras toxinas bacterianas podem estar presentes no dialisato e não são detectadas pelo teste do lisado.

Em conclusão, o conhecimento científico atual sugere que a aterosclerose causadora da alta mortalidade cardiovascular em pacientes urêmicos está associada a vários fatores causais, incluindo um estado microinflamatório e um estado de estresse oxidativo crônicos. Além de razões ligadas à própria uremia, o procedimento de hemodiálise também pode provocar estas alterações, por mecanismos relacionados à bioincompatibilidade do sistema extra-corpóreo e à contaminação do dialisato, entre outros. Tais fatores ainda são pouco

estudados em nosso meio. Os estudos apresentados a seguir foram conduzidos para avaliar a hipótese que sistemas de tratamento de água para hemodiálise que produzam menores índices de contaminação levam a uma redução do estado microinflamatório crônico e do estresse oxidativo presentes em pacientes urêmicos em terapia renal substitutiva com hemodiálise.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thomé FS, Gonçalves LFS, Manfro RC, Barros EJG, Prompt CA, Karohl C. Insuficiência Renal Crônica. In Barros E, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LFS. Eds. Nefrologia, Rotinas, Diagnóstico e Tratamento. 2<sup>a</sup>ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda. 1999; cap.30, 423-40.
2. Mitch WE. The Progressive Nature of Renal Disease. Contemporary Issues in Nephrology, vol.14. Brenner BM, Stein JH. Eds. New York: Churchill Livingstone Inc. 1986; 293p.
3. Avram MM, Klahr S. Eds. Renal Disease Progression and Management, Role of Vasoactive Agents, Cytokines, Lipids and Nutrition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1996; 363 p.
4. Brenner BM. Ed. Brenner and Rector's The Kidney 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2000; 2800 p.
5. Sociedade Brasileira de Nefrologia. Censo - Dezembro, 2002. <http://www.sbn.org.br> (acessado em maio de 2003).
6. United States Renal Data Systems, USRDS 2003 Annual Data Report: Atlas of end-stage renal disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2003. <http://www.usrds.org/adr.htm> (acessado em agosto de 2003).
7. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. N Engl J Med 1974; 290 (13): 697-701.
8. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary artery calcification in young

- adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; 342 (20): 1478-83.
9. Yaqoob MM. Emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2002; 15 (2): 205-8.
  10. Henry RM, Kostense PJ, Bos G, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study. *Kidney Int* 2002; 62: 1402-7.
  11. Collins AJ, Li S, Gilbertson DT, Liu J, Chen SC, Herzog CA. Chronic kidney disease and cardiovascular disease in the Medicare population. *Kidney Int* 2003; 64 (S87): S24-S31.
  12. Koenig W. Update on C-reactive protein as risk marker in cardiovascular disease. *Kidney Int* 2003; 63 (S84): 58-61.
  13. Zoccali C, Benedetto FA, Mallamaci F, Tripepi G, Fermo I, Foca A, Paroni R, Malatino LS. Inflammation is associated with carotid atherosclerosis in dialysis patients. Creed Investigators. Cardiovascular Risk Extended Evaluation in Dialysis Patients. *J Hypertens* 2000; 18 (9): 1207-13.
  14. Lowrie EG, Lew NI. Death risk in hemodialysis patients: the predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities. *Am J Kidney Dis* 1990; 15: 458-82.
  15. Bergström J, Lindholm B. Malnutrition, Cardiac Disease, and Mortality: an integrated point of view. *Am J Kidney Dis* 1998; 32 (5): 834-41.
  16. Kunitoshi I, Tozawa M, Yoshi S, Fukiyama K. Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1956-60.



17. Wanner C, Zimmermann J, Schwedler S, Metzger T. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients. *Kidney Int* 2002; 61 (S80): S99-S102.
18. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA. C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000; 35 (3): 469-76.
19. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergstrom J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationship between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (7): 953-60.
20. Arici M, Walls J. End-stage renal disease, atherosclerosis, and mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int* 2001; 59: 407-14.
21. Kaysen GA. Markers of chronic inflammation in CRF and factors that influence this chronic inflammatory state. Symposium, American Society of Nephrology Annual Scientific Meeting, November 1999. <http://www.HDCN.com> (acessado em dezembro 2002).
22. Tetta C, Panichi V, Wratten ML, Palla R, Lonneman G. Plasma C-reactive protein is linked to backfiltration-associated interleukin-6 production. 44<sup>th</sup> Annual ASAIO Conference Abstract, Apr1998. *ASAIO J* 1998; 67A, 44.
23. Iliou MC, Fumeron C, Benoit MO, Tuppin P, Calonge VM, Moatti N, Buisson C, Jacquot C. Prognostic value of cardiac markers in ESRD: Chronic Hemodialysis and New Cardiac Markers Evaluation (CHANCE) study. *Am J Kidney Dis* 2003; 42 (3): 513-23.
24. Rattazzi M, Puato M, Faggini E, Bertipaglia B, Grego F, Pauletto P. New markers of accelerated atherosclerosis in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2003; 16 (1): 11-20.

25. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340 (2): 115-26.
26. Peters W, Charo IF. Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12 (2): 175-80.
27. Kaysen, G. The microinflammatory state in uremia - causes and potential consequences. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (71): 1549-57.
28. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B. Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1927-39.
29. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320 (14): 915-24.
30. Nathan, CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79 (2): 319-26.
31. Heeringa P, Cohen-Tervaert JW. Role of oxidized low-density lipoprotein in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11 (3): 287-93.
32. Galle J, Quaschnig T, Seibold S, Wanner C. Endothelial dysfunction and inflammation: What is the link? *Kidney Int* 2003; 63 (S84): 45-9.
33. Del Rincon I, Escalante A. Atherosclerotic cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5 (4): 278-86.
34. Alves JD, Grima B. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome: a gateway to atherosclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5 (5): 383-90.
35. Mendall MA, Patel P, Ballam L, Strachan D, Northfield TC. C-reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study. *BMJ* 1996; 312 (7038): 1061-5.

36. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342 (12): 836-43.
37. Wang AY, Woo J, Lam CW, Wang M, Sea MM, Lui SF, Li PK, Sanderson J. Is a single time point C-reactive protein predictive of outcome in peritoneal dialysis patients? *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (7): 1871-9.
38. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith Jr. SC, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003; 107 (3): 499-511.
39. Warrel DA, Cox TM, Firth JD, Benz Jr. EJ. Eds. *Oxford Textbook of Medicine*. 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Oxford Press. 1527-33.
40. Wanner C, Metzger T. C-reactive protein a marker for all-cause and cardiovascular mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 (suppl 8): 29-32.
41. McGilvery RW. *Bioquímica*, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1972, 789 p.
42. Tepel M, Echelmeyer M, Orle NN, Zidek W. Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis. *Kidney Int* 2000; 58: 867-72.
43. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2003; 349 (17): 1605-13.

44. Himmelfarb J, McMonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int* 2001; 60 (1): 358-63.
45. Lodha S, Dani D, Mehta R, Bhaskaran M, Reddy K, Ding G, Singhal PC. Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. *Mol Med* 2002; 8 (12): 830-40.
46. Hsieh CC, Yen MH, Yen CH, Lau YT. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 2001; 49 (1):135-45.
47. Morena M, Cristol JP, Senécal L, Leray-Moragues H, Krieter D, Canaud B. Oxidative stress in hemodialysis patients: is NADPH oxidase complex the culprit? *Kidney Int* 2002; 61: S109-S114.
48. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol E J, Nissen SE, Hazen SL. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med* 2003; 349 (17): 1595-604.
49. Ward RA, McLeish KR. Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors? *Artif Organs* 2003; 27 (3): 230-6.
50. Schifffl H, Lang SM, Stratakis D, Fischer R. Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1863-9.
51. Huang KC, Yang CC, Lee KT, Chien CT. Reduced hemodialysis-induced oxidative stress in end-stage renal disease patients by electrolyzed reduced water. *Kidney Int* 2003; 64: 704-14.

52. Shimomura H, Maehata E, Takamiya T, Adachi T, Komoda T. Blood extracellular superoxide dismutase levels in hemodialysis patients pre- and post-hemodialysis and its association with lipoprotein lipase mass and free fatty acid. *Clin Chim Acta* 2003; 328: 113-9.
53. Erdogan C, Unluçerçi Y, Turkmen A, Kuru A, Çetin O, Bekplnar S. The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 2002; 322: 157-61.
54. Spittle MA, Hoenich NA, Handelman GJ, Adhikarla R, Homel P, Le NW. Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (6): 1408-13.
55. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G, Witko-Sarsat V, Drüeke TB, Lacour B, Thévenin M. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 (2): 335-40.
56. Bianchi PD, Barp J, Belló-Klein A, Menna Barreto SS, Thomé FS. Avaliação de antioxidantes em doentes renais crônicos em hemodiálise. In Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental 2003, 18<sup>a</sup>, Pinhais. Programa e Resumos, São Paulo: FESBE, 2003 no. 07.001 - CD-ROM.
57. Roob JM, Khoschorur G, Tiran A, Horina JH, Holzer H, Winklhofer-Roob BM. Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 539-49.
58. Lim PS, Wei YH, Yu YL, Kho, B. Enhanced oxidative stress in hemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2680-7.

59. Drueke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, Descamps-Latscha B, Guerin A, Marchais SJ, Gausson V, London GM. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation* 2002; 106 (17): 2212-7.
60. Chen WT, Lin YF, Yu FC, Kao WY, Huang WH, Yan HC. Effect of ascorbic acid administration in hemodialysis patients on in vitro oxidative stress parameters: influence of serum ferritin levels. *Am J Kidney Dis* 2003; 42 (1): 158-66.
61. Witko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, Touam M, Drüeke T, Santangelo F, Descamps-Latscha B. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int* 2003; 64 (1): 82-91.
62. Vanderheyden E, Kersschot E, Paulus WJ. Pro-inflammatory cytokines and endothelium-dependent vasodilation in the forearm. *Eur Heart J* 1998; 19: 747-52.
63. Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellström B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2747-52.
64. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin-II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997; 95: 588-93.
65. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346 (25): 1954-62.
66. Didion SP, Faraci FM. Angiotensin II produces superoxide-mediated impairment of endothelial function in cerebral arterioles. *Stroke* 2003; 34 (8): 2038-42.

67. Tsai WC, Li YH, Lin CC, Chao TH, Chen JH. Effects of oxidative stress on endothelial function after a high-fat meal. *Clin Sci (Lond)* 2003 (in press).
68. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Iaina A, Knecht A, Weissgarten Y, Brunner D, Fainaru M, Green MS. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 356 (9237): 1213-8.
69. Tepel M, van der Giet M, Statz M, Jankowski J, Zidek W. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. *Circulation* 2003; 107 (7): 992-5.
70. Stenvinkel P. Endothelial dysfunction and inflammation - is there a link? *Nephrol Dial and Transplant* 2001; 16: 1968-71.
71. Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress: Effects of vitamin E-coated dialyzer. *Circulation* 2000; 101 (9): 1002-6.
72. Bolton CH, Downs LG, Victory JGG, Dwight JF, Tomson CRV, Mackness MI, Pinkney JH. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial and Transplant* 2001; 16:1189-97.
73. Hakim RM. Biocompatibility of Dialysis Membranes. In Nissenson AR, Fine RN. Eds. *Dialysis Therapy*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, Inc. 2002: 110-5.
74. Lonnemann G, Behme TC, Lenzner B, Floege J, Schulze M, Colton CK, Koch KM, Shaldon S. Permeability of dialyser membranes to TNF-alfa-inducing substances derived from water bacteria. *Kidney Int* 1992; 42 (1): 61-8.

75. Ureña P, Herbelin A, Zinggraff J, Lair M, Man NK, Descamps-Latscha B, Druke, T. Permeability of cellulosic and non-cellulosic membranes to endotoxin subunits and cytokine production during in vitro haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7 (1): 16-28.
76. Yamagami S, Adachi T, Sugimura T, Wada S, Kishimoto T, Maekawa M, Yoshimura R, Niwa M, Terano Y, Shaldon S. Detection of endotoxin antibody in long-term dialysis patients. *Int J Artif Organs* 1990; 13 (4): 205-10.
77. Nubé MJ, Grooterman MPC. Impact of contaminated dialysate on long-term haemodialysis-related complications: is it really that important? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1986-91.
78. Sitter T, Bergner A, Schiff H. Dialysate related cytokine induction and response to recombinant human erythropoietin in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1207-11.
79. Richardson D, Lindley EJ, Bartlett C, Will EJ. A randomized, controlled study of the consequences of hemodialysis membrane composition on erythropoietic response. *Am J Kidney Dis* 2003; 42 (3): 551-60.
80. Schiff H, Lang SM, Bergner A. Ultrapure dialysate reduces dose of recombinant human erythropoietin. *Nephron* 1999; 83 (3): 278-9.
81. Matsuashi N, Yoshioka T. Endotoxin-free dialysate improves response to erythropoietin in hemodialysis patients. *Nephron* 2002; 92 (3): 601-4.
82. Schouten WEM, Grooteman MPC, van Houte AJ, Schoorl M, van Limbeek J, Nubé MJ. Effects of dialyser and dialysate on the acute phase reactions in clinical bicarbonate dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 379-384.



83. Vorbeck-Meister I, Sommer R, Vorbeck F, Hörl WH. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 666-75.
84. Lonnemann G. Chronic inflammation in haemodialysis: the role of contaminated dialysate. *Blood Purif* 2000; 18 (3): 214-23.
85. Pontoriero G, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. The quality of dialysis water. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (suppl.7): vii21-vii25.
86. Guth HJ, Gruska S, Kraatz G. On-line production of ultrapure substitution fluid reduces TNF-alpha and IL-6 release in patients on hemodiafiltration therapy. *Int J Art Organs* 2003; 26 (3): 181-7.
87. Carson LA, Petersen NJ, Favero MS. Use of the Limulus amoebocyte lysate assay system for detection of bacterial endotoxin in fluids associated with hemodialysis procedures. *Prog Clin Biol Res* 1979; 29: 453-64.
88. AAMI Standard and Recommendation Practices. AAMI/DS-1 RD62. Water treatment equipment for hemodialysis applications. Association for the Advancement of Medical Instrumentation. Arlington, VA, USA; 2000: 2-32.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Avaliar marcadores de atividade inflamatória e de estresse oxidativo em pacientes urêmicos crônicos em hemodiálise e testar o efeito da contaminação da água do dialisato sobre esses parâmetros.

#### **3.2. Específicos**

1. Verificar o efeito do tipo de tratamento da água para produção do dialisato em hemodiálise, deionização versus osmose reversa, sobre a atividade inflamatória de pacientes em hemodiálise.
2. Avaliar o efeito de uma sessão de hemodiálise sobre a atividade inflamatória e o estresse oxidativo de pacientes em terapia renal substitutiva, em dois contextos: dialisato produzido com água deionizada e dialisato produzido com água tratada por osmose reversa.

#### **4. ARTIGO 1**

### **EFEITO DA MELHORA DO TRATAMENTO DA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE SOBRE O ESTADO MICROINFLAMATÓRIO DA UREMIA**

Fernando S.Thomé<sup>1</sup>

Marta Senger<sup>3</sup>

Cássio Garcez<sup>2</sup>

Joana Garcez<sup>2</sup>

Clarice Chemello<sup>2</sup>

Roberto C. Manfro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas-Nefrologia, Faculdade de Medicina,

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e Serviço de Nefrologia, <sup>3</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

#### **Endereço para correspondência:**

Nome: Fernando Saldanha Thomé

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Nefrologia

Endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030, Porto Alegre, 90035-003, RS, Brasil

Telefone: (51)3316-8295; fax (51)3332-8324

Endereço eletrônico: fernandosthome@uol.com.br

Título de cabeçalho:

Água e inflamação em hemodiálise

## Sumário

### **Efeito da melhora do tratamento da água para hemodiálise sobre o estado microinflamatório da uremia**

**Marco teórico.** Aterosclerose é uma complicação importante da insuficiência renal crônica. Além dos fatores de risco tradicionais, a microinflamação está envolvida na aterogênese, e pode estar relacionada à uremia ou ao tratamento dialítico. O papel da contaminação da água do dialisato na indução de inflamação tem sido discutido. A água obtida por deionização, que não é ultrapura, ainda é usada. Nosso objetivo foi estudar marcadores inflamatórios em pacientes em diálise com água deionizada e compará-los à situação depois da mudança do sistema de purificação de água para osmose reversa.

**Métodos.** Quarenta e sete pacientes não selecionados, em hemodiálise há mais de três meses, tiveram coletadas informações demográficas, clínicas e nutricionais, e sangue para determinação de albumina sérica, ferritina, proteína C-reativa (PCR), interleucina-6, fator de necrose tumoral-alfa, tanto antes quanto três a seis meses depois que o sistema de purificação de água foi trocado para osmose reversa. A água foi analisada mensalmente para bactérias heterotróficas e coliformes, e testes semi-quantitativos de lisado de amebócitos de *Limulus* foram realizados.

**Resultados.** A idade média foi  $58,7 \pm 15,8$  anos. Dezesseis pacientes faleceram, e comparados aos sobreviventes tinham PCR mais elevada ( $26,6 \times 11,2$  mg/l,  $p=0,007$ ), e albumina menor ( $3,1 \times 3,9$  g/dl,  $p<0,05$ ). Oito pacientes foram excluídos por condições infamatórias óbvias. Dos 23 restantes, 18 tiveram redução da PCR após a troca do sistema de tratamento de água. A mediana da PCR foi menor com a osmose reversa do que com a deionização ( $13,2 \times 4,5$  mg/l,  $p=0,022$ ). Não houve diferença em relação aos níveis de albumina, citocinas, avaliação subjetiva global ou parâmetros clínicos ou bioquímicos. A

pureza da água foi adequada com ambos os tratamentos, mas a osmose reversa produziu melhores resultados.

**Conclusões.** Apesar de níveis aceitáveis de contaminação bacteriana e endotoxinas, foi observado que pacientes urêmicos quando mudaram para diálise com água purificada por osmose reversa apresentaram uma redução clinicamente significativa dos níveis de PCR, comparados aos da diálise com água deionizada. Também foi demonstrado que pacientes que faleceram tinham maior atividade inflamatória, representada por níveis elevados de PCR.

**Palavras-chave:** hemodiálise, interleucina-6, proteína C-reativa, água para dialisato, fator de necrose tumoral-alfa, inflamação, uremia.

## **Introdução**

A ocorrência de aterosclerose acelerada em pacientes urêmicos submetidos a diálise de manutenção é reconhecida há muitos anos (1), e apesar de todos os avanços nas terapias de substituição da função renal persiste como causa importante de morbidade e mortalidade elevadas (2, 3). Este fato é apenas parcialmente explicado pelos fatores de risco tradicionais para o desenvolvimento de doença vascular, tais como dislipidemia, hipertensão arterial, e outros. Outros fatores, como a hiperhomocisteinemia, o estresse oxidativo e o estado microinflamatório têm sido reconhecidos mais recentemente (4,5), e demonstrou-se que a insuficiência renal crônica é um fator de risco independente associado ao desenvolvimento de aterosclerose (6). Um avanço importante na compreensão deste problema foi o reconhecimento da relação entre inflamação crônica, aterosclerose, e má-nutrição, chamada síndrome MIA ("*malnutrition, inflammation and atherosclerosis*") (7, 8). De fato, há vários motivos para a existência de um estado microinflamatório persistente em pacientes urêmicos, como circulação extracorpórea usando materiais bioincompatíveis, o contato com endotoxinas da água do dialisato, infecções frequentes, e provavelmente a própria síndrome urêmica. Este estado pode ser reconhecido pela indução de citocinas e elevação de proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa (PCR) (9). Esta proteína tem sido consistentemente associada a mortalidade cardio-vascular em pacientes em diálise, e é considerada o melhor marcador do estado inflamatório nos indivíduos urêmicos (10-13).

No Brasil, a água usada em hemodiálise é purificada basicamente por dois métodos, quais sejam, a deionização e a osmose reversa (14). Este estudo teve como objetivo avaliar prospectivamente a atividade inflamatória de pacientes urêmicos em terapia renal substitutiva com hemodiálise em uma unidade na qual o sistema de tratamento de água foi trocado de deionização para osmose reversa.

## **Pacientes e métodos**

Uma unidade de hemodiálise de um hospital terciário geral em Porto Alegre, RS, Brasil, foi avaliada, pela perspectiva da troca do seu tratamento purificador da água para diálise. Coletas de água para avaliação microbiológica e determinação de endotoxinas foram realizadas mensalmente e em especial logo antes da troca do sistema de deionização, assim como após a implementação do tratamento de osmose reversa. Foram realizadas culturas para bactérias heterotróficas e para coliformes. A determinação de endotoxina foi realizada pelo teste do lisado de amebócitos de *Limulus*, semi-quantitativo (15). A purificação feita por deionização consistia de uma coluna de areia, uma coluna de carvão ativado, e duas colunas de resinas, uma aniônica e outra catiônica (Sistema Permutation, Curitiba, Brasil). Um filtro microporoso era adicionado antes da entrada do circuito de distribuição para as máquinas e trocado semanalmente. O sistema de manutenção deste equipamento permitiu obter sempre uma qualidade de água dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira para hemodiálise, isto é, menos do que 200 unidades formadoras de colônias (UFC) por ml e endotoxina menor do que 1,0 ng/ml. Após a substituição, o novo sistema consistiu de uma coluna de areia, uma coluna de carvão ativado, um abrandador e um sistema de osmose reversa (Osmonics, USA).

Quarenta e sete pacientes com mais de três meses de hemodiálise crônica, que representavam 94% do total de pacientes da unidade, foram estudados antes da troca do sistema. Oito pacientes foram excluídos por apresentarem motivos óbvios para atividade inflamatória, seja na avaliação inicial ou na posterior. Os motivos para as exclusões foram a presença de cateter venoso central, infecções urinárias, infecções respiratórias, úlceras cutâneas infectadas e uma colecistite aguda. Dezesseis pacientes faleceram por causas diversas e não puderam ser reestudados. Três a seis meses após a troca do sistema de



purificação, 23 pacientes puderam ser reestudados. Dados demográficos, clínicos, laboratoriais e os que avaliam a qualidade do tratamento da água foram coletados em ambos os momentos. Além disso, procedeu-se a uma avaliação nutricional pela Avaliação Subjetiva Global (ASG) (16-18). Coletou-se amostra de soro dos pacientes antes de uma sessão de hemodiálise para determinação de albumina, PCR, interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). PCR de alta sensibilidade foi determinada por nefelometria e as citocinas por enzima imuno-ensaio (R&D Systems, Inc. EUA). O ponto de corte para definir inflamação clinicamente relevante pela PCR foi de 6 mg/l.

Os resultados são apresentados como médias $\pm$ desvios-padrões ou medianas e amplitudes. A comparação das alterações nos parâmetros foi analisada pelo teste t para amostras dependentes para variáveis quantitativas com distribuição normal ou pelo teste de Wilcoxon para a PCR e citocinas. Comparações entre amostras independentes foram feitas pelo teste t não pareado ou pelo teste de Mann-Whitney, respectivamente. O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para avaliar a associação entre diversas variáveis. O nível de significância foi 5%.

## **Resultados**

Os dados demográficos e clínicos estão demonstrados na tabela I. Havia 30 homens (64%), a média de idade era 58,7 $\pm$ 15,8 anos, 33 % dos pacientes eram diabéticos e 77 % hipertensos.

Dezesseis pacientes faleceram no período do estudo e não foram analisados após a troca do sistema de purificação de água. Quando comparados aos sobreviventes,

apresentavam níveis de PCR mais elevados ( $26,6 \text{ mg/l} \times 11,2 \text{ mg/l}$ ,  $p=0,007$ ) e menores níveis de albumina ( $3,1 \pm 0,6 \text{ g/dl} \times 3,9 \pm 0,3 \text{ g/dl}$ ,  $p<0,05$ ).

Houve uma correlação positiva entre os níveis basais de PCR e ferritina (coeficiente de correlação de Pearson  $r=0,382$ ,  $p=0,008$ ), mas não entre esses dois parâmetros e a albumina. No conjunto, os pacientes excluídos por apresentarem quadro inflamatório óbvio apresentaram uma tendência a níveis de IL-6 maiores do que os que não apresentaram condições clínicas ou intercorrências associadas a inflamação ( $11,3 \pm 12,4 \text{ pg/ml} \times 4,8 \pm 5,9 \text{ pg/ml}$ ,  $p=0,054$ ). Pacientes excluídos por possuírem cateter venoso central ( $n=6$ ) tiveram tendência a níveis mais elevados de PCR do que aqueles que dialisavam por fístula arterio-venosa ( $n=41$ ) ( $50,0 \pm 42,4 \text{ mg/l} \times 18,8 \pm 18,5 \text{ mg/l}$ ,  $p=0,056$ ). Por outro lado, fumantes ativos ( $n=6$ ) ou no passado ( $n=19$ ) apresentaram níveis mais elevados de PCR do que aqueles que nunca fumaram ( $n=22$ ) ( $37,1 \text{ mg/l} \times 18,9 \text{ mg/l}$ ,  $p<0,05$ ) (Fig.1). Não houve diferença entre níveis de PCR, IL-6 ou TNF- $\alpha$  em relação a gênero, idade, estado de portador do vírus da hepatite C, diabetes, raça, doença renal básica, hipertensão arterial ou estado nutricional pela ASG.

Vinte e três pacientes foram avaliados em condições semelhantes antes e após a troca do sistema de purificação de água. Os resultados estão apresentados na tabela II. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos escores de SGA e aos níveis de albumina, citocinas, ou aos parâmetros bioquímicos associados a adequação de diálise. Entretanto, a mediana da PCR foi significativamente menor após a troca do sistema ( $13,2 \text{ mg/l} \times 4,5 \text{ mg/l}$ ,  $p=0,022$ ). Dezoito dos 23 pacientes (78,2%) tiveram redução dos níveis de PCR. Dos 18 pacientes com PCR inicial maior do que  $6 \text{ mg/l}$ , 9 (50 %) passaram a ter níveis inferiores na medida final. A figura 2 mostra a variação dos níveis de PCR antes e

depois da substituição do tratamento de água para osmose reversa. Em um modelo de regressão simples, os níveis posteriores de PCR estavam associados negativamente aos níveis posteriores de albumina (coeficiente -0,357,  $p=0,007$ ) e positivamente aos níveis prévios de PCR (coeficiente 0,673,  $p<0.001$ ).

Foram realizadas análises de vinte amostras de água, nove quando tratada com deionizadora e onze com osmose reversa. Todos os resultados estavam dentro dos limites determinados pela legislação brasileira e pelos padrões da AAMI. A avaliação bacteriológica mostrou quatro amostras da água deionizada com menos do que 1 UFC/ml e cinco entre 10 e 185 UFC/ml, ao contrário da água tratada por osmose reversa, que teve 8 amostras com menos do que 1 UFC/ml e três entre 6 e 120 UFC/ml. Do mesmo modo, os níveis de endotoxinas em cinco amostras da água deionizada foram menores do que 0,03 ng/ml e em quatro amostras estiveram entre 0,03 e 1,0 ng/ml, enquanto que as onze amostras da água tratada por osmose reversa tinham menos do que 0,03 ng/ml.

## **Discussão**

O presente trabalho confirma observações anteriores de que pacientes urêmicos em hemodiálise têm atividade inflamatória aumentada, quando avaliados através da PCR ou de citocinas (Il-6 e TNF- $\alpha$ ) (19-23). Essa população não selecionada de pacientes apresentava um perfil de morbidade elevado, compatível com um hospital geral no qual são atendidos pacientes com prognósticos diversos. Aqueles pacientes com inflamação óbvia e com próteses vasculares provisórias apresentaram níveis elevados de PCR, demonstrando que podem existir múltiplas razões para que a população urêmica manifeste atividade inflamatória persistente. Embora não tenha sido delineado como um estudo de coorte com o

objetivo de avaliar fatores prognósticos, a elevação da PCR nos pacientes que vieram a falecer corrobora estudos anteriores que demonstraram o poder prognóstico dos marcadores de atividade inflamatória (24,25). Apesar disso, os pacientes mais inflamados não diferiram significativamente dos demais em relação a albumina e à avaliação nutricional. Possivelmente esta tenha sido uma avaliação muito grosseira em um número pequeno de pacientes para revelar alguma correlação. Entretanto, a ferritina foi nitidamente correlacionada com a PCR. Fumantes apresentaram níveis elevados de PCR também, e sabe-se que ambas as situações estão associadas a aumento do estresse oxidativo (26).

O aspecto mais importante do presente estudo reforça estudos anteriores, que mostram que a água contendo níveis aceitáveis de contaminação bacteriana é capaz de induzir atividade inflamatória (27, 28). Embora o assunto ainda seja debatido na literatura (29, 30), Shiff e colaboradores (31) demonstraram que a água ultrapura é capaz de melhorar parâmetros inflamatórios e nutricionais. Em seu estudo, a melhora nutricional foi mais evidente, talvez por tratar-se de pacientes recém iniciados em diálise, avaliados através de vários parâmetros antropométricos. Nossos pacientes mostraram uma diminuição significativa da PCR após poucos meses de tratamento com água tratada por osmose reversa. Esta água não pode ser considerada ultrapura, porque três amostras tinham mais do que 1 UFC/ml, mas parece ser claramente mais pura do que a água deionizada prévia. É importante notar que ambos os tratamentos de água foram eficientes em atingir os padrões de pureza exigidos pela legislação brasileira e pelos padrões internacionais. Entretanto, a análise de ambos os tratamentos sugeriu parâmetros melhores na água tratada por osmose reversa, embora isto não seja passível de análise estatística. A deionização sabidamente não é tão eficiente quanto a osmose reversa, mesmo quando ambos os tratamentos são mantidos em condições ideais. No Brasil, 10 % das unidades de hemodiálise não tratam a água com

osmose reversa (14), o que tem levado a complicações, como surtos de pirogenias e acidentes com cianobactérias (32).

Não foram observadas alterações significativas nos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ , provavelmente porque estas citocinas apresentam elevação muito fugaz após a indução do estímulo inflamatório, enquanto que a PCR representa melhor um estado inflamatório crônico (13). Além disso, os níveis encontrados de TNF- $\alpha$  foram muito baixos, mesmo nos pacientes com outros sinais clínicos de inflamação. Achados semelhantes foram relatados por outros autores (33, 34, 35). O TNF- $\alpha$  é uma citocina muito precoce e fugaz na cascata inflamatória. (36). Um dado interessante é que os níveis de PCR estabilizados após a troca do sistema de tratamento de água se correlacionaram com os níveis anteriores, sugerindo que os pacientes apresentam um padrão de atividade inflamatória dependente de outros fatores. Essa aparente "estabilidade" da PCR tem sido descrita como uma das vantagens desta dosagem, tornando-a útil como elemento prognóstico mesmo após medidas isoladas e únicas (24, 25, 37, 38), apesar de uma alta variação intra-individual (39).

Em conclusão, foi demonstrado, em um experimento natural, motivado pela troca de sistema de tratamento de água prevista em uma unidade de hemodiálise com pacientes não selecionados, que: a) pacientes que vieram a falecer apresentavam atividade inflamatória mais elevada do que os sobreviventes; b) estes sobreviventes, sem inflamação clínica óbvia, quando passaram a dialisar com um sistema de tratamento de água mais eficaz, aparentemente com menores níveis de endotoxina, apresentaram redução estatisticamente significativa e clinicamente relevante dos níveis de PCR. Isto ocorreu apesar dos dois tratamentos de água apresentarem níveis aceitáveis de contaminação bacteriana e endotoxinas. Embora vários fatores concorram para a ocorrência do estado

microinflamatório crônico em pacientes urêmicos em diálise, um baixo nível de contaminação da água do dialisato por endotoxinas bacterianas parece ser um fator importante a ser considerado, especialmente em países em desenvolvimento, onde restrições de custo podem levar ao uso de tratamentos de água menos eficientes.

## Referências bibliográficas

1. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974; 290 (13): 697-701.
2. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; 342 (20): 1478-83.
3. United States Renal Data Systems, USRDS 2003 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2003. <http://www.usrds.org/adr.htm> (acessado em agosto de 2003).
4. Yaqoob MM. Emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2002; 15 (2): 205-8.
5. Rattazzi M, Puato M, Faggini E, Bertipaglia B, Grego F, Pauletto P. New markers of accelerated atherosclerosis in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2003; 16 (1): 11-20.
6. Henry RM, Kostense PJ, Bos G, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study. *Kidney Int* 2002; 62: 1402-7.
7. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergstrom J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationship between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (7): 953-60.

8. Stenvinkel P. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome - the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 (S11): 28-31.
9. McIntyre C, Harper I, MacDougall C, Raine AE, Williams A, Baker LR. Serum C-reactive protein as marker for infection and inflammation in regular dialysis patients. *Clin Nephrol* 1997; 48 (6): 371-4.
10. Arici M, Walls J. End-stage renal disease, atherosclerosis, and mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int* 2001; 59: 407-14.
11. Wanner C, Zimmermann J, Schwedler S, Metzger T. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients. *Kidney Int* 2002; 61 (S80): S99-S102.
12. Koenig W. Update on C-reactive protein as risk marker in cardiovascular disease. *Kidney Int* 2003; 63 (S84): 58-61.
13. Kaysen GA. Role of inflammation and its treatment in ESRD patients. *Blood Purif* 2002; 20 (1): 70-80.
14. Sociedade Brasileira de Nefrologia. Censo - Dezembro, 2002. <http://www.sbn.org.br> (acessado em maio de 2003).
15. Prior R. The LAL test. In *Clinical Applications of the Limulus Amebocyte Lysate Test*. Boston: CRC Press 1990; 27-36.
16. Detsky AS, McLaughlin JR, Baker JP, Johnston N, Whittaker S, Mendelson RA, Jeejeebhoy KN. What is subjective global assessment of nutritional status? *J Parenter Enteral Nutr* 1987; 11 (1): 8-13.
17. Martins C. Protocolo de Procedimentos Nutricionais. In Riella MC, Martins C. Eds. *Nutrição e o Rim*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2001; 311-44.



18. Kalantar-Zadeh K, Kleiner M, Dunne E, Lee GH, Luft FC. A modified quantitative subjective global assessment of nutrition for dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1732-8.
19. Haubitz M, Brunkhorst R, Wrenger E, Froese P, Schulze M, Koch K. Chronic induction of c-reactive protein by hemodialysis, but not by peritoneal dialysis therapy. *Perit Dial Int* 1996; 16 (2): 158-62.
20. Cavaillon JM, Poignet JL, Fitting C, Delons S. Serum interleukin-6 in long-term hemodialyzed patients. *Nephron* 1992; 60: 307-13.
21. Pertosa G, Grandaliano G, Gesualdo L, Schena FP. Clinical relevance of cytokine production in hemodialysis. *Kidney Int* 2000; 76: S104-S111.
22. Kunitoshi I, Tozawa M, Yoshi S, Fukiyama K. Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1956-60.
23. Tetta C, David S, Mariano F, De Nitti C, Panichi, V. Alterations of the cytokine network in hemodialysis. *J Nephrol* 2001; 14 (S4): S22-9.
24. Wang AY, Woo J, Lam CW, Wang M, Sea MM, Lui SF, Li PK, Sanderson J. Is a single time point C-reactive protein predictive of outcome in peritoneal dialysis patients? *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (7): 1871-9.
25. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA. C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000; 35 (3): 469-76.
26. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, Packer L. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* 2002; 156 (3): 274-85.

27. Lonnemann G. Chronic inflammation in hemodialysis: the role of contaminated dialysate. *Blood Purif* 2000; 18 (3): 214-23.
28. Canaud B, Bosc JY, Leray H, Morena M, Stec F. Microbiologic purity of dialysate: rationale and technical aspects. *Blood Purif* 2000; 18 (3): 200-13.
29. Nubé MJ, Grooteman MP. Impact of contaminated dialysate on long-term haemodialysis-related complications: is it really that important? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1986-91.
30. Tetta C, Panichi V, Wratten ML, Palla R, Lonneman G. Plasma C-reactive protein is linked to backfiltration-associated interleukin-6 production. 44<sup>th</sup> Annual ASAIO Conference Abstract, Apr1998. *ASAIO J* 1998; 67A, 44.
31. Schifffl H, Lang SM, Stratakis D, Fischer R. Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1863-9.
32. Jochimsen EM, Carmichael WW, An Js, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CE, Antunes MB, de Melo Filho DA, Lyra TM, Barreto VS, Azevedo SM, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med* 1998; 338 (13): 873-8.
33. Tarakcioglu M, Erbagci AB, Usalan C, Deveci R, Kocabas R. Acute effect of hemodialysis on serum levels of the proinflammatory cytokines. *Mediators Inflamm* 2002; 12 (1): 15-9.
34. Malaponte G, Bevelacqua V, Fatuzzo P, Rapisarda F, Emmanuele G, Travali S, Mazzarino MC. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 release from monocytes in

- haemodialysis patients in relation to dialytic age. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1964-70.
35. D'Auria L, Bonifati C, Mussi A, D'Agosto G, De Simone C, Giacalone B, Ferraro C, Ameglio F. Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8 (4): 383-7.
36. R&D Systems. Human TNF- $\alpha$  Immunoassay. <http://www.rndsystems.com> (acessado em julho de 2003).
37. Kaysen GA. Markers of chronic inflammation in CRF and factors that influence this chronic inflammatory state. Symposium, American Society of Nephrology Annual Scientific Meeting, November 1999. <http://www.HDCN.com> (acessado em dezembro de 2002).
38. 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* 2003; 16 (2): 245-51.
39. Boenisch O, Ehmke KD, Heddergott A, Naoum C, Frei U, Schindler R. C-reactive protein and cytokine plasma levels in hemodialysis patients. *J Nephrol* 2002; 15: 547-51.

**Tabela I. Informações clínicas sobre os pacientes estudados e aqueles disponíveis para serem reavaliados após a mudança do sistema de tratamento de água.**

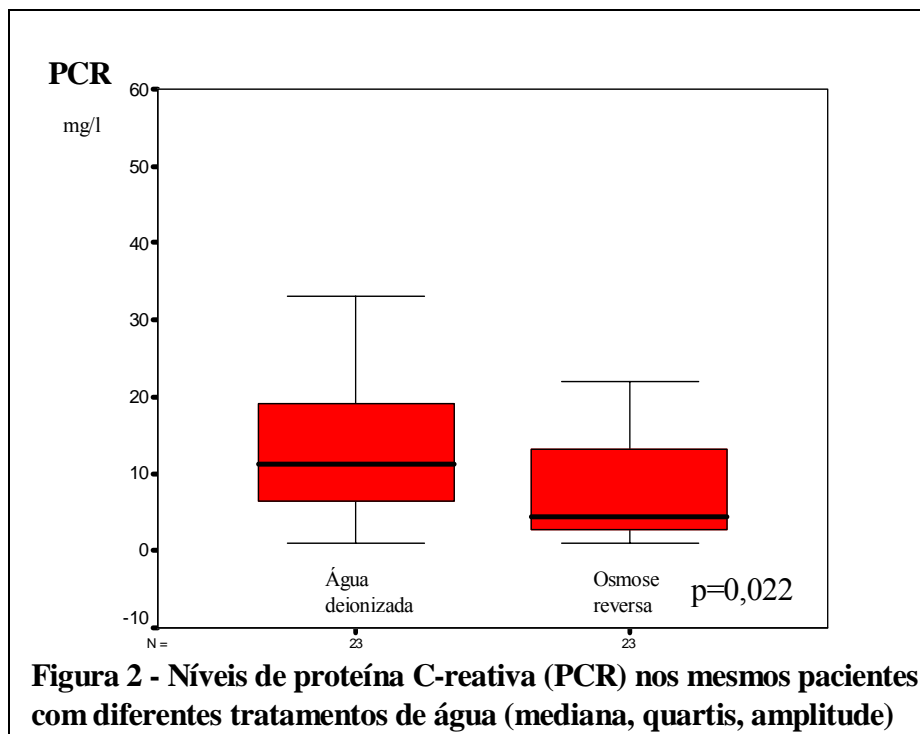
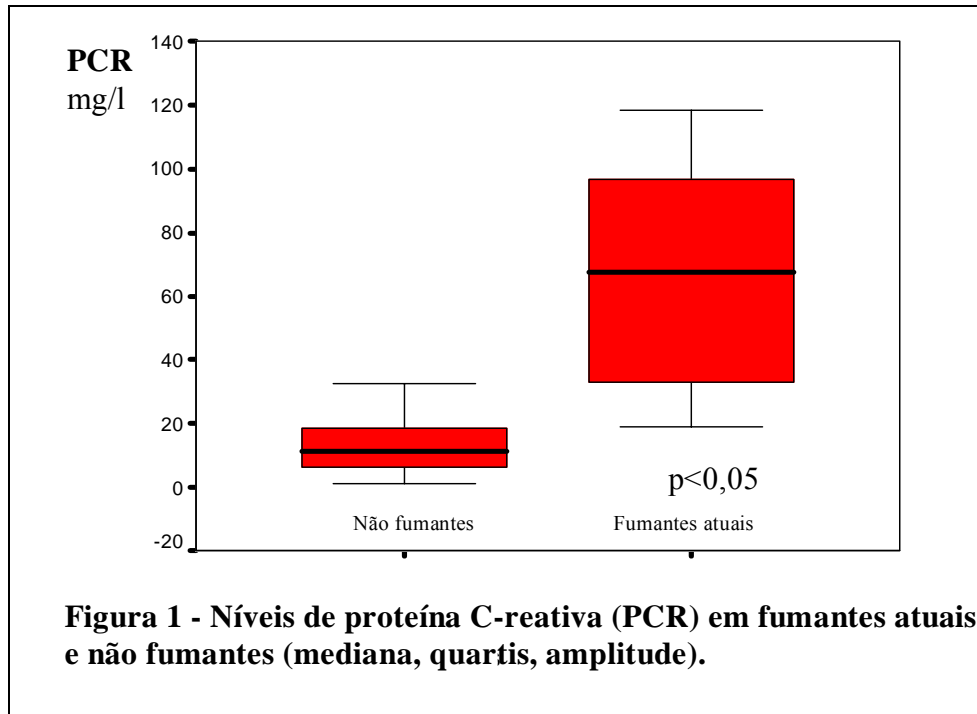
| <b>Característica clínica</b>   | <b>Pacientes totais<br/>n (%)</b> | <b>Pacientes reavaliados<br/>n (%)</b> |
|---------------------------------|-----------------------------------|--|
| Número (n)                      | 47 (100%)                         | 23 (49%)                               |
| Gênero masculino                | 30(64%)                           | 16(70%)                                |
| Diabéticos                      | 16(33%)                           | 6 (26%)                                |
| Hipertensos                     | 36(77%)                           | 17(74 %)                               |
| Fumantes atuais/no passado      | 18(38%)                           | 4 (18%)                                |
| Raça negra                      | 16(34%)                           | 6 (26%)                                |
| Cardiopatía isquêmica           | 6(13%)                            | 3 (13%)                                |
| Doença pulmonar crônica         | 6 (13%)                           | 3 (13 %)                               |
| Doença vascular periférica      | 10(21%)                           | 5 (22%)                                |
| Doença cérebro-vascular         | 6(13%)                            | 1 (4%)                                 |
| Portadores do HCV               | 19(40%)                           | 6(26%)                                 |
| Doença péptica                  | 5(11%)                            | 2 (9%)                                 |
| IMC > 25 Kg/m <sup>2</sup>      | 15(32%)                           | 10 (43%)                               |
| IMC < 20 Kg/m <sup>2</sup>      | 4(9%)                             | 0 (0%)                                 |
| Desnutrição leve/moderada - ASG | 7(15%)                            | 5 (22%)                                |
| Desnutrição grave - ASG         | 2(4%)                             | 1 (4%)                                 |

**HCV: Vírus da hepatite C; IMC: índice de massa corporal; ASG: avaliação subjetiva global.**

**Tabela II. Atividade inflamatória de pacientes em hemodiálise com sistema de tratamento de água por deionizadora e após troca para osmose reversa:**

| <b>Parâmetro avaliado</b>                  | <b>Deionizadora*</b> | <b>Osmose reversa*</b> |
|--|----------------------|------------------------|
| Inteleucina-6 (pg/ml)                      | 4,8 ± 5,9 (3,4)      | 4,6 ± 7,3 (1,9)        |
| Fator de necrose tumoral- $\alpha$ (pg/ml) | (10,3)               | (10,1)                 |
| Proteína C-reativa (mg/l)                  | 13,7 ± 9,6 (13,2)    | 9,6 ± 12,1 (4,5)**     |
| Albumina (g/dl)                            | 3,6 ± 0,6            | 3,9 ± 0,3              |
| Ferritina (ng/ml)                          | 460,2 ± 420,9        | 531,1 ± 261,7          |
| Kt/V                                       | 1,17 ± 0,4           | 1,2 ± 0,4              |
| ASG (amplitude 7-35)                       | 11,9 ± 4,1 (11,0)    | 10,5 ± 3,9 (10,1)      |

\*média ± desvio-padrão (mediana); \*\*p=0,022; ASG = avaliação subjetiva global



**5. ARTIGO 1 (TRADUÇÃO)****EFFECT OF IMPROVEMENT OF HEMODIALYSIS WATER ON THE UREMIA  
MICROINFLAMMATORY STATE**

Fernando S.Thomé<sup>1</sup>

Marta Senger<sup>3</sup>

Cássio Garcez<sup>2</sup>

Joana Garcez<sup>2</sup>

Clarice Chemello<sup>2</sup>

Roberto C. Manfro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Post Graduate Nephrology Program, School of Medicine, <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul and Division of Nephrology, <sup>3</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Correspondence:**

Name: Fernando Saldanha Thomé

Institution: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Nefrologia

Address: Rua Ramiro Barcelos, 2350, room 2030, Porto Alegre, 90035-003, RS, Brasil

Phone: (51)3316-8295; fax (51)3332-8324

E-mail: [fernandosthome@uol.com.br](mailto:fernandosthome@uol.com.br)

Running title:

Inflammation and water in hemodialysis



**Abstract****Effect of improvement of hemodialysis water on the uremia microinflammatory state**

**Background.** Atherosclerosis is a major complication of chronic renal failure. Besides traditional risk factors, microinflammation is involved in atherogenesis, and could be related to uremia or the dialytic treatment. The role of dialysate water contamination in inducing inflammation has been debated. Deionized water, which cannot provide ultrapure water is still used. Our objective was to study inflammatory markers in patients on dialysis with deionized water and compare them to the situation after changing the purification system to reverse osmosis.

**Methods.** Forty seven unselected patients on hemodialysis for more than 3 months had demographic, clinical, nutritional information collected and blood drawn for serum albumin, ferritin, C-reactive protein(CRP), interleukin-6, tumour necrosis factor-  $\alpha$ , both before and three to six months after the water purification system changed to reverse osmosis. The water was analysed monthly for heterotrophic bacteria and coliforms and semi-quantitative Limulus amoebocyte lysate tests were performed.

**Results.** Mean age was  $58.7 \pm 15.8$  years. Sixteen patients eventually died, and compared to the survivors they had higher CRP ( $26.6 \times 11.2$  mg/l,  $p=0.007$ ) and lower albumin ( $3.1 \times 3.9$  g/dl,  $p<0.05$ ). Eight patients were excluded because of obvious inflammatory conditions. From the 23 remaining patients, 18 had lower CRP after the change in the water treatment system. Median CRP was lower with reverse osmosis than with deionization ( $13.2 \times 4.5$  mg/l,  $p=0.022$ ). There was no difference in the levels of albumin, cytokines, subjective global evaluation or clinical and biochemical parameters. Water purity was adequate with both treatments, however reverse osmosis produced better results.

**Conclusions.** Despite acceptable levels of bacterial contamination and endotoxin we observed that uremic patients when changed to dialysis with reverse osmosis purified water presented a clinically significant reduction in CRP levels, as compared to dialysis with deionized water. We also showed that patients who died had higher inflammatory activity reflected by elevated CRP levels.

**Key words:** hemodialysis, interleukin-6, C-reactive protein, dialysate water, tumour necrosis factor-alfa, inflammation, uremia.

## **Introduction**

Accelerated atherosclerosis in uremic patients on dialysis is recognized for many years (1), and despite advances in renal replacement therapies remains an important cause of elevated morbidity and mortality (2, 3). This is only partially explained by traditional risk factors of vascular disease such as dislipidemia, hypertension, among others. Other factors, like hyperhomocysteinemia, oxidative stress and a microinflammatory state have been more recently recognized (4, 5), and it was shown that chronic renal insufficiency is an independent risk factor associated to atherosclerosis (6). A step forward in understanding this problem was recognizing the relationship among chronic inflammation, atherosclerosis and malnutrition, the so-called MIA syndrome ("malnutrition, inflammation and atherosclerosis") (7, 8). In fact, there are several reasons to explain a persistent microinflammatory state in uremic patients, like extracorporeal circulation using foreign bioincompatible materials, contact of blood with endotoxins from the dialysate water, frequent infections, and probably the uremic syndrome itself. This condition may be recognized by induction of cytokines and elevation of acute phase reaction proteins, like C-reactive protein (CRP) (9). This protein has been consistently associated to cardiovascular mortality in dialysis patients, and is considered the best marker of inflammation in uremic subjects (10-13).

In Brazil, water used in hemodialysis is purified basically by two methods, deionization and reverse osmosis (14). The aim of this study was to prospectively evaluate the inflammatory activity of uremic patients on hemodialysis in a unit where the water purification system was changed from deionization to reverse osmosis.

## **Patients and methods**

A hemodialysis unit of a general tertiary care hospital in Porto Alegre, RS, Brazil, was studied in relation to the change of the dialysis water purification system. Water was collected monthly for microbiologic analysis and determination of endotoxins, and specifically before the change of the deionization system and after the implementation of the reverse osmosis system. Standard cultures for heterotrophic bacteria and coliforms were done. Detection of endotoxin and semi-quantitative analysis was performed by the Limulus amoebocyte lysate test (15). Deionization included a sand column, an activated charcoal column, and two resin columns, one anionic and another cationic (Permutation System, Brasil). A micropore filter was included before the distribution circuit and was changed weekly. This equipment allowed a water quality consistently in accord to the Brazilian regulation for hemodialysis, that is less than 200 colony-forming units (CFU) and less than 1.0 ng/ml endotoxin. The new replacement system included a sand column, an activated charcoal column, a softener and a reverse osmosis system (Osmonics, USA).

Forty seven patients on chronic hemodialysis for at least 3 months, representing 94% of the total patients of the unit were studied before the water system change. Eight patients were excluded because of obvious inflammatory activity, either in the initial or in the final evaluation. Reasons for exclusion were having a central venous catheter, urinary tract infections, respiratory infections, infected cutaneous ulcers and a colecystitis. Sixteen patients eventually died due to several causes and could not be studied again. Three to six months after the change in the purification system, 23 patients were reevaluated. Demographic, clinical, laboratory data and the water parameters were collected in both moments. Also a nutritional evaluation with the subjective global assessment (SGA) (16-18) was performed. We collected patients serum before a hemodialysis session for albumin,

CRP, interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). High sensitivity CRP was determined by nephelometry and the cytokines by ELISA (R&D Systems, Inc. USA). Clinically significant inflammation was defined as CRP greater than 6 mg/l.

Results are presented as means  $\pm$  standard deviations or medians and range. Comparison of changes in parameters were analysed by a paired t-test for normal distribution variables or a Wilcoxon test for CRP and cytokines. Comparison of independent parameters in the initial or the final evaluation were analysed by an unpaired t-test or a Mann-Whitney test, accordingly. Pearson's correlation coefficient was used to analyse the association between variables. Significance was accepted at a  $p < 0.05$  level.

## Results

Clinical information from the patients is shown in table I. There were 30 men (64%), mean age was  $58.7 \pm 15.8$  years, 33 % were diabetics and 77 % hypertensives.

Sixteen patients died during the study and could not be analysed after the change in the purification system. When compared to the survivors, they had higher levels of CRP ( $26.6 \text{ mg/l}$  X  $11.2 \text{ mg/l}$ ,  $p=0.007$ ) and lower levels of albumin ( $3.1 \pm 0.6 \text{ g/dl}$  X  $3.9 \pm 0.3 \text{ g/dl}$ ,  $p < 0.05$ ).

There was a positive correlation between CRP and ferritin (Pearson's correlation coefficient  $r = 0.382$ ,  $p=0.008$ ), but not between CRP or ferritin and albumin. Patients excluded because of obvious inflammatory conditions had a trend towards a higher IL-6 levels than those who did not present clinical conditions or events associated to inflammation ( $11.3 \pm 12.4 \text{ pg/ml}$  X  $4.8 \pm 5.9 \text{ pg/ml}$ ,  $p=0.054$ ). Patients excluded because of central venous catheters ( $n=6$ ) showed a trend towards higher CRP levels than those who

dialysed by an arterio-venous fistula (n=41) ( $50.0 \pm 42.4$  mg/l X  $18.8 \pm 18.5$  mg/l,  $p=0.056$ ). On the other hand, current (n=6) or past smokers (n= 19) had higher CRP levels than those who never smoked (n=22) ( $37.1$  mg/l X  $18.9$  mg/l,  $p<0.05$ ) (Fig.1). There was no difference in CRP, IL-6 or TNF- $\alpha$  relative to gender, age, anti-HCV status, diabetes, ethnic origin, basic renal disease, arterial hypertension or nutritional status by SGA.

Twenty three patients were studied in similar conditions before and after the change in the water purification system. Results are presented in table II. There were no statistically significant differences in SGA, albumin, cytokines or other biochemical data related to dialysis adequacy. The median of CRP was significantly lower after the change ( $13.2$  mg/l X  $4.5$  mg/l,  $p=0.022$ ). Eighteen of the 23 patients (78 %) had a reduction in CRP levels. From the 18 patients with initial CRP higher than 6 mg/l, 9 (50%) had CRP<6 mg/l in the final measurement. Figure 2 shows variation of CRP levels before and after the change of the water treatment system. In a simple regression model, the final levels of CRP were negatively associated to the final levels of albumin (coefficient  $-0.357$ ,  $p=0.007$ ) and positively associated to the initial levels of CRP (coefficient  $0.673$ ,  $p<0.001$ ).

Twenty samples of water were analysed, nine treated with deionization and eleven with reverse osmosis. All results were within the limits determined by Brazilian regulation and AAMI standards. Bacteriologic investigation showed 4 samples of deionized water with less than 1 CFU/ml and five between 10 and 185 CFU/ml, while the water treated with reverse osmosis had 8 samples with less than 1 CFU/ml and three between 6 and 120 CFU/ml. The levels of endotoxin in five samples of deionized water were less than 0.03 ng/ml, and in four samples were between 0.03 and 1.0 ng/ml, while all eleven samples of water treated with reverse osmosis had less than 0.03 ng/ml.

## Discussion

This work confirms previous observations that uremic patients on hemodialysis have increased inflammatory activity, defined by increased CRP or cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ ) (19-23). Our unselected patient population presented morbidity compatible with a general hospital, in which patients with various prognostic factors are attended. Those patients with obvious inflammation or with temporary vascular catheters presented high levels of CRP, demonstrating that uremic patients may show persistent inflammatory activity for multiple reasons. Although this was not a cohort study, aiming to evaluate prognostic factors, the finding of increased CRP in patients who eventually died support previous studies that demonstrated the prognostic power of inflammation markers (24, 25). Nevertheless, patients with higher inflammatory activity did not have albumin levels or nutritional evaluation different from the others. Possibly this was a gross evaluation in a small number of patients to reveal such an association. However, serum ferritin was clearly correlated with CRP. Smokers presented elevated CRP levels, and it has been demonstrated that both smoking and inflammation are related to increased oxidative stress (26).

In agreement with previous studies our main results suggest that hemodialysis water, even with acceptable levels of bacterial contamination, is capable of inducing inflammatory activity (27, 28). This subject is still debated in the literature (29, 30). Shiff and colleagues (31) demonstrated that the use of ultrapure water leads to the improvement of inflammatory and nutritional parameters. In their study, nutritional benefit to patients just starting dialysis submitted to various antropometric measurements was evident. Our patients showed a significant reduction in CRP after a few months of treatment with reverse osmosis purified water. This water could not be considered ultrapure because three samples had more than 1 CFU/ml, but seemed much purer than the previous deionized water. It is

important to notice that both deionization and reverse osmosis were efficient in achieving water compatible with Brazilian and international standards. Our analysis suggested, however, that reverse osmosis presented better parameters, although this is not subject of statistical analysis. In fact, deionization is not as effective as reverse osmosis, even when both systems are ideally maintained. Currently in Brazil, 10 % of the hemodialysis units do not use reverse osmosis for water purification (14), and this practice has led to complications, such as pyrogen reactions outbreaks and fatal contamination with cyanobacteria (32).

We did not observe significant changes in the levels of IL-6 or TNF- $\alpha$ , probably because these cytokines tend to show a brief elevation after induction by an inflammatory stimulus, while CRP better represents a chronic inflammatory state (13). In addition, TNF- $\alpha$  levels were too low, even in those patients with other clinical signs of inflammation. Similar findings were reported by other authors (33, 34, 35). TNF- $\alpha$  is an early and evanescent cytokine in inflammatory cascade (36). It is interesting to realize that CRP levels after the change of the water purification system correlated closely to the previous CRP levels, suggesting that the patients present a pattern of inflammatory activity dependent of other factors. This fact has been emphasized before, making this protein useful as a prognostic tool, even after single, isolated measurements (24, 25, 37, 38), despite a high intra-individual variation (39).

In conclusion, we could demonstrate, in a natural experiment, provoked by the change of the water purification system in a hemodialysis unit treating unselected patients, that: a) patients who eventually died had higher inflammatory activity than the survivors; b) these survivors, without obvious clinical inflammation, when dialysing with a better water



purification system, apparently with lower levels of endotoxin, presented a significant and clinically relevant reduction of CRP levels. This occurred despite both water treatments presented acceptable levels of bacterial contamination and endotoxin. Although several causes contribute to the chronic microinflammatory state of uremic patients on dialysis, a low level of contamination of dialysate water with bacterial endotoxin may be an important factor to be considered, specially in developing countries, where cost restrictions may lead to the use of less efficient water purification systems.

## References

1. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974; 290 (13): 697-701.
2. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; 342 (20): 1478-83.
3. United States Renal Data Systems, USRDS 2003 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2003. <http://www.usrds.org/adr.htm> (accessed in Aug 2003).
4. Yaqoob MM. Emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2002; 15 (2): 205-8.
5. Rattazzi M, Puato M, Faggini E, Bertipaglia B, Grego F, Pauletto P. New markers of accelerated atherosclerosis in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2003; 16 (1): 11-20.
6. Henry RM, Kostense PJ, Bos G, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study. *Kidney Int* 2002; 62: 1402-7.
7. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergstrom J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationship between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (7): 953-60.

8. Stenvinkel P. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome - the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 (S11): 28-31.
9. McIntyre C, Harper I, MacDougall C, Raine AE, Williams A, Baker LR. Serum C-reactive protein as marker for infection and inflammation in regular dialysis patients. *Clin Nephrol* 1997; 48 (6): 371-4.
10. Arici M, Walls J. End-stage renal disease, atherosclerosis, and mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int* 2001; 59: 407-14.
11. Wanner C, Zimmermann J, Schwedler S, Metzger T. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients. *Kidney Int* 2002; 61 (S80): S99-S102.
12. Koenig W. Update on C-reactive protein as risk marker in cardiovascular disease. *Kidney Int* 2003; 63 (S84): 58-61.
13. Kaysen GA. Role of inflammation and its treatment in ESRD patients. *Blood Purif* 2002; 20 (1): 70-80.
14. Sociedade Brasileira de Nefrologia. Censo - Dezembro, 2002. <http://www.sbn.org.br> (accessed in May 2003).
15. Prior R. The LAL test. In *Clinical Applications of the Limulus Amebocyte Lysate Test*. Boston: CRC Press 1990; 27-36.
16. Detsky AS, McLaughlin JR, Baker JP, Johnston N, Whittaker S, Mendelson RA, Jeejeebhoy KN. What is subjective global assessment of nutritional status? *J Parenter Enteral Nutr* 1987; 11 (1): 8-13.
17. Martins C. Protocolo de Procedimentos Nutricionais. In Riella MC, Martins C. Eds. *Nutrição e o Rim*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2001; 311-44.

18. Kalantar-Zadeh K, Kleiner M, Dunne E, Lee GH, Luft FC. A modified quantitative subjective global assessment of nutrition for dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1732-8.
19. Haubitz M, Brunkhorst R, Wrenger E, Froese P, Schulze M, Koch K. Chronic induction of c-reactive protein by hemodialysis, but not by peritoneal dialysis therapy. *Perit Dial Int* 1996; 16 (2): 158-62.
20. Cavaillon JM, Poignet JL, Fitting C, Delons S. Serum interleukin-6 in long-term hemodialyzed patients. *Nephron* 1992; 60: 307-13.
21. Pertosa G, Grandaliano G, Gesualdo L, Schena FP. Clinical relevance of cytokine production in hemodialysis. *Kidney Int* 2000; 76: S104-S111.
22. Kunitoshi I, Tozawa M, Yoshi S, Fukiyama K. Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1956-60.
23. Tetta C, David S, Mariano F, De Nitti C, Panichi, V. Alterations of the cytokine network in hemodialysis. *J Nephrol* 2001; 14 (S4): S22-9.
24. Wang AY, Woo J, Lam CW, Wang M, Sea MM, Lui SF, Li PK, Sanderson J. Is a single time point C-reactive protein predictive of outcome in peritoneal dialysis patients? *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (7): 1871-9.
25. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA. C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000; 35 (3): 469-76.
26. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, Packer L. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* 2002; 156 (3): 274-85.

27. Lonnemann G. Chronic inflammation in hemodialysis: the role of contaminated dialysate. *Blood Purif* 2000; 18 (3): 214-23.
28. Canaud B, Bosc JY, Leray H, Morena M, Stec F. Microbiologic purity of dialysate: rationale and technical aspects. *Blood Purif* 2000; 18 (3): 200-13.
29. Nubé MJ, Grooteman MP. Impact of contaminated dialysate on long-term haemodialysis-related complications: is it really that important? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1986-91.
30. Tetta C, Panichi V, Wratten ML, Palla R, Lonneman G. Plasma C-reactive protein is linked to backfiltration-associated interleukin-6 production. 44<sup>th</sup> Annual ASAIO Conference Abstract, Apr1998. *ASAIO J* 1998; 67A, 44.
31. Schifffl H, Lang SM, Stratakis D, Fischer R. Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1863-9.
32. Jochimsen EM, Carmichael WW, An Js, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CE, Antunes MB, de Melo Filho DA, Lyra TM, Barreto VS, Azevedo SM, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med* 1998; 338 (13): 873-8.
33. Tarakcioglu M, Erbagci AB, Usalan C, Deveci R, Kocabas R. Acute effect of hemodialysis on serum levels of the proinflammatory cytokines. *Mediators Inflamm* 2002; 12 (1): 15-9.
34. Malaponte G, Bevelacqua V, Fatuzzo P, Rapisarda F, Emmanuele G, Travali S, Mazzarino MC. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 release from monocytes in

- haemodialysis patients in relation to dialytic age. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1964-70.
35. D'Auria L, Bonifati C, Mussi A, D'Agosto G, De Simone C, Giacalone B, Ferraro C, Ameglio F. Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8 (4): 383-7.
36. R&D Systems. Human TNF- $\alpha$  Immunoassay. <http://www.rndsystems.com> (accessed in Jul 2003).
37. Kaysen GA. Markers of chronic inflammation in CRF and factors that influence this chronic inflammatory state. Symposium, American Society of Nephrology Annual Scientific Meeting, November 1999. <http://www.HDCN.com> (accessed in Dec 2002).
38. 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* 2003; 16 (2): 245-51.
39. Boenisch O, Ehmke KD, Heddergott A, Naoum C, Frei U, Schindler R. C-reactive protein and cytokine plasma levels in hemodialysis patients. *J Nephrol* 2002; 15: 547-51.

**Table I. Clinical information of patients enrolled in the study and those available to be evaluated after the change in the water purification system.**

| <b>Parameter</b>            | <b>All patients studied<br/>n (%)</b> | <b>Patients re-evaluated<br/>n (%)</b> |
|-----------------------------|---------------------------------------|--|
| Number                      | 47                                    | 23                                     |
| Males                       | 30(64%)                               | 16(70%)                                |
| Diabetics                   | 16(33%)                               | 6 (26%)                                |
| Hypertensives               | 36(77%)                               | 17(74 %)                               |
| Smokers current/in the past | 18(38%)                               | 4 (18%)                                |
| African origin              | 16(34%)                               | 6 (26%)                                |
| Ischemic cardiopathy        | 6(13%)                                | 3 (13%)                                |
| Chronic pulmonary disease   | 6 (13%)                               | 3 (13 %)                               |
| Periferic vascular disease  | 10(21%)                               | 5 (22%)                                |
| Cerebro-vascular disease    | 6(13%)                                | 1 (4%)                                 |
| Anti-HCV positive           | 19(40%)                               | 6(26%)                                 |
| Peptic disease              | 5(11%)                                | 2 (9%)                                 |
| BMI > 25 Kg/m <sup>2</sup>  | 15(32%)                               | 10 (43%)                               |
| BMI < 20 Kg/m <sup>2</sup>  | 4(9%)                                 | 0 (0%)                                 |
| Malnutrition light/moderate | 7(15%)                                | 5 (22%)                                |
| Severe malnutrition         | 2(4%)                                 | 1 (4%)                                 |

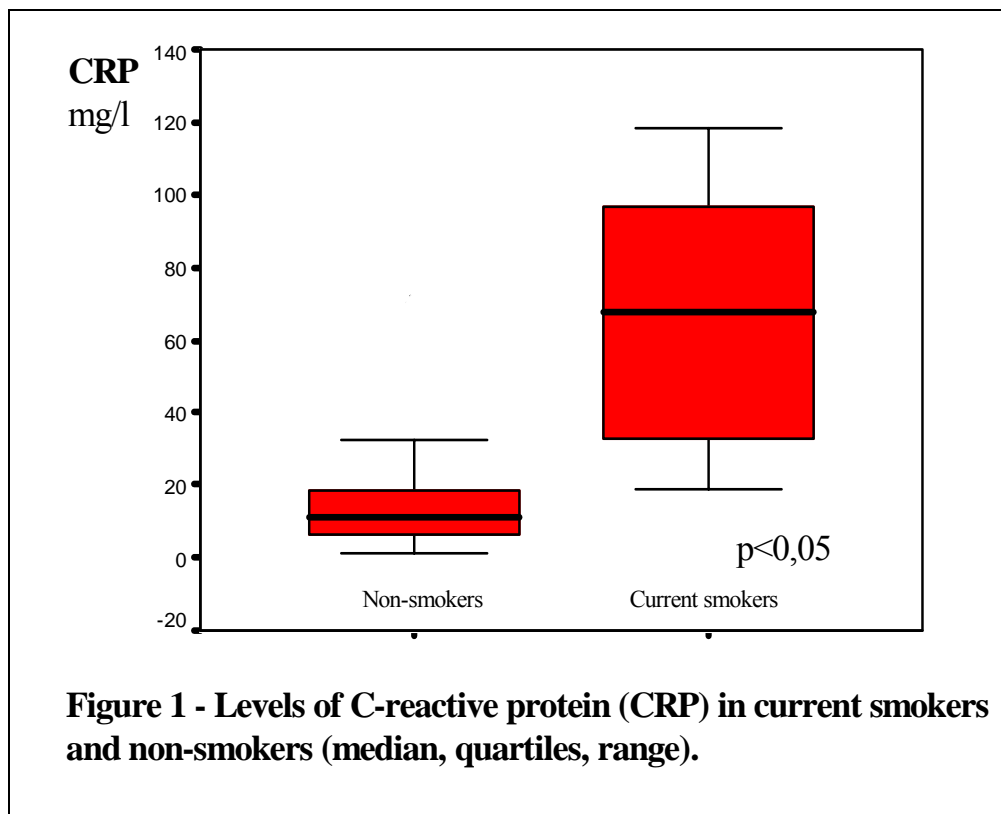
**Anti-HCV: Antibodies to hepatitis C virus; BMI: body mass index.**

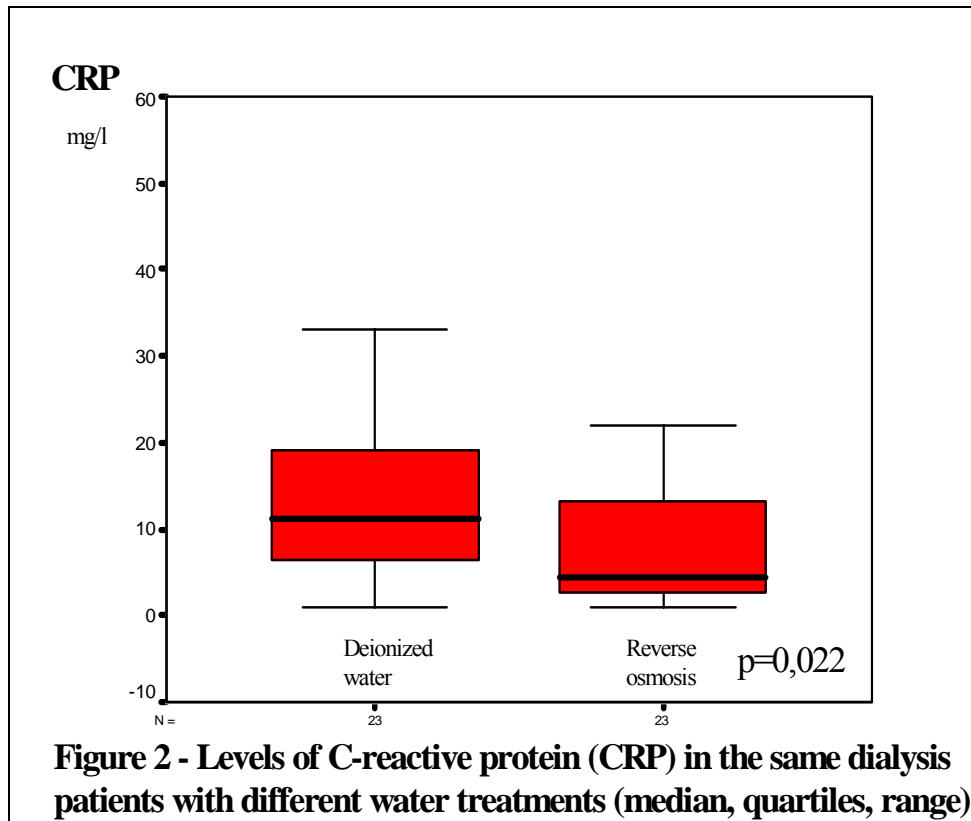
**Table II. Inflammatory activity in patients on hemodialysis with deionized water and after change to reverse osmosis.**

| Parameter                                 | Deionized water*  | Reverse osmosis water* |
|---|-------------------|------------------------|
| Interleukin-6 (pg/ml)                     | 4.8 ± 5.9 (3.4)   | 4.6 ± 7.3 (1.9)        |
| Tumoral necrosis factor- $\alpha$ (pg/ml) | (10.3)            | (10.1)                 |
| C-reactive protein (mg/l)                 | 13.7 ± 9.6 (13.2) | 9.6 ± 12.1 (4.5)**     |
| Albumin (g/dl)                            | 3.6 ± 0.6         | 3.9 ± 0.3              |
| Ferritin (ng/ml)                          | 460.2 ± 420.9     | 531.1 ± 261.7          |
| Kt/V                                      | 1.17 ± 0.4        | 1.2 ± 0.4              |
| SGA (range 7-35)                          | 11.9 ± 4.1 (11.0) | 10.5 ± 3.9 (10.1)      |

\*mean ± standard-deviation (median); \*\*p=0.022; SGA = subjective global assessment







## 6. ARTIGO 2

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES URÊMICOS DIALISADOS COM DOIS SISTEMAS DIFERENTES DE PURIFICAÇÃO DE ÁGUA**

Fernando S.Thomé<sup>1,3</sup>

Patrícia Bianchi<sup>2</sup>

Adriane Belló-Klein<sup>2</sup>

Marta Senger<sup>4</sup>

Cássio Garcez<sup>4</sup>

Roberto C. Manfro<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas-Nefrologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup>Serviço de Nefrologia, <sup>4</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

#### **Endereço para correspondência:**

Nome: Fernando Saldanha Thomé

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Nefrologia

Endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030, Porto Alegre, 90035-003, RS, Brasil

Telefone: (51)3316-8295; fax (51)3332-8324

Endereço eletrônico [fernandosthome@uol.com.br](mailto:fernandosthome@uol.com.br)

Título de cabeçalho

Água de hemodiálise, inflamação e estresse oxidativo

## **Resumo**

### **Avaliação da atividade inflamatória e do estresse oxidativo em pacientes urêmicos dialisados com dois sistemas diferentes de purificação de água**

**Marco Teórico.** A alta mortalidade cardiovascular de pacientes com insuficiência renal crônica terminal se deve em parte a fatores de risco tradicionais para doenças vasculares, e em parte também a outros fatores, chamados "não tradicionais". Entre esses, estão o estado microinflamatório crônico e o estresse oxidativo, que podem estar associados à própria uremia ou a elementos relacionados aos processos de diálise. A importância da contaminação bacteriana na água usada em hemodiálise tem sido discutida como fator indutor de atividade pró-aterogênica.

**Objetivo.** Nosso objetivo foi avaliar marcadores de inflamação e de estresse oxidativo em pacientes urêmicos em hemodiálise crônica, antes e após uma sessão do tratamento, em dois contextos: dialisato produzido com água deionizada e dialisato produzido com osmose reversa.

**Pacientes e métodos.** Estudou-se dois grupos de pacientes em hemodiálise há mais de três meses, uma em unidade que usava água deionizada (DI) e outra em unidade que usava purificação de água por osmose reversa (OR). A água foi analisada por métodos bacteriológicos e pelo teste do lisado de amebócitos de *Limulus* para endotoxinas. Coletou-se material para análise antes e após uma sessão normal de hemodiálise, para determinação de interleucina-6 (IL-6), proteína C-reativa (PCR), capacidade antioxidante total (TRAP), carbonilas (CARB) como medida de oxidação proteica e lipoperoxidação (LPO) por quimioluminescência. A análise estatística foi feita pelo teste t para amostras dependentes, ou pelos testes de Wilcoxon e Mann-Whitney para variáveis sem distribuição normal. O nível de significância foi  $p < 0,05$ .

**Resultados.** Os dois tratamentos de água apresentaram níveis de contaminação adequados para hemodiálise, mas a osmose reversa foi mais eficiente. Os pacientes dialisados com água deionizada eram mais idosos, tinham maior índice de massa corporal e tinham maior proporção de diabéticos, mas eram semelhantes em outros parâmetros clínicos e naqueles relacionados à técnica de hemodiálise. Em ambos os contextos houve, após uma sessão de hemodiálise, elevação da IL-6 (não significativa no grupo OR) e da PCR (não significativa), e diminuição estatisticamente significativa da TRAP. A LPO e a CARB não variaram. Não houve correlação entre os marcadores inflamatórios e os de estresse oxidativo, entretanto houve fortes e significativas correlações entre os níveis anteriores e posteriores à sessão de hemodiálise dos marcadores IL-6, PCR, TRAP e CARB. As variações percentuais de IL-6 e TRAP não diferiram significativamente entre os dois grupos.

**Conclusões.** No presente estudo, os níveis de IL-6 se elevaram e os de TRAP se reduziram após uma sessão de hemodiálise, mas a proporção dessa variação foi semelhante em contextos que tinham níveis de atividade inflamatória e estresse oxidativo diferentes, possivelmente devido a outros fatores intrínsecos. Não houve correlação entre a atividade inflamatória e o estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** inflamação, estresse oxidativo, uremia, hemodiálise, interleucina-6, proteína C-reativa, água para dialisato, osmose reversa, deionização, lipoperoxidação, oxidação proteica, capacidade anti-oxidante.

## **Introdução**

Apesar de avanços significativos nas terapias renais de substituição, pacientes urêmicos em hemodiálise continuam a apresentar elevada mortalidade cardiovascular (1). A incidência de aterosclerose acelerada é 30 a 40 vezes maior nesses pacientes do que na população normal (2, 3), e se demonstrou que a insuficiência renal crônica é um fator de risco independente para aterosclerose (4, 5). De fato, complicações vasculares podem ocorrer em pacientes urêmicos por várias razões, pois eles estão expostos a fatores de risco associados ao próprio desenvolvimento das doenças renais, tais como hipertensão, diabetes, tabagismo e hiperlipidemia. Por outro lado, estes pacientes também estão expostos a outros fatores de risco agravados pela insuficiência renal, os chamados "fatores de risco não tradicionais", como homocisteína, lipoproteína(a), troponinas cardíacas, proteína C-reativa (PCR) e dimetilarginina assimétrica (ADMA) (6-8). Com o reconhecimento que a aterosclerose é uma doença inflamatória do endotélio (9), tornou-se evidente que isto seria um importante fator etiológico, pois pacientes urêmicos têm atividade inflamatória elevada (10). Esta atividade está correlacionada com o número e a extensão de placas ateroscleróticas carotídeas, e a PCR, considerada um bom marcador de inflamação prediz doença cardíaca aterosclerótica tanto em homens normais como em pacientes em diálise (11). A PCR é um indicador do estado microinflamatório crônico existente em mais de 30 % dos pacientes urêmicos, constituindo um fator de risco independente para doença cardiovascular nesta população (12-14). Também está associada com hipoalbuminemia e desnutrição, o que levou à denominação síndrome MIA (má nutrição, inflamação e aterosclerose) (15) ou MICS (síndrome complexa de má nutrição e inflamação) (16). O reconhecimento de um estado de desequilíbrio redox, um estresse oxidativo, em pacientes em hemodiálise (17, 18) e a associação entre inflamação e estresse oxidativo no

desenvolvimento da aterosclerose trouxe à tona uma nova explicação fisiopatogênica para a aterosclerose acelerada em pacientes urêmicos.

Entre vários fatores reconhecidos como relacionados à inflamação e ao estresse oxidativo em pacientes em diálise, o circuito extra-corpóreo e especificamente a presença de contaminantes bacterianos e endotoxina na água do dialisato têm sido discutidos na literatura (19-22). Sistemas diferentes de purificação de água para produção do dialisato podem produzir água com graus variáveis de contaminação bacteriana, e embora os padrões exigidos de pureza sejam atendidos, ainda assim pode haver contaminação suficiente para desencadear respostas inflamatórias (23). O objetivo deste estudo é investigar a atividade inflamatória e o estresse oxidativo em pacientes urêmicos, antes e depois de uma sessão de hemodiálise, em duas situações: dialisato produzido com água deionizada e dialisato produzido com água purificada por osmose reversa.

### **Pacientes e métodos**

Foram estudados pacientes de duas unidades de hemodiálise, uma em um hospital geral onde a água para diálise era tratada por deionização (DI), e outra em um hospital terciário geral, onde era usado um sistema de osmose reversa (OR). O perfil prognóstico, as características dos pacientes e o equipamento de hemodiálise eram diferentes, mas ambas as unidades usavam as mesmas rotinas de diálise, em média quatro horas três vezes por semana, e os mesmo dialisadores (triacetato de celulose, Baxter, CA-170 e CA-210). Trinta e três pacientes em hemodiálise regular por pelo menos três meses foram estudados, 18 em diálise com DI e 15 com OR. Amostras foram coletadas antes e depois de uma sessão de hemodiálise e foram processadas simultaneamente. Interleucina-6 (IL-6) e PCR de alta sensibilidade foram determinadas no soro por ELISA (R&D Systems, Inc., USA) e por



nefelometria, respectivamente. O ponto de corte para definir atividade inflamatória pela PCR foi de 6 mg/l. Para avaliar o sistema antioxidante, medimos a capacidade antioxidante total (TRAP) no plasma, por quimioluminescência estimulada por luminol, conforme técnica já descrita (24, 25). Esta técnica determina a capacidade anti-oxidante não enzimática hidrossolúvel, composta principalmente pelas substâncias ácido úrico, vitamina C (ascorbato) e glutathione. Para determinação do dano oxidativo, realizou-se medidas de oxidação proteica no plasma (CARB) por ensaios que mediam carbonilas (26), e de lipoperoxidação (LPO) por quimioluminescência iniciada por hidroperóxido em eritrócitos lavados (27). Os resultados são expressos em pg/ml para IL-6, mg/l para PCR, mM Trolox (vitamina E hidrossolúvel, usada como antioxidante padrão) para TRAP, nmol/mg proteína para CARB, e contagem por segundo por miligrama de hemoglobina (cps/mg Hb) para LPO.

A água foi analisada mensalmente em ambas as unidades. Realizou-se culturas padrão para bactérias heterotróficas e coliformes, e detecção de endotoxinas pelo teste do lisado de amebócitos de *Limulus*. A deionização consistia de uma coluna de areia, uma coluna de carvão ativado, e duas colunas de resinas, uma aniônica e outra catiônica (Sistema Permutation, Curitiba, Brasil). Um filtro microporoso era incluído antes do circuito de distribuição e era trocado semanalmente. A outra unidade usava um sistema que incluía uma coluna de areia, uma coluna de carvão ativado, um abrandador e um sistema de osmose reversa (Culligan International Company, Northbrook, Illinois, USA). Ambos os equipamentos produziram água com qualidade consistente, de acordo com a portaria 82 do Ministério da Saúde, e seguindo as recomendações da "*Association for the Advancement of Medical Instrumentation*" da "*American National Standards, Inc.*" (AAMI), isto é, menos

do que 200 unidades formadoras de colônias (UFC) e menos do que 1,0 ng/ml de endotoxinas.

Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvios-padrão (DP) ou medianas e amplitude. As comparações das variações dos parâmetros entre antes e depois da diálise foram analisadas por um teste t para amostras dependentes, quando as variáveis tinham distribuição normal, ou pelo teste de Wilcoxon para IL-6 e PCR. As variações percentuais dos parâmetros e outras diferenças entre ambos os grupos foram comparadas pelo teste t para amostras independentes. O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para analisar a associação entre variáveis. O nível de significância aceito foi de  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

Os pacientes da unidade que usava água tratada por OR eram mais idosos que os dialisados com água deionizada (  $57,0 \pm 15,9$  X  $45,9 \pm 15,5$  anos,  $p=0,03$  ). Eles também tinham maior índice de massa corporal (  $25,8 \pm 4,1$  X  $22,0 \pm 6,6$  Kg/m<sup>2</sup>,  $p=0,028$  ). Havia também mais diabéticos no grupo DI. Não houve diferenças entre os grupos em relação a gênero, raça ou prevalência de hipertensão. No total, havia 61% de homens, 28 % de origem africana, 78% hipertensos e 21 % diabéticos (Tabela I). Nenhuma diferença bioquímica significativa relacionada a adequação da diálise entre os grupos foi encontrada.

A água deionizada teve sempre níveis aceitáveis de endotoxinas e bactérias, mas usualmente mais elevados do que a água obtida por OR. Em nove avaliações da água antes da coleta de amostras dos pacientes, a mediana e a amplitude da determinação de endotoxinas foi de 0,03 ng/ml ( $<0,03$  ng/ml a 0,5 ng/ml) no sistema DI ( 4 determinações acima de 0,03 ng/ml) e 0,03 ng/ml ( $<0,03$  ng/ml a 0,03 ng /ml) no sistema OR (nenhuma

determinação acima de 0,03 ng/ml) ( $p=0,029$ ). Em relação à contagem bacteriana, a mediana e amplitude foram 10 UFC/ml (<1 UFC/ml a 185 UFC/ml) no sistema DI (5 determinações acima de 1 UFC/ml) e 5 UFC/ml (<1 UFC/ml a 50 UFC/ml) no sistema OR (5 determinações acima de 1 UFC/ml) (NS).

Ambos os tipos de tratamento provocaram elevação nos marcadores de atividade inflamatória, embora somente a variação de IL-6 no grupo DI foi estatisticamente significativa (Tabela II). Os resultados combinados de ambos os grupos mostraram elevação de IL-6 ( mediana: 5,4 X 6,2 pg/ml,  $p<0,05$ ; médias  $\pm$  DP:  $7,9 \pm 9,0$  X  $12,5 \pm 19,2$  pg/ml) e uma elevação não significativa da PCR (mediana: 4,8 X 5,8 mg/l, NS; médias  $\pm$  DP:  $8,4 \pm 14,7$  X  $10,5 \pm 14,8$  mg/l ).

Análises dos marcadores de estresse oxidativo mostraram que a TRAP diminuiu em ambos os grupos, de  $301,4 \pm 91,0$  mM Trolox para  $124,5 \pm 33,13$  mM Trolox ( $p<0,0001$ ) no grupo tratado com DI, e de  $1413,4 \pm 547,3$  mM Trolox para  $618,5 \pm 373,8$  mM Trolox ( $p<0,0001$ ) no grupo tratado com OR (Tabela II). Não houve variação significativa nos níveis de CARB e LPO quando se comparou os níveis medidos antes e depois da sessão de hemodiálise.

Não houve correlação entre qualquer um dos marcadores inflamatórios e os marcadores de estresse oxidativo. Correlações significativas e fortes foram observadas entre os níveis pré e pós-hemodiálise de IL-6 ( $r = 0,814$ ;  $p<0,001$ ), PCR ( $r = 0,93$ ;  $p<0,001$ ), TRAP ( $0,81$ ;  $p<0,001$ ), e CARB ( $r = 0,59$ ;  $p<0,001$ ), mas não de LPO ( $r = 0,23$ ; NS).

Os níveis de TRAP foram significativamente menores em pacientes do grupo DI (Tabela II), mas a heterogeneidade dos pacientes torna qualquer interpretação difícil. A fim

de detectar diferenças relacionadas aos tratamentos de água, foram calculadas as variações percentuais dos marcadores que tiveram diferenças significativas pré X pós-diálise e as comparamos entre os grupos. A variação média de IL-6 foi  $63,7 \pm 176,1$  % para o grupo tratado com DI e  $83,0 \pm 115,9$  % para o grupo tratado com OR ( $p=0,47$ , teste de Mann-Whitney). A variação média da TRAP foi  $-54,2 \pm 21,1$  % para o grupo tratado com DI e  $-51,0 \pm 18,3$  % para o grupo tratado com OR ( $p=0,66$ , teste de Mann-Whitney).

### **Discussão**

Nossos resultados mostram níveis elevados de IL-6 e PCR tanto antes quanto após a diálise, quando comparados a valores da população normal, usualmente ao redor de 1 pg/ml e menor do que 3 mg/l em indivíduos normais, respectivamente (28, 29, 30). Os níveis pré-diálise de TRAP, CARB e LPO foram mais elevados do que nossos controles (31, 32).

Em concordância com relatos prévios, demonstramos que os níveis de IL-6 aumentam após uma sessão de hemodiálise (33). Entretanto, outros autores não conseguiram detectar elevações de IL-6 após uma única sessão de hemodiálise (34, 35). Apesar de descrever níveis elevados de IL-6 em pacientes em hemodiálise quando comparados com controles normais ou pacientes crônicos não em diálise, Cavillon e colaboradores não encontraram aumentos de IL-6 após uma sessão de hemodiálise, mesmo com dialisato contendo endotoxina e membranas bioincompatíveis, como cuprofane (34). A maioria dos autores acredita que a hemodiálise induz à produção de IL-6. Tetta e colaboradores (36) demonstraram que a retro-filtração através de uma membrana de alto fluxo aumenta níveis de IL-6 e PCR. É interessante notar que uma diferença entre estes estudos é a permeabilidade do filtro, que pode ser um fator envolvido na produção de IL-6

mesmo com dialisato contendo pouca endotoxina. Caglar e colaboradores também usaram uma membrana altamente permeável e encontraram elevação dos níveis de IL-6 após uma sessão de hemodiálise (33). Por outro lado, a intensidade de produção das citocinas é muito variável, e diversos fatores podem afetá-la, incluindo bioincompatibilidade do circuito extracorpóreo, inflamação ou infecção subclínica, e o próprio estado urêmico. As células mononucleares podem ser preparadas para produção de citocinas por fatores prévios e responder aos estímulos inflamatórios desencadeantes com intensidades diferentes. Nossos achados de correlações fortes entre os níveis pré e pós diálise dos marcadores sustentam esta hipótese. Outra fonte de variação é a evolução da produção de IL-6. Aparentemente, a produção de IL-6 tem um pico em 6 horas após o desafio inflamatório. Caglar e colaboradores encontraram um aumento adicional de 14 para 68 % após duas horas da sessão de hemodiálise (33). Por outro lado, o pico de PCR ocorre 24 horas após o estímulo inflamatório, e isto pode explicar por que não encontramos elevações da PCR após a hemodiálise. Em outro estudo, nós demonstramos que níveis elevados de PCR em urêmicos diminuem quando o tratamento de água foi trocado de DI para OR (23). Possivelmente, a PCR é um marcador mais relevante do contexto de inflamação crônica (37).

Mostramos um declínio acentuado dos níveis de TRAP, semelhante em ambos os grupos de pacientes. A técnica de análise da TRAP mede o conjunto de substâncias antioxidantes, e não as substâncias individualmente. Eiselt e colaboradores mostraram que os níveis de vitamina C em pacientes renais em hemodiálise estão reduzidos quando comparados a controles saudáveis e diminuem mais após uma sessão de hemodiálise (38). A depleção de TRAP é parcialmente devida à eliminação dialítica do ácido úrico. Além disso, outras substâncias hidrossolúveis de baixo peso molecular podem ser dialisadas (39). Portanto, é possível que a redução da TRAP reflita a depuração de substâncias anti-

oxidantes dialisáveis e não o seu consumo. Em acordo com nossos achados, Erdogan e colaboradores (40) estudaram pacientes urêmicos em diálise e encontraram uma elevada capacidade anti-oxidante/redutora férrica no soro, como medida da atividade anti-oxidante total. O significado clínico do efeito da hemodiálise sobre o estado redox dos pacientes urêmicos é controverso, e foi revisto recentemente (41). Embora pacientes em hemodiálise estejam em um estado de estresse oxidativo, não está claro se isto é aumentado pelo procedimento dialítico, ou se a diminuição da atividade anti-oxidante é clinicamente relevante. A produção *in vitro* de citocinas e radicais oxidantes pelas células mononucleares em contato com dialisato contendo fragmentos de lipopolissacarídeos é mais relevante do que os estudos realizados *in vivo* (34, 42). Nossos resultados não sugerem que o procedimento hemodialítico aumente os radicais oxidantes, e não encontramos diferença entre os dois tipos de tratamento de água. Novamente, a forte correlação entre os níveis pré e pós-diálise sugere que fatores intrínsecos são mais importantes do que o estímulo agudo externo.

Um achado intrigante foi a grande variabilidade dos níveis de LPO. Recentemente, demonstrou-se que a albumina é o maior alvo para estresse oxidativo na uremia (43), e a lipoperoxidação é fortemente afetada pelos níveis de albumina (44). Nós não determinamos a albumina sérica sistematicamente em nossos pacientes a ponto de poder concluir a esse respeito.

Em conclusão, nós demonstramos que os níveis de IL-6 aumentaram e a capacidade antioxidante total reduziu-se após uma sessão de hemodiálise, mas a proporção dessas variações foi semelhante em dois grupos de pacientes dialisados com água produzida por dois diferentes sistemas de purificação, que oferecem níveis diferentes de contaminação por endotoxina. Além disso, os níveis pós-diálise de marcadores inflamatórios e oxidativos

foram fortemente correlacionados com os níveis pré-diálise. Isto sugere que outros fatores intrínsecos são provavelmente mais importantes em induzir elevada atividade inflamatória e estresse oxidativo em pacientes urêmicos do que uma sessão de hemodiálise.

**Referências bibliográficas**

1. United States Renal Data Systems, USRDS 2003 Annual Data Report: Atlas of end-stage renal disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2003. <http://www.usrds.org/adr.htm> (acessado em agosto de 2003).
2. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974; 290 (13): 697-701.
3. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; 342 (20): 1478-83.
4. Henry RM, Kostense PJ, Bos G, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study. *Kidney Int* 2002; 62: 1402-7.
5. Collins AJ, Li S, Gilbertson DT, Liu J, Chen SC, Herzog CA. Chronic kidney disease and cardiovascular disease in the Medicare population. *Kidney Int* 2003; 64 (S87): S24-S31.
6. Yaqoob MM. Emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2002; 15 (2): 205-8.
7. Iliou MC, Fumeron C, Benoit MO, Tuppin P, Calonge VM, Moatti N, Buisson C, Jacquot C. Prognostic value of cardiac markers in ESRD: Chronic Hemodialysis and New Cardiac Markers Evaluation (CHANCE) study. *Am J Kidney Dis* 2003; 42 (3): 513-23.



8. Rattazzi M, Puato M, Faggini E, Bertipaglia B, Grego F, Pauletto P. New markers of accelerated atherosclerosis in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2003; 16 (1): 11-20.
9. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340 (2): 115-26.
10. Wanner C, Zimmermann J, Schwedler S, Metzger T. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients. *Kidney Int* 2002; 61 (S80): S99-S102.
11. Zoccali C, Benedetto FA, Mallamaci F, Tripepi G, Fermo I, Foca A, Paroni R, Malatino LS. Inflammation is associated with carotid atherosclerosis in dialysis patients. Creed Investigators. Cardiovascular Risk Extended Evaluation in Dialysis Patients. *J Hypertens* 2000; 18 (9): 1207-13.
12. Kunitoshi I, Tozawa M, Yoshi S, Fukiyama K. Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1956-60.
13. Koenig W. Update on C-reactive protein as risk marker in cardiovascular disease. *Kidney Int* 2003; 63 (S84): 58-61.
14. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA. C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000; 35 (3): 469-76.
15. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergstrom J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationship between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (7): 953-60.
16. Kalantar-Zadeh K, Ikizler A, Block G, Avram MM, Kopple JD. Malnutrition-Inflammation complex syndrome in dialysis patients: causes and consequences. *Am J Kidney Dis* 2003; 42 (5): 864-81.

17. Spittle MA, Hoenich NA, Handelman GJ, Adhikarla R, Homel P, Le NW. Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (6): 1408-13.
18. Morena M, Cristol JP, Senécal L, Leray-Moragues H, Krieter D, Canaud B. Oxidative stress in hemodialysis patients: is NADPH oxidase complex the culprit? *Kidney Int* 2002; 61: S109-S114.
19. Sitter T, Bergner A, Schifffl H. Dialysate related cytokine induction and response to recombinant human erythropoietin in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1207-11.
20. Lonnemann G. Chronic inflammation in haemodialysis: the role of contaminated dialysate. *Blood Purif* 2000; 18 (3): 214-23.
21. Schifffl H, Lang SM, Stratakis D, Fischer R. Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1863-9.
22. Nubé MJ, Grooterman MPC. Impact of contaminated dialysate on long-term haemodialysis-related complications: is it really that important? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1986-91.
23. Thomé FS, Senger M, Garcez C, Garcez J, Chemello C, Manfro RC. Efeito da melhora do tratamento da água para hemodiálise sobre o estado microinflamatório da uremia. *J Nephrol* (submetido).
24. Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis (2-amidino-propane) thermolysis. *Free Rad Res Comms* 1992; 17: 299-311.

25. Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Castillo MD. Evaluation of total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 153-8.
26. Reznick AZ, Packer L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Met Enzimol* 1994; 233: 357-63.
27. Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Rad Biol Med* 1991; 10: 41-7.
28. R&D Systems. Interleukin-6. <http://www.rndsystems.com> (acessado em julho de 2003).
29. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai, N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342 (12): 836-43.
30. Docci D, Bilancioni R, Buscaroli A, Baldrati L, Capponcini C, Mengozzi S, Turci F, Feletti C. Elevated serum levels of c-reactive protein in hemodialysis patients. *Nephron* 1990; 56: 364-7.
31. Bianchi PD, Barp J, Belló-Klein A, Menna Barreto SS, Thomé FS. Avaliação de anti-oxidantes em doentes renais crônicos em hemodiálise. In Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 18<sup>a</sup>, 2003, Pinhais. Programa e Resumos, São Paulo: FESBE 2003; no. 07.001 - CD-ROM.
32. Bianchi PD, Belló-Klein A, Menna Barreto SS, Thomé FS, Barp J. Dano oxidativo sistêmico de pacientes em hemodiálise. In Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 18<sup>a</sup>, 2003, Pinhais. Programa e Resumos, São Paulo: FESBE, 2003; no.07.002 - CD-ROM.

33. Caglar K, Peng Y, Pupim LB, Flakoll PJ, Levenhagen D, Hakim RM, Ikizler TA. Inflammatory signals associated with hemodialysis. *Kidney Int* 2002; 62: 1408-16.
34. Cavaillon JM, Poignet JL, Fitting C, Delons S. Serum interleukin-6 in long-term hemodialyzed patients. *Nephron* 1992; 60: 307-13.
35. Tarakcioglu M, Erbagci AB, Usalan C, Devenci R, Kocabas R. Acute effect of hemodialysis on serum levels of the proinflammatory cytokines. *Med Inflamm* 2003; 12 (1): 15-9.
36. Tetta C, Panichi V, Wratten ML, Palla R, Lonneman G. Plasma C-reactive protein is linked to backfiltration-associated interleukin-6 production. 44<sup>th</sup> Annual ASAIO Conference Abstract, Apr1998. *ASAIO J* 1998; 67A, 44.
37. Kaysen GA. Markers of chronic inflammation in CRF and factors that influence this chronic inflammatory state. Symposium, American Society of Nephrology Annual Scientific Meeting, November 1999. <http://www.HDCN.com> (acessado em dezembro de 2002).
38. Eiselt J, Racek J, Trefil L, Opatrný Jr K. Effects of a vitamin E-modified dialysis membrane and vitamin C infusion on oxidative stress in hemodialysis patients. *Artif Organs* 2001; 25 (6): 430-6.
39. Wratten ML, Tetta C, Ursini F, Sevanian A. Oxidant stress in hemodialysis: prevention and treatment strategies. *Kidney Int* 2000; 58 (S76): S126-S132.
40. Erdogan C, Unluçerçi Y, Turkmen A, Kuru A, Çetin O, Bekplnar S. The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 2002; 322: 157-61.
41. Ward RA, McLeish KR. Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors? *Artif Org* 2003; 27 (3): 230-6.

42. Tepel M, Echelmeyer M, Orle NN, Zidek W. Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis. *Kidney Int* 2000, 58: 867-72.
43. Himmelfarb J, McMonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int* 2001; 60: 358-63.
44. Soejima A, Matsuzawa N, Miyake N, Karube M, Fukuoka K, Nakabayashi K, Kitamoto K, Nagasawa T. Hypoalbuminemia accelerates erythrocyte membrane lipid peroxidation in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1999; 51: 92-7.

**Tabela I. Características dos pacientes estudados.**

| <b>Característica</b>                         | <b>Grupo tratado com água deionizada (n=18)</b> | <b>Grupo tratado com água purificada por osmose reversa (n=15)</b> |
|---|---|--|
| Idade (anos)                                  | 57,0 ± 15,9                                     | 45,9 ± 15,5 <sup>a</sup>   |
| Gênero  | 12 homens (67%)<br>6 mulheres(33%)              | 8 homens (53%)<br>7 mulheres (47%)                                 |
| Raça  | 5 afro-descendentes(28%)                        | 4 afro-descendentes (27%)  |
| Diabete melito                                | 6 (33%)   | 1 (7%) <sup>a</sup>  |
| Hipertensão arterial                          | 15 (83%)  | 11 (73%)   |
| Anti-HCV positivo                             | 8 (44%)   | 4 (27%)  |
| Doença cardiovascular                         | 2 (11%)   | 0 (0%)   |
| Outras doenças vasculares                     | 4 (22%)   | 1 (7%)   |
| Tabagismo ativo                               | 1 (6%)  | 0 (0%)   |
| Fístula arterio-venosa                        | 16 (89%)  | 15 (100%)  |
| Peso seco (Kg)                                | 67,5±11,8                                       | 68,5±26,2  |
| Índice de Massa Corporal (Kg/m <sup>2</sup> ) | 25,8 ± 4,1                                      | 22,0 ± 6,6 <sup>a</sup>  |
| ASG-desnutridos                               | 1 (6%)  | 0 (0%)   |
| Creatinina (mg/dl)                            | 7,9±1,9   | 8,8±2,1  |
| Hemoglobina (g/dl)                            | 10,2±0,3  | 11,0±0,2   |
| Kt/V  | 1,21±0,13                                       | 1,28±0,15  |

<sup>a</sup> = p<0,05, diferença entre os grupos; \* = média±desvio padrão; ASG = Avaliação Subjetiva Global; Kt/V=Excreção fracional da uréia; anti-HCV= anticorpos contra o vírus da hepatite C.

**Tabela II. Marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo antes (A) e depois (D) de uma sessão de hemodiálise em pacientes dialisados com água deionizada (DI) ou água purificada por osmose reversa (OR).**

| GRUPO | IL-6(pg/ml)  |                         | PCR (mg/l) |        | TRAP(mMTrolox)     |                          | CARB(nmol/<br>mg prot) |       | LPO (cps/mg Hb) |         |
|-------|--------------|-------------------------|------------|--------|--------------------|--------------------------|------------------------|-------|-----------------|---------|
|       | A            | D                       | A          | D      | A                  | D                        | A                      | D     | A               | D       |
| DI    | 9.6±         | 15.2 ±                  | 9.4±       | 11.8 ± | 301.4 ±            | 124.5 ±                  | 5.6 ±                  | 6.5 ± | 26970 ±         | 22360 ± |
|       | 10.7         | 23.1 <sup>a</sup>       | 16.4       | 16.3   | 91.0               | 33.1 <sup>a</sup>        | 0.97                   | 1.99  | 9873            | 9440    |
| OR    | 4.7 ±        | 7,6 ±                   | 4.7 ±      | 5.1 ±  | 1413.4 ±           | 618.5 ±                  | 5.6 ±                  | 5.9 ± | 26780 ±         | 25820 ± |
|       | 3.2          | 7,7                     | 2.1        | 2.6    | 547.3 <sup>c</sup> | 373.8 <sup>a,c</sup>     | 1.86                   | 2.11  | 2993            | 3559    |
| TOTAL | <b>7.9 ±</b> | <b>12,5 ±</b>           | 8.4 ±      | 10.5 ± | <b>1016.3 ±</b>    | <b>442.1 ±</b>           | 5.6 ±                  | 6.1 ± | 26870 ±         | 24120 ± |
|       | <b>9.0</b>   | <b>19,2<sup>a</sup></b> | 14.7       | 14.8   | <b>697.0</b>       | <b>382.7<sup>b</sup></b> | 1.6                    | 2.1   | 1819            | 6161    |

IL-6: interleucina-6; PCR: proteína C-reativa; TRAP: capacidade anti-oxidante total; CARB: oxidação proteica pelo ensaio de carbonilas; LPO: lipoperoxidação por quimioluminescência. Média ± desvio-padrão. a=p<0,05(antes X depois); b=p<0,001(antes X depois); c=p<0,001 (DI X OR).

## 7. ARTIGO 2 (TRADUÇÃO)

### ANALYSIS OF INFLAMMATORY ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS OF UREMIC PATIENTS DIALYSED WITH TWO DIFFERENT WATER PURIFICATION SYSTEMS

Fernando S. Thomé<sup>1,3</sup>

Patrícia Bianchi<sup>2</sup>

Adriane Belló-Klein<sup>2</sup>

Marta Senger<sup>4</sup>

Cássio Garcez<sup>4</sup>

Roberto C. Manfro<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Post Graduate Nephrology Program. School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul.

<sup>2</sup>Department of Physiology, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup>Division of Nephrology, <sup>4</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

#### **Corresponding address:**

Name: Fernando Saldanha Thomé

Institution: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Division of Nephrology

Address: Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030, Porto Alegre, 90035-003, RS, Brasil

Phone: (51)3316-8295; fax (51)3332-8324

E-mail: [fernandosthome@uol.com.br](mailto:fernandosthome@uol.com.br)



Running title:

Water, inflammation and oxidative stress in hemodialysis

**Abstract****Analysis of inflammatory activity and oxidative stress of uremic patients dialysed with two different water purification systems**

**Background.** End-stage renal failure patients have an elevated cardiovascular mortality, partly due to traditional risk factors, but also because of other factors, called "non-traditional". Among these, a chronic microinflammatory state and oxidative stress may be related to uremia itself or to the dialysis procedures. The importance of dialysate water bacterial contamination has been debated as an atherogenic factor.

**Objective.** Our objective was to study inflammatory and oxidative stress markers in uremic patients on chronic hemodialysis, before and after one session of treatment, in two situations: dialysate produced with deionized water and dialysate produced with reverse osmosis.

**Patients and methods.** Two groups of patients on hemodialysis for at least 3 months were studied, one from a unit using deionized water and another from a unit using reverse osmosis purified water. Water was analysed by conventional bacteriological methods and by the Limulus amoebocyte lysate test for endotoxins. Samples were collected before and after a regular hemodialysis session, for determination of interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), total reactivity antioxidant potential (TRAP), carbonyls as a measure of protein oxidation (CARB), and lipid peroxidation by chemoluminescence (LPO). Statistical analysis used a paired-sample t test or Wilcoxon and Mann-Whitney tests for non-normal distribution variables. The significance level was  $p < 0.05$ .

**Results.** Both water treatments presented acceptable levels of contamination, but reverse osmosis was more efficient. Patients in the deionized water group were older, had higher body mass index and had a higher proportion of diabetics, but were otherwise

similar in regard to clinical or hemodialysis-related parameters. After one hemodialysis session, there were, in both situations, elevations of IL-6 (not significant in reverse osmosis group) and CRP (not significant), and a significant decrease in TRAP. LPO and CARB didn't change. There was no correlation between inflammatory and oxidative stress markers, but strong and very significant correlations were noticed between pre and post-dialysis levels of IL-6, CRP, TRAP and CARB. The relative variations of IL-6 and TRAP were not different between the two groups.

**Conclusion.** In the present study, the levels of IL-6 rose and those of TRAP decreased after a single hemodialysis session, but the proportion of this variation was similar in two situations that induce different grades of inflammatory activity and oxidative stress, possibly because of other intrinsic factors. There was no correlation between inflammatory activity and oxidative stress.

**Key-words:** inflammation, oxidative stress, uremia, hemodialysis, interleukin-6, C-reactive protein, dialysate water, reverse osmosis, deionization, lipid peroxidation, proteic oxidation, antioxidant potential.

## **Introduction**

Despite the significant advances in renal replacement therapies, uremic patients on hemodialysis continue to present elevated cardiovascular mortality (1). The incidence of accelerated atherosclerosis is 30-40 times higher in these patients than in normal population (2, 3), and it has been demonstrated that chronic renal failure is an independent risk factor for atherosclerosis (4, 5). In fact vascular complications may occur in uremic patients for several reasons, since they are exposed to risk factors associated to development of renal diseases, such as hypertension, diabetes, smoking and hyperlipidemia. On the other hand, these patients are also exposed to other risk factors aggravated by renal insufficiency, and so called "non-traditional risk factors" like hyperhomocysteinemia, lipoprotein(a), cardiac troponins, C-reactive protein (CRP) and asymmetric dimethylarginin (ADMA) (6-8). With the recognition that atherosclerosis is an inflammatory disease of the endothelium (9), it became apparent that this was an important etiologic factor, since uremic patients have increased inflammatory activity (10). This activity is correlated with number and extension of carotid atherosclerotic plaques, and CRP, considered a good marker of inflammation, predicts atherosclerotic heart disease in normal men and in patients on dialysis (11). In fact, CRP is a marker of a chronic microinflammatory state existing in over 30% of uremic patients, being an independent risk factor for cardiovascular disease in this population (12-14). This is also associated with hypoalbuminemia and malnutrition, and this led to the term MIA (malnutrition, inflammation and atherosclerosis) syndrome (15) or MICS (malnutrition, inflammation complex syndrome) (16). Recognition of an imbalanced redox state, an increased oxidative stress, in hemodialysis patients (17, 18) and the association between inflammation and oxidative stress in the development of atherosclerosis brought up a new physiopathogenic explanation for accelerated atherosclerosis in uremic patients.

Among several factors known to increase inflammation and oxidative stress in dialysis patients, the extra-corporeal circuit and specifically the presence of bacterial contaminants and endotoxin in the water of dialysate have been debated in the literature. (19-22). Different systems of water purification for dialysate production may deliver water with varying degrees of bacterial contamination, and although the standards for water purity may be met, there might still be enough contamination to trigger inflammatory responses (23). The aim of this study is to investigate inflammatory activity and oxidative stress in uremic patients, before and after a hemodialysis session, in two situations: dialysate produced with deionized water and dialysate produced with water purified by reverse osmosis.

### **Patients and methods**

We studied patients of two hemodialysis units, one in a general hospital where the water for dialysis was treated by deionization (DE), and another in a tertiary general hospital where a reverse osmosis system (RO) was used. The prognostic profile, patients characteristics and hemodialysis equipment were different, but both units used the same dialysis routines, in average 4 hours thrice weekly, and the same dialysers (cellulose triacetate, Baxter, CA-170 and CA-210). Thirty three patients on regular hemodialysis for at least three months were studied, 18 on dialysis with DE and 15 with RO. Samples were collected before and after one hemodialysis session and were processed simultaneously. Interleukin-6 (IL-6) and high-sensitivity CRP were determined in serum by ELISA (R&D Systems, Inc.USA) and by nephelometry, respectively. The CRP cutoff to define inflammatory activity was 6 mg/l. To evaluate the antioxidant system, we used the total reactivity antioxidant potential (TRAP) technique in plasma, measured by luminol-

enhanced chemiluminescence according to described techniques (24, 25). This technique determines hydrosoluble non-enzymatic antioxidant capacity, mainly uric acid, vitamin C and glutathion. In order to investigate oxidative damage, we measured protein oxidation (CARB) in plasma by carbonyl assay (26) and lipid peroxidation (LPO) in washed erythrocytes by hydroperoxide-initiated chemiluminescence(27). Results are expressed as pg/ml for IL-6, mg/l for CRP, mM Trolox for TRAP, nmol/mg protein for CARB, and cps/mg hemoglobin for LPO.

Water was analysed monthly in both units. Standard cultures for heterotrophic bacteria and coliforms and detection of endotoxin by the *Limulus* ameobocyte lysate test were performed. Deionization included a sand column, an activated charcoal column, and two resin columns, one anionic and another cationic (Permutation System, Brasil). A micropore filter was included before the distribution circuit and was changed weekly. The other unit used a system including a sand column, an activated charcoal column, a softener and a reverse osmosis system (Culligan International Company, Northbrook, Illinois, USA). Both equipments produced water with quality consistently in accord to the Brazilian regulation for hemodialysis, following the Association for the Advancement of Medical Instrumentation -AAMI- recommendations, that is less than 200 colony-forming units (CFU) and less than 1.0 ng/ml endotoxin.

Results are presented as means  $\pm$  standard deviations (SD) or medians and range. Comparison of pre/post-dialysis changes in parameters were analysed by a paired t-test for normal distribution variables or a Wilcoxon test for IL-6 and CRP. Percentual variations of parameters and other differences between both groups were compared by independent t-test. Pearson's correlation coefficient was used to analyse the association between variables. Significance was accepted at a  $p < 0.05$  level.

## Results

Patients from the unit using RO-treated water were older than patients dialysed against DE-treated water (  $57.0 \pm 15.9$  X  $45.9 \pm 15.5$  years,  $p=0.03$  ). They also had higher body mass index (  $25.8 \pm 4.1$  X  $22.0 \pm 6.6$  Kg/m<sup>2</sup>,  $p=0.028$  ). Also, there were more diabetics in DE group. There was no differences between groups, related to gender, race, or number of patients with hypertension. Overall, there were 61 % males, 28 % with african origin, 78 % hypertensives, 21 % diabetics (Table I). No significant biochemical differences related to dialysis adequacy between the groups was found.

Deionized water had always acceptable levels of endotoxin and bacteria, but usually higher than the water obtained by RO. Nine analyses of water were performed in each system before samples were collected from the patients. The median and range of endotoxin determinations were 0.03 ng/ml (<0.03 ng/ml to 0.5 ng/ml) in group DE ( 4 determinations above 0.03 ng/ml) and 0.03 ng/ml (<0.03 ng/ml to 0.03 ng /ml) in group RO (no determination above 0.03 ng/ml) ( $p=0.029$ ). As to the bacterial count, the median and range were 10 CFU/ml (<1 CFU/ml to 185 CFU/ml) in group DE (5 determinations above 1 CFU/ml) and 5 CFU/ml (<1 CFU/ml to 50 CFU/ml) in group RO (5 determinations above 1 CFU/ml) (NS).

Both types of treatment provoked elevation in markers of inflammatory activity, although only the variation of IL-6 in the DE group was statistically significant (Table II). Combined results of both groups showed elevation of IL-6 (median: 5.4 X 6.2 pg/ml,  $p<0.05$ ; means  $\pm$  SD:  $7.9 \pm 9.0$  X  $12.5 \pm 19.2$  pg/ml) and a not significant elevation of CRP (median: 4.8 X 5.8 mg/l, NS; means  $\pm$  SD:  $8.4 \pm 14.7$  X  $10.5 \pm 14.8$  mg/l).

Analyses of the oxidative stress markers showed that TRAP decreased in both groups, from  $301.4 \pm 91.0$  mM Trolox to  $124.5 \pm 33.13$  mM Trolox ( $p < 0.0001$ ) in the DE-treated group, and from  $1413.4 \pm 547.3$  mM Trolox to  $618.5 \pm 373.8$  mM Trolox ( $p < 0.0001$ ) in the OR-treated group (Table II). There was no significant variation in CARB or LPO when comparing pre and post dialysis levels.

There was no correlation between any of the inflammatory markers and each of the oxidative stress markers. Significant and strong correlations were observed between pre and post hemodialysis levels of IL-6 ( $r = 0.814$ ;  $p < 0.001$ ), CRP ( $r = 0.93$ ;  $p < 0.001$ ), TRAP ( $r = 0.81$ ;  $p < 0.001$ ) and CARB ( $r = 0.59$ ;  $p < 0.001$ ), but not of LPO ( $r = 0.23$ ; NS).

Levels of TRAP were significantly lower in patients from the group DE (Table II), but heterogeneity of patients makes any interpretation difficult. In order to detect differences related to water treatments, we calculated the percentual variation between groups of the markers that had significant differences pre versus post dialysis. The mean variation of IL-6 was  $63.7 \pm 176.1$  % for DE-treated group and  $83.0 \pm 115.9$  % for RO-treated group ( $p = 0.47$ , Mann-Whitney test). The mean variation of TRAP was  $-54.2 \pm 21.1$  % for DE-treated group and  $-51.0 \pm 18.3$  % for RO-treated group ( $p = 0.66$ , Mann-Whitney test).



## **Discussion**

Our results show elevated levels of IL-6 and CRP both pre and post dialysis when compared to normal population values, usually around 1 pg/ml and less than 3 mg/l in normal individuals, respectively (28, 29, 30). Pre-dialysis TRAP, CARB and LPO levels were higher than our controls (31, 32)

Confirming previous reports, we demonstrated that IL-6 levels increase after a hemodialysis session (33). However, other authors have failed to detect elevations of IL-6 after a single hemodialysis session (34, 35). Despite having described elevated IL-6 levels in hemodialysis patients as compared to normal controls or patients not on dialysis, Cavaillon et al did not find an elevation of IL-6 levels after a hemodialysis treatment, even with endotoxin-containing dialysate and bioincompatible membrane as cuprophane (34). Most other authors believe that hemodialysis induces IL-6 production, and Tetta et al (36) demonstrated that backfiltration through a high flux membrane increases IL-6 and CRP levels. Interestingly, a relevant difference between these studies is filter permeability, which may be a factor involved in IL-6 production even with low-endotoxin dialysate. Caglar and col. also used a highly permeable membrane and found elevation of IL-6 levels after a hemodialysis session (33). On the other hand, variability on the intensity of cytokines production occurs, and several factors may affect it, including extra-corporeal circuit bioincompatibility, subclinical inflammation or infection, and the uremic state itself. Mononuclear cells may be primed to cytokine production because of previous factors and respond to the triggering inflammatory stimulus with different intensities. Our findings of strong correlations between pre-dialysis and post-dialysis levels of markers support this hypothesis. Another source of variation is the time course of IL-6 production. Apparently, IL-6 production peaks at 6 hours following an inflammatory challenge (28). Caglar et al

found an additional increase from 14 % to 68 % occurring 2 hours after hemodialysis (33). On the other hand, CRP peak occurs 24 hours after the inflammatory stimulus, and this could explain why we didn't find CRP elevations after hemodialysis. We showed previously that high CRP levels decrease when the water treatment changed from DE to RO (23). Possibly, CRP is a more relevant marker of a chronic inflammatory situation (37).

We showed a sharp decrease in TRAP levels, similar in both groups of patients. TRAP technique measures antioxidant substances as a whole, not separately. Eiselt et al. (38) showed that vitamin C levels in renal patients on hemodialysis are reduced when compared to healthy controls and they decrease even further after a hemodialysis session. TRAP depletion is partly due to dialysis elimination of uric acid. Besides these, other water soluble, low molecular weight substances could be dialysed (39). Hence, it is possible that TRAP reduction reflects clearance of dialysable antioxidant substances, and not their consumption. Similarly to our findings, Erdogan et al (40) studied uremic patients on dialysis and found elevated ferric reducing/antioxidant power in serum as a measurement of total antioxidant activity. Clinical significance of the effect of hemodialysis on the redox state of uremic patients is controversial, and has been recently reviewed (41). Although hemodialysis patients are in a state of oxidant stress, it is not clear if this is enhanced by the dialysis procedure, or if the decrease in antioxidant activity is clinically relevant. *In vitro* mononuclear cells production of cytokines and oxidant radicals by dialysate containing lipopolysaccharide fragments is more impressive than the studies performed *in vivo* (34, 42). Our results don't support the idea of increasing oxidant radicals by the hemodialysis procedure, and no difference was found between the two types of water treatment. Again, the strong correlation between pre and post dialysis levels suggest that intrinsic factors are more important than the acute external stimulus.

One intriguing finding was the great variability for LPO levels. Recently, albumin has been demonstrated to be a major target for oxidant stress in uremia (43), and lipid peroxidation is strongly affected by albumin levels (44). We did not determine serum albumin systematically in our patients to draw any conclusion.

In conclusion, we showed that IL-6 levels increased and total antioxidant activity decreased after a session of hemodialysis, but the proportion of this variation was similar in two groups of patients dialysed against water produced by two different systems of purification, yielding different levels of endotoxin contamination. Moreover, post-dialysis levels of inflammatory and oxidative markers were strongly correlated to the pre-dialysis levels. This suggests that other intrinsic factors are probably more important in inducing high inflammatory activity and oxidative stress in uremic patients than a single session of hemodialysis.

## References

1. United States Renal Data Systems, USRDS 2003 Annual Data Report: Atlas of end-stage renal disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2003. <http://www.usrds.org/adr.htm> (accessed in Aug 2003).
2. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974; 290 (13): 697-701.
3. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; 342 (20): 1478-83.
4. Henry RM, Kostense PJ, Bos G, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study. *Kidney Int* 2002; 62: 1402-7.
5. Collins AJ, Li S, Gilbertson DT, Liu J, Chen SC, Herzog CA. Chronic kidney disease and cardiovascular disease in the Medicare population. *Kidney Int* 2003; 64 (S87): S24-S31.
6. Yaqoob MM. Emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2002; 15 (2): 205-8.
7. Iliou MC, Fumeron C, Benoit MO, Tuppin P, Calonge VM, Moatti N, Buisson C, Jacquot C. Prognostic value of cardiac markers in ESRD: Chronic Hemodialysis and New Cardiac Markers Evaluation (CHANCE) study. *Am J Kidney Dis* 2003; 42 (3): 513-23.

8. Rattazzi M, Puato M, Faggin E, Bertipaglia B, Grego F, Pauletto P. New markers of accelerated atherosclerosis in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2003; 16 (1): 11-20.
9. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340 (2): 115-26.
10. Wanner C, Zimmermann J, Schwedler S, Metzger T. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients. *Kidney Int* 2002; 61 (S80): S99-S102.
11. Zoccali C, Benedetto FA, Mallamaci F, Tripepi G, Fermo I, Foca A, Paroni R, Malatino LS. Inflammation is associated with carotid atherosclerosis in dialysis patients. Creed Investigators. Cardiovascular Risk Extended Evaluation in Dialysis Patients. *J Hypertens* 2000; 18 (9): 1207-13.
12. Kunitoshi I, Tozawa M, Yoshi S, Fukiyama K. Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1956-60.
13. Koenig W. Update on C-reactive protein as risk marker in cardiovascular disease. *Kidney Int* 2003; 63 (S84): 58-61.
14. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA. C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000; 35 (3): 469-76.
15. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergstrom J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationship between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (7): 953-60.
16. Kalantar-Zadeh K, Ikizler A, Block G, Avram MM, Kopple JD. Malnutrition-Inflammation complex syndrome in dialysis patients: causes and consequences. *Am J Kidney Dis* 2003; 42 (5): 864-81.

17. Spittle MA, Hoenich NA, Handelman GJ, Adhikarla R, Homel P, Le NW. Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (6): 1408-13.
18. Morena M, Cristol JP, Senécal L, Leray-Moragues H, Krieter D, Canaud B. Oxidative stress in hemodialysis patients: is NADPH oxidase complex the culprit? *Kidney Int* 2002; 61: S109-S114.
19. Sitter T, Bergner A, Schifffl H. Dialysate related cytokine induction and response to recombinant human erythropoietin in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1207-11.
20. Lonnemann G. Chronic inflammation in haemodialysis: the role of contaminated dialysate. *Blood Purif* 2000; 18 (3): 214-23.
21. Schifffl H, Lang SM, Stratakis D, Fischer R. Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1863-9.
22. Nubé MJ, Grooterman MPC. Impact of contaminated dialysate on long-term haemodialysis-related complications: is it really that important? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1986-91.
23. Thomé FS, Senger M, Garcez C, Garcez J, Chemello C, Manfro RC. Efeito da melhora do tratamento da água para hemodiálise sobre o estado microinflamatório da uremia. *J Nephrol* (submitted).
24. Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis (2-amidino-propane) thermolysis. *Free Rad Res Comms* 1992; 17: 299-311.

25. Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Castillo MD. Evaluation of total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 153-8.
26. Reznick AZ, Packer L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Met Enzimol* 1994; 233: 357-63.
27. Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Rad Biol Med* 1991; 10: 41-7.
28. R&D Systems. Interleukin-6. <http://www.rndsystems.com> (accessed in Jul 2003).
29. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai, N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342 (12): 836-43.
30. Docci D, Bilancioni R, Buscaroli A, Baldrati L, Capponcini C, Mengozzi S, Turci F, Feletti C. Elevated serum levels of c-reactive protein in hemodialysis patients. *Nephron* 1990; 56: 364-7.
31. Bianchi PD, Barp J, Belló-Klein A, Menna Barreto SS, Thomé FS. Avaliação de anti-oxidantes em doentes renais crônicos em hemodiálise. In Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 18<sup>a</sup>, 2003, Pinhais. Programa e Resumos, São Paulo: FESBE 2003; no. 07.001 - CD-ROM.
32. Bianchi PD, Belló-Klein A, Menna Barreto SS, Thomé FS, Barp J. Dano oxidativo sistêmico de pacientes em hemodiálise. In Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 18<sup>a</sup>, 2003, Pinhais. Programa e Resumos, São Paulo: FESBE, 2003; no.07.002 - CD-ROM.

33. Caglar K, Peng Y, Pupim LB, Flakoll PJ, Levenhagen D, Hakim RM, Ikizler TA. Inflammatory signals associated with hemodialysis. *Kidney Int* 2002; 62: 1408-16.
34. Cavaillon JM, Poignet JL, Fitting C, Delons S. Serum interleukin-6 in long-term hemodialyzed patients. *Nephron* 1992; 60: 307-13.
35. Tarakcioglu M, Erbagci AB, Usalan C, Deveci R, Kocabas R. Acute effect of hemodialysis on serum levels of the proinflammatory cytokines. *Med Inflamm* 2003; 12 (1): 15-9.
36. Tetta C, Panichi V, Wratten ML, Palla R, Lonneman G. Plasma C-reactive protein is linked to backfiltration-associated interleukin-6 production. 44<sup>th</sup> Annual ASAIO Conference Abstract, Apr1998. *ASAIO J* 1998; 67A, 44.
37. Kaysen GA. Markers of chronic inflammation in CRF and factors that influence this chronic inflammatory state. Symposium, American Society of Nephrology Annual Scientific Meeting, November 1999. <http://www.HDCN.com> (accessed in Dec 2002).
38. Eiselt J, Racek J, Trefil L, Opatrný Jr K. Effects of a vitamin E-modified dialysis membrane and vitamin C infusion on oxidative stress in hemodialysis patients. *Artif Organs* 2001; 25 (6): 430-6.
39. Wratten ML, Tetta C, Ursini F, Sevanian A. Oxidant stress in hemodialysis: prevention and treatment strategies. *Kidney Int* 2000; 58 (S76): S126-S132.
40. Erdogan C, Unluçerçi Y, Turkmen A, Kuru A, Çetin O, Bekplnar S. The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 2002; 322: 157-61.
41. Ward RA, McLeish KR. Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors? *Artif Org* 2003; 27 (3): 230-6.



42. Tepel M, Echelmeyer M, Orle NN, Zidek W. Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis. *Kidney Int* 2000, 58: 867-72.
43. Himmelfarb J, McMonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int* 2001; 60: 358-63.
44. Soejima A, Matsuzawa N, Miyake N, Karube M, Fukuoka K, Nakabayashi K, Kitamoto K, Nagasawa T. Hypoalbuminemia accelerates erythrocyte membrane lipid peroxidation in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1999; 51: 92-7.

**Table I. Characteristics of the patients.**

| <b>Characteristic</b>                | <b>Group dialysed with deionized water (n=18)</b> | <b>Group dialysed with reverse osmosis purified water (n=15)</b> |
|--------------------------------------|---|--|
| Age (years)                          | 57.0 ± 15.9                                       | 45.9 ± 15.5 <sup>a</sup>   |
| Sex                                  | 12 men (67%)<br>6 women(33%)                      | 8 men (53%)<br>7 women (47%)                                     |
| Race                                 | 5 african origin (28%)                            | 4 african origin (27%)   |
| Diabetes mellitus                    | 6 (33%)   | 1 (7%) <sup>a</sup>  |
| Arterial hypertension                | 15 (83%)  | 11 (73%)   |
| Anti-HCV positive                    | 8 (44%)   | 4 (27%)  |
| Cardiovascular disease               | 2 (11%)   | 0 (0%)   |
| Other vascular diseases              | 4 (22%)   | 1 (7%)   |
| Current smoking                      | 1 (6%)  | 0 (0%)   |
| Arterio-venous fistula               | 16 (89%)  | 15 (100%)  |
| Dry weight (Kg)                      | 67.5±11.8   | 68.5±26.2  |
| Body Mass Index (Kg/m <sup>2</sup> ) | 25.8 ± 4.1  | 22.0 ± 6.6 <sup>a</sup>  |
| SGA-malnourished                     | 1 (6%)  | 0 (0%)   |
| Creatinine (mg/dl)                   | 7.9±1.9   | 8.8±2.1  |
| Hemoglobin (g/dl)                    | 10.2±0.3  | 11.0±0.2   |
| Kt/V                                 | 1.21±0.13   | 1.28±0.15  |

<sup>a</sup> = p<0.05, difference between groups; \* = mean±standard deviation; SGA = Subjective Global Assessment; Kt/V=Fractional excretion of urea; anti-HCV= Antibodies against hepatitis C virus.

**Table II. Inflammatory and oxidative stress markers before (B) and after (A) one hemodialysis session in patients dialysed with deionized water (DE) and water purified by reverse osmosis (RO).**

| GROUP | IL-6(pg/ml)         |                                   | CRP (mg/l)   |               | TRAP(mMTrolox)                |                                     | CARB(nmol/<br>mg prot) |              | LPO (cps/mg Hb) |                |
|-------|---------------------|-----------------------------------|--------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------|-----------------|----------------|
|       | B                   | A                                 | B            | A             | B                             | A                                   | B                      | A            | B               | A              |
| DE    | 9.6±<br>10.7        | 15.2±<br>23.1 <sup>a</sup>        | 9.4±<br>16.4 | 11.8±<br>16.3 | 301.4±<br>91.0                | 124.5±<br>33.1 <sup>a</sup>         | 5.6±<br>0.97           | 6.5±<br>1.99 | 26970±<br>9873  | 22360±<br>9440 |
| RO    | 4.7±<br>3.2         | 7,6±<br>7,7                       | 4.7±<br>2.1  | 5.1±<br>2.6   | 1413.4±<br>547.3 <sup>c</sup> | 618.5±<br>373.8 <sup>a,c</sup>      | 5.6±<br>1.86           | 5.9±<br>2.11 | 26780±<br>2993  | 25820±<br>3559 |
| TOTAL | <b>7.9±<br/>9.0</b> | <b>12,5±<br/>19,2<sup>a</sup></b> | 8.4±<br>14.7 | 10.5±<br>14.8 | <b>1016.3±<br/>697.0</b>      | <b>442.1±<br/>382.7<sup>b</sup></b> | 5.6±<br>1.6            | 6.1±<br>2.1  | 26870±<br>1819  | 24120±<br>6161 |

IL-6: interleukin-6; CRP: C-reactive protein; TRAP: total reactivity antioxidant potential; CARB: protein oxidation by carbonyl assay; LPO: lipid peroxidation by chemiluminescence. Mean ± standard deviation. a=p<0.05(before X after); b=p<0.001(before X after); c=p<0.001 (DE X RO).

## 8. CONCLUSÃO

A insuficiência renal crônica é uma síndrome multi-causal, tratável e controlável, mas incurável, progressiva, letal e causadora de malefícios pessoais, familiares e sociais. A principal causa de morte entre pacientes urêmicos permanece sendo as doenças vasculares ateroscleróticas, devidas a muitos fatores de risco, boa parte deles específicos ou agravados pela condição de insuficiência renal. O reconhecimento de que a fisiopatogênese da aterosclerose envolve a ocorrência de inflamação crônica e estresse oxidativo ajudou a entender a morbidade vascular dos pacientes renais, pois constatou-se que estes possuem alta e persistente prevalência de ambas situações.

Está bem demonstrado que pacientes urêmicos em diálise apresentam disfunção endotelial. Esta é considerada precursora da aterosclerose, e se correlaciona com o estresse oxidativo e com o estado microinflamatório. Isto ocorre pelo próprio estado urêmico, mas também por fatores associados aos métodos dialíticos. Muito tem sido debatido sobre a bioincompatibilidade da membrana dialisadora e da contaminação do dialisato por endotoxinas. Existem estudos comprovando que ambas as situações são inflamatórias, mas há divergências sobre sua importância relativa.

Nesse estudo avaliamos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes urêmicos crônicos em hemodiálise, e avaliamos o efeito de dois sistemas diferentes de purificação da água do dialisato sobre eles.

A hemodiálise aumenta os níveis de interleucina-6, pois esta responde mais rapidamente ao estímulo inflamatório do que a proteína C-reativa. Além disso, diminui importante a capacidade antioxidante hidrossolúvel total, embora sem alterar os

danos oxidativos protéico e lipídico. Entretanto, estas alterações não parecem diferentes quando se comparam duas populações com níveis de inflamação diversos e tratados com águas processadas distintamente. Certamente a pureza da água é importante. Um tratamento mais eficiente de purificação da água conseguiu reduzir de forma rápida e clinicamente significativa os níveis de proteína C-reativa. Mas, por outro lado, a magnitude das alterações crônicas dos marcadores estudados, e as correlações fortes encontradas entre quaisquer duas medidas em tempos diferentes desses marcadores, seja com diferença de meses ou de uma sessão de hemodiálise sugerem que os fatores intrínsecos que estimulam o estado microinflamatório ou o estresse oxidativo são mais importantes. Quais seriam esses fatores? Não se pode afastar que o estímulo dialítico continuado seja muito relevante, mas certamente características do estado urêmico, como a retenção de toxinas são elementos extremamente importantes, bem como características genéticas (1).

O significado do aumento da capacidade antioxidante total em urêmicos não pode ser avaliado por este trabalho. Portanto, há necessidade de estudos adicionais, que controlem variáveis relevantes, como doença básica, tabagismo, uso de ferro endo-venoso, uso de eritropoetina, tipo de diálise, idade, entre outras. Do mesmo modo, a interrelação entre marcadores inflamatórios e o estresse oxidativo precisa ser melhor compreendida. Nosso trabalho não demonstrou correlação entre eles. São necessários também estudos epidemiológicos de larga escala que analisem marcadores inflamatórios com variáveis relacionadas aos tratamentos oferecidos, e com desfechos relevantes, a fim de podermos estabelecer diretrizes mais sólidas para evitarmos medidas iatrogênicas em nossas condutas médicas.

Por fim, a atividade inflamatória e o estresse oxidativo são elementos presentes em pacientes urêmicos em diálise, e que estão implicados em morbi-mortalidade,

especialmente cardiovascular. As razões para estas alterações são várias, relacionadas entre si, formando uma rede causal ainda não bem compreendida. Embora o estado urêmico e características genéticas sejam aparentemente os fatores preponderantes, o efeito deletério do procedimento hemodialítico deve ser considerado. Como medidas preventivas, portanto, pode-se recomendar preliminarmente o uso de membranas mais biocompatíveis, e especificamente, em relação aos nossos achados, o uso de água melhor purificada. Estudos com água ultra-pura (2), com hemodiafiltração "on-line" (3), com água eletroliticamente reduzida (4), ou com sistemas de banho fechados individualizados que aumentam a pureza da água (5, 6) também mostram isso. Os padrões de pureza estabelecidos pelas agências reguladoras não parecem mais justificados, conforme tem sido já sugerido por outras autoridades (7), e já estão sendo revistos. Isto se torna relevante, pois sistemas de deionização permanecem sendo utilizados no Brasil e em outros países (8-10), mesmo com dialisadores mais permeáveis e com padrões de depuração ( $Kt/V$ ) mais ambiciosos usando dialisato com bicarbonato, mais suscetível a contaminação bacteriana. Nem sempre estas medidas de adequação da hemodiálise são acompanhadas da necessária tecnologia para melhora da qualidade microbiológica da água utilizada (11). Esta é outra área de estudos, pois o aumento da depuração dialítica sempre foi consensualmente recomendada, mas a esperada melhora da sobrevida em hemodiálise com  $Kt/V$ s maiores do que 1,2 não se confirmou com o estudo HEMO, que apresentou origem cardiovascular ou correlata como causa de mortalidade em mais do que 40 % dos pacientes seguidos na coorte (12). Uma possibilidade pode ser que a retrofiltração de elementos desencadeadores de inflamação e estresse oxidativo (13) se contraponha aos efeitos benéficos da melhor depuração, ao aumentar o dano endotelial. Estudos futuros deverão ser adequadamente delineados e conduzidos com o objetivo de elucidar estes questionamentos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA CONCLUSÃO

1. Losito A, Kalidas K, Santoni S, Jeffery S. Association of interleukin-6 - 174G/C promoter polymorphism with hypertension and left ventricular hypertrophy in dialysis patients. *Kidney Int* 2003; 64: 616-22.
2. Schiff H, Lang SM, Stratakis D, Fischer R. Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1863-9.
3. Lin CL, Huang CC, Yu CC, Yang HY, Chuang FR, Yang CW. Reduction of advanced glycation end product levels by on-line hemodiafiltration in long-term hemodialysis patients. *J Nephrol* 2003; 42 (3): 518-21.
4. Huang KC, Yang CC, Lee KT, Chien CT. Reduced hemodialysis-induced oxidative stress in end-stage renal disease patients by electrolyzed reduced water. *Kidney Int* 2003; 64: 704-14.
5. Kleophas W, Haastert B, Backus G, Hilgers P, Westhoff A, van Endert G. Long-term experience with an ultrapure individual dialysis fluid with a batch type machine. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13 (12): 3118-25.
6. Fassbinder W. Renaissance of the batch method? *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 3010-2.
7. Ward RA. Ultrapure dialysate: a desirable and achievable goal for routine hemodialysis. *Semin Dial* 2000; 13 (6): 378-80.
8. Sociedade Brasileira de Nefrologia. Censo - Dezembro, 2002. <http://www.sbn.org.br> (acessado em maio de 2003).

9. Arvanitidou M, Spaia S, Asklepidis N, Kanetidis D, Pazarloglou M, Katsoyannopoulos V, Vayonas G. Endotoxin concentration in treated water of all hemodialysis units in Greece and inquisition of influencing factors. *J Nephrol* 1999; 12 (1): 32-7.
10. Zunino P, Beltrán L, Zunino L, Méndez H, Percovich V, Rocca R, Antonelli B. Microbiological quality of hemodialysis water in a three-year multicenter study in Uruguay. *J Nephrol* 2002; 15: 374-9.
11. Ledebø I, Nystrand R. Defining the microbiological quality of dialysis fluid. *Art Organs* 1999; 23 (1): 37-43.
12. Rocco MV, Yan G, Gassman J, Lewis JB, Ornt D, Weiss B, Levey AS, Hemodialysis Study Group. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (1): 146-53.
13. Vanholder R, Van Haecke E, Veys N, Ringoir S. Endotoxin transfer through dialysis membranes: small- versus large-pore membranes. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7 (4): 333-9.