UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**LDL ELETRONEGATIVA EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS SOB
HEMODIÁLISE E DIÁLISE PERITONEAL E SUA RELAÇÃO COM O
ESTADO NUTRICIONAL**

JULIE CALIXTO LOBO

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Dulcinéia Saes Parra Abdalla

São Paulo

2007

JULIE CALIXTO LOBO

**LDL ELETRONEGATIVA EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS SOB
HEMODIÁLISE E DIÁLISE PERITONEAL E SUA RELAÇÃO COM O
ESTADO NUTRICIONAL**

Universidade de São Paulo

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulcinéia Saes Parra Abdalla

São Paulo

2007

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013307

RESERVA EM PACIENTES RENAI CRÔNICOS SOB HEMODIÁLISE
L799L
L799L

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do conjunto das Químicas da USP.

Lobo, Julie Calixto

L799L LDL eletronegativa em pacientes renais crônicos sob hemodiálise
e diálise peritoneal e sua relação com o estado nutricional / Julie
Calixto Lobo. -- São Paulo, 2007.
80p.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Abdalla. Dulcinéia Saes Parra

1. Nutrição : Ciências dos alimentos 2. Rins : Medicina
3. Bioquímica clínica : Medicina I. T. II. Abdalla, Dulcinéia
Saes Parra, orientador.

641.1 CDD

JULIE CALIXTO LOBO

**LDL ELETRONEGATIVA EM PACIENTES RENAIS CRÔNICOS SOB
HEMODIÁLISE E DIÁLISE PERITONEAL E SUA RELAÇÃO COM O
ESTADO NUTRICIONAL**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.^a. Dr.^a. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, Setembro de 2007.

13 de setembro 2007

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”
(Fernando pessoa)

Dedico esta dissertação ...

À minha mãezona, coisa mais querida da minha vida, parceira, amiga, amor incondicional, que bom que tenho um tanto de você em mim!!!!

Aos pacientes que participaram da pesquisa, por terem sido tão fofos, por todos os sorrisos que encontrei apesar das agulhadas, muito obrigada e que vocês sejam muito felizes.

Agradecimentos

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

À FCF-USP/Departamento de Alimentos e Nutrição experimental pela oportunidade da pós-graduação.

Ao Laboratório de Análises Clínica-USP (BL 17), por ser o meu lugar durante o mestrado.

À grande sábia, Profª Drª Titular Dulcinéia Saes Parra Abdalla, um dia quero saber um terço do que você sabe, MUITO OBRIGADA por tudo! Sentirei saudades!!!

À minha Co-orientadora, ou melhor, Colaboradora Profª Drª Denise Mafra (UFF), por todas as oportunidades, por acreditar em mim, por ser minha amiga, te amo muito!!!! Muito obrigada sempre Guria!!!

Ao Prof. Dr. Maurilo de Narazé de Lima Leite Junior, muito obrigada pela clínica, pela atenção, pelas sugestões, por todo o carinho.

Aos professores da UFF por terem me apoiado, por me incentivarem, devo muito a vocês! ! Em especial ao professor Gilson que nos cedeu o laboratório e a Solange por ter coletado os sanguinhos do grupo controle.

A todos os funcionários da clínica, muitoooooooo obrigada por me deixarem invadir o espaço de vocês!!! Em especial a Jane que nos ajudou bastante nas coletas e a assistente social Thiana por ter sido nosso braço direito!

Mônica, Jorge e Elaine, muito obrigada pela ajuda!!!

Aos amigos do laboratório: Andréa (sentirei saudades!), Cris (Obrigada pelo carinho!), Tanize (Tivemos pouco contato, mas obrigada pelas ajudas nos ELISAS e nos contatos virtuais), Simone (muito obrigada pela ajuda nos experimentos e por me acolher no seu apê!), Martina (saudades de você!), Renato (vai sentir saudade da sua amiga "carica", né?), Evelyne (saudades dos biscoitos da sua mãe, hummm!!! Obrigada pela ajuda!), Laila (amiga te devo a alma!!!Você sempre foi maravilhosa comigo, quero que nossa amizade dure pra sempre!!! Te amo!) Dani (minha praticamente segunda co-orientadora, você é incrível, te devo a alma ao cubo, muitoooo obrigada por tudo, sei que não vamos sumir uma da outra), Themis (Nossa morro de saudades, obrigada pelo apoio no início desse trabalho, você foi maravilhosa!)

Mau, queridoooooooooooooo, esse aturou meus estresses, nossaaaaa!!!! Muito obrigada por lutar comigo no HPLC, por todo o carinho, pelas risadas, por tudo, você é incrível!!!!

Lana e Gabi, muitooooooooo obrigada por me acolherem no crusp, obrigada pelos momentos de descontração, pelas risadas mil, pelos desabafos, por tudo!!! Vocês são lindas!!!! Dêa, obrigada por me ceder seu quarto eventualmente, por me acolher!

Karê e Lu, muito obrigada pelo apoio de vocês!!!

Chico querido, nossaaaaaa muito obrigada, pela amizade, pelo carinho, pela paciência quando eu chorava de desespero que as coisas davam erradas, você foi meu anjo da guarda!!

Ao meu amigãoooo Felipe, por participar de tudo desde que nos conhecemos, ainda bem que você existe, o que seria de mim sem você? Te amo!!!

À Cida, pelas comidinhas deliciosas e por sempre me chamar pra tomar café quando eu já não agüentava mais estudar.

À minha irmã de ventre diferente, Aminne, amo você muito!!!!

À Carol , Eveline, Gabriela, Érika , Pri e Zizi, amigas vocês são maravilhosas, amo vocês!!!

Aos amigos da faculdade Ana, Chris Bin, "bubu", Ju, Marluce, "Sarandon", Giselle, "Patis", "Fetz", Alicia, desculpa de esqueci de alguém (saudades de vocês!!!!).

À galera do Vila Magna, saudades do tempo em que éramos crianças e podíamos ficar perto uns dos outros brincando sem ver o tempo passar, era só felicidade!!!

À minha família, meu pai (que mesmo não entendendo muito o que eu faço, sempre me apoiou, te amo!!!), minha irmã, minhas avós lindas!, minha tia Nilce, tia "nês", meus primos queridos Isabella e Matheus, Marcelo (obrigada por escutar minhas coisas e por levantar minha bola!!!), ao meu avô Else (mesmo que no momento ele não esteja mais conosco, ele ia gostar de me ver agora!) Amo vocês demais!!!

À Tereza e Antonio Sérgio por terem colocado o Antonio no mundo.

Ao Antonio, meu amor, por ter participado mais que intimamente, aturando os ataques, as choradeiras, pelo incentivo, pelo amor, pelo companheirismo, pelas comemorações nas vitórias e por ser o cara mais maravilhoso que existe, muito obrigada lindão!!! Te amo mais que tudo nessa vida, você é pra sempre!!!

À Deus por ter me dado sorte de ter conhecido tanta gente bacana e por poder contribuir mesmo que minimamente para ciência!!!

"A verdadeira ciência descobre Deus à espera atrás de cada porta."
Papa Pio XII

SUMÁRIO

Resumo -----	15
Abstract -----	17
1- Introdução e Justificativa-----	19
2- Revisão da Literatura-----	21
2.1- Rins e Doença Renal Crônica-----	21
2.2- Estresse Oxidativo-----	25
2.3- Peroxidação Lipídica-----	26
2.4- Peroxidação Lipídica na Doença renal crônica-----	32
2.5- Vitamina E e C como antioxidantes e Peroxidação Lipídica na doença renal crônica-----	35
3- Objetivo -----	38
3.2- Objetivo geral-----	38
3.3- Objetivos específicos-----	38
4- Metodologia -----	39
4.1- Casuística -----	39
4.2- Procedimentos éticos -----	39
4.3- Critérios de inclusão -----	39
4.4- Critérios de exclusão -----	39
4.5- Dados demográficos, clínicos e bioquímicos -----	40
4.6- Avaliação antropométrica -----	40
4.7- Coleta de sangue-----	42
4.8- Separação da LDL eletronegativa-----	43
4.9- Determinação da concentração de LDL eletronegativa-----	44
5.0- Determinação de anticorpos anti-LDL eletronegativa -----	45
5.1- Detecção de Imunocomplexos -----	46
5.2- Determinação de Ascorbato e Alfa-tocoferol -----	47
5.3- Análise estatística -----	48
6- Resultados -----	49
6.1- Característica dos grupos -----	49
6.2- Dados antropométricos dos participantes do estudo -----	50

6.3- Perfil Lipídico -----	51
6.4- LDL eletronegativa -----	52
6.5- Auto-Anticorpos Anti-LDL (-) -----	53
6.6- Imunocomplexos -----	54
6.7- Ascorbato plasmático -----	55
6.8- Alfa-Tocoferol plasmático -----	56
6.9- Correlações -----	56
7- Discussão -----	60
8- Conclusão -----	66
9- Referência bibliográfica -----	67
Anexos -----	

Lista de Ilustrações

Tabelas

Tabela 1: Características gerais dos grupos estudados-----	49
Tabela 2: Dados antropométricos dos grupos estudados-----	50
Tabela 3: Perfil Lipídico dos grupos estudados-----	51
Tabela 4: Concentração de Tocoferol em umoles/mg de colesterol-----	56

Figuras

Figura 1: Estrutura dos Rins-----	21
Figura 2: Estrutura do Néfron-----	22
Figura 3: Ilustração de um paciente em diálise peritoneal -----	23
Figura 4: Ilustração de um paciente em hemodiálise -----	24
Figura 5: Acesso vascular na hemodiálise (fístula arterio-venosa)-----	24
Figura 6: Estágios iniciais da formação da lesão aterosclerótica-----	28
Figura 7: Heterogenicidade da LDL eletronegativa e participação na aterogênese	31

Gráficos

Gráfico 1: Porcentagem dos pacientes com baixas concentrações de HDL-colesterol e concentrações elevadas de LDL-colesterol, colesterol total e triglicérides (TG). -----	51
Gráfico 2: Concentrações de LDL(-) ($\mu\text{g/mL}$) nos grupos estudados-----	52
Gráfico 3:Concentrações de Anti-LDL(-) IgG Auto-anticorpo($\mu\text{g/mL}$) nos grupos estudados -----	53
Gráfico 4: Concentrações de Imunocomplexos ($\mu\text{g/mL}$) nos grupos estudados -----	54
Gráfico 5: Concentrações de Ascorbato plasmático ($\mu\text{M/L}$) nos grupos estudados---	55
Gráfico 6: Correlação entre Imunocomplexos IgG ($\mu\text{g/mL}$) e PCT (mm)-----	57
Gráfico 7: Correlação entre LDL(-) ($\mu\text{g/mL}$) e PCT (mm)-----	57
Gráfico 8: Correlação entre Anticorpos Anti-LDL(-) IgG ($\mu\text{g/mL}$) e IMC (Kg/m^2)-----	58
Gráfico 9: Correlação entre Anticorpos Anti-LDL(-) IgG ($\mu\text{g/mL}$) e circunferência da cintura (cm)-----	58
Gráfico 10: Correlação entre LDL(-) ($\mu\text{g/mL}$) e Anticorpos Anti-LDL(-) IgG ($\mu\text{g/mL}$)--	59

Quadros

Quadro I: Divisão dos estágios da DRC de acordo com NKF, 2002-----	23
Quadro II: Estado Nutricional de Adultos segundo o IMC-----	40
Quadro III: Estado Nutricional de Adultos segundo a AMBc -----	41
Quadro IV: Estado Nutricional de Adultos segundo o PCT -----	42

Lista de abreviaturas e siglas

AMB	Área Muscular do braço
AMBc	Área Muscular do braço corrigida
Anti - LDL ox	Anticorpo anti LDL oxidada
Apo B	Apolipoproteína B
Apo E	Apolipoproteína E
BHT	Butil hidroxitolueno
CAT	Catalase
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CIN	Centro Integrado de Nefrologia
CT	Grupo controle
DCV	Doença cardiovascular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Diálise peritoneal
DRC	Doença renal crônica
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAV	Fístula arterio-venosa
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP
FGF 2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
FSF-USP	Faculdade de Saúde Pública - USP
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GC	Glomerulonefrite crônica
GPX	Glutathione peroxidase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Hb	Hemoglobina
HD	Hemodiálise
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
IC	Imunocomplexos
IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-1 β	Interleucina 1 β
IMC	Índice de Massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL ox	LDL oxidada
LDL (-)	LDL eletronegativa
LDLmm	LDL minimamente modificada
LDLn	LDL nativa
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MDA	Malonaldeído
MPO	Mieloperoxidase
NEFAS	Ácidos graxos não esterificados
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear Kappa B
NKF	National Kidney Foundation
OMS	Organização Mundial de Saúde

OPD	Fenilenodiamina
PAF-AH	Fator ativador de plaquetas acetil hidrolase
PBS	Tampão fosfato
PCR	Proteína C reativa
PCT	Prega cutânea tricipital
PLA-2	Fosfolipase λ_2
PMSF	Fenilmetilsulfonilflorideo
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
RP	Rins Policísticos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TFG	Taxa de filtração glomerular
TG	Triglicerídeos
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VCAM-1	Moléculas de adesão de células vasculares
VLA-4	Integrina
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

RESUMO

A modificação oxidativa da LDL possui um papel crucial na patogênese da aterosclerose que é uma das principais causas de mortalidade nos pacientes renais crônicos. Uma subfração de LDL modificada *in vivo*, denominada LDL eletronegativa (LDL-), é formada a partir de modificações da parte protéica (ApoB100) e lipídica (fosfolípidos, triglicérides e colesterol) da LDL induzidas por diversos mecanismos. A LDL (-) tem menor afinidade pelos receptores da LDL, é citotóxica para células endoteliais e apresenta atividade pró-inflamatória, quando comparada à LDL nativa. Com o objetivo de investigar as alterações do estado nutricional relacionadas à formação da LDL(-) nos pacientes renais crônicos, analisou-se neste estudo as concentrações plasmáticas de LDL(-), anticorpos IgG anti-LDL(-) e seus imunocomplexos em pacientes sob hemodiálise (HD, n=25) ou sob diálise peritoneal (DP, n=11) e indivíduos saudáveis (grupo controle, n=10), relacionando-as ao perfil lipídico e às concentrações plasmáticas de α -tocoferol e ascorbato. Os resultados mostraram que a concentração de LDL(-) foi maior ($p<0.01$) nos pacientes hemodialisados ($575,6\pm233,1\mu\text{g/mL}$) quando comparados aos pacientes submetidos à diálise peritoneal ($223,4\pm117,5\mu\text{g/mL}$) e aos controles ($54,9\pm33,3\mu\text{g/mL}$). Os níveis de anticorpos IgG anti-LDL(-) foram mais elevados ($p<0,00001$) nos controles ($0,36\pm0,09\mu\text{g/mL}$), quando comparados aos pacientes DP ($0,28\pm0,12\mu\text{g/mL}$) e HD ($0,2\pm0,1\mu\text{g/mL}$). As concentrações dos imunocomplexos no grupo controle ($0,35\pm0,20\mu\text{g/mL}$) foram significativamente maiores comparadas às dos grupos HD ($0,15\pm0,07\mu\text{g/mL}$) e DP ($0,22\pm0,07\mu\text{g/mL}$). Não houve diferença das concentrações plasmáticas de ascorbato e de alfa-tocoferol (normalizada pela concentração de colesterol) nos grupos estudados. A maioria da população estudada estava eutrófica, segundo o índice de massa corpórea (IMC). Conclui-se que as concentrações de LDL(-) nos pacientes HD e DP foram significativamente mais elevadas, enquanto os níveis de anticorpos IgG anti-LDL(-) foram menores, nos pacientes HD e DP comparados ao grupo controle. As análises de correlação demonstraram que os valores de prega cutânea tricípital (PCT) se correlacionaram diretamente com as concentrações plasmáticas dos imunocomplexos ($r= 0,37$; $p= 0,01$) e inversamente com as

concentrações plasmáticas de LDL(-) ($r = -0,37$; $p = 0,018$). As concentrações plasmáticas dos anticorpos anti-LDL(-) se correlacionaram diretamente com os valores do IMC ($r = 0,83$ $p = 0,00001$) e da circunferência da cintura ($r = 0,75$ $p = 0,0001$).

Palavras chave: Hemodiálise, Diálise peritoneal, LDL eletronegativa, Doença Cardiovascular.

ABSTRACT

A minimally modified form of LDL, with structural ApoB100 modification and lower affinity by LDL receptors, has been described in blood plasma. This circulating modified form of LDL, named electronegative LDL, LDL(-), has increased negative charge, higher cytotoxicity and pro-inflammatory activity as compared to the native LDL. This LDL is poorly described in hemodialysis and there is no study in peritoneal dialysis patients. Thus, the purpose of this study was to evaluate the relation of the nutritional status with the amount of electronegative LDL (LDL-), its autoantibodies and immune complexes (IC) in dialysed patients. LDL(-), its autoantibodies and IC were determined by ELISA in chronic kidney disease (CKD) patients undergoing hemodialysis (HD) or peritoneal dialysis (PD) and compared to subjects without CKD (controls). Nutritional status, lipid profile and plasma concentrations of alpha-tocopherol, ascorbate and immune complexes (IC) were also evaluated. Results are expressed as median of LDL- ($\mu\text{g/mL}$) and anti-LDL(-) IgG (OD405 nm). The concentrations of LDL(-) were higher in HD patients ($575.6 \pm 233.1 \mu\text{g/mL}$) as compared to PD ($223.4 \pm 117.5 \mu\text{g/mL}$) and control groups ($54.9 \pm 33.3 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0.01$). The anti-LDL(-) IgG auto-antibodies were elevated in controls ($0.36 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$) in relation to PD patients ($0.28 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$) and HD patients ($0.2 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$), ($p < 0.00001$). A negative correlation was observed between anti-LDL(-) IgG and LDL(-) levels ($r = -0.43$; $p = 0.003$) in the studied groups. The concentrations of IC in the control group ($0.35 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$) were higher compared with HD ($0.15 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$) and PD ($0.22 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$) groups. No differences were found for the plasma levels of ascorbate and alpha-tocopherol (normalized by cholesterol concentration) among the studied groups. The body mass index (BMI) was normal in the majority of the studied subjects. The highest LDL(-) concentrations were found in HD patients, and for the first time, we showed that PD patients also have high levels of LDL(-) when compared with non-CKD subjects. The levels of anti-LDL(-) IgG in CKD patients were lower compared to controls. The correlation analysis showed that the values for triceps skin fold were positively correlated with blood plasma concentrations of IC ($r = 0.37$; $p = 0.01$) and negatively correlated with LDL(-) concentrations ($r = -0.37$; $p = 0.018$). The concentrations of anti-LDL(-) autoantibodies were directly correlated with

BMI ($r= 0.83$ $p=0.00001$) and waist circumference ($r= 0.75$ $p= 0.0001$).

Key Words: Hemodialysis, peritoneal dialysis, electronegative LDL, cardiovascular disease.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA:

A principal causa de morte em pacientes portadores de doença renal crônica (DRC) é a doença cardiovascular (DCV) e pesquisas têm mostrado que além de todos os fatores já estabelecidos, o estresse oxidativo parece ter um papel importante no desenvolvimento de DCV, principalmente nos pacientes que estão sob hemodiálise (Prichards, 2003). O estresse oxidativo, pode ser definido como dano tissular decorrente de um desequilíbrio entre a geração excessiva de compostos oxidantes ou espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) e a deficiência dos sistemas de defesa antioxidante (Locatelli *et al.*, 2003).

Uma das conseqüências do aumento das ERONs é a oxidação das partículas de LDL, originando partículas de LDL oxidada (LDL-ox) com propriedades citotóxica, pró-inflamatória e pró-aterogênica (Molavi & Mehta, 2004). Evidências indicam que a modificação oxidativa da LDL induz o acúmulo de lipídios na parede arterial (Radulesco *et al.* 2004). A partícula LDLox é considerada um importante fator na iniciação e propagação da placa aterosclerótica (Asatryan *et al.* 2003; Molavi & Mehta, 2004). Além da LDLox, que está presente na parede do vaso, uma forma modificada de LDL, chamada LDL eletronegativa(LDL-) está presente na circulação sanguínea.

A relação entre LDL(-) e aterosclerose, revela uma variedade de atividades biológicas, incluindo citotoxicidade em células endoteliais e efeitos pró-inflamatórios (Hodis *et al.*, 1994; Sevanian *et al.*, 1995 e1997; Chang *et al.*, 1997). Alguns estudos mostram aumento da concentração sérica da LDL(-) em pacientes com alto risco cardiovascular, hipercolesterolemia familiar, hipertrigliceridemia e diabetes mellitus (Gomes *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2006 ; Tai *et al.*, 2006; Bernitez *et al.*, 2006)

Existe um único estudo descrito sobre as alterações da LDL(-) em pacientes renais crônicos hemodialisados (Ziouzenkova *et al.* 1999), mas não há nenhum estudo em pacientes sob diálise peritoneal. Estudos sobre o aumento da peroxidação lipídica nestes pacientes são de extrema importância, visto que a detecção precoce destas alterações poderá contribuir para reduzir as complicações das DCV, o que refletiria na qualidade de vida nos pacientes renais crônicos (Kohlhagen & Kelly, 2003; Snively & Gutierrez, 2004). Neste estudo nos propomos avaliar as concentrações de LDL(-), seus

auto-anticorpos e imunocomplexos (IC) em pacientes renais crônicos sob hemodiálise e diálise peritoneal e relacioná-las ao estado nutricional destes pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA:

2.1 Rins e Doença Renal Crônica

Os rins são órgãos que lembram a forma de um grão de feijão, de coloração marrom-avermelhada, situados no espaço retroperitoneal, um de cada lado da coluna vertebral (Riella et al., 2003).

Figura 1: Estrutura dos Rins (Sociedade Brasileira de Nefrologia- SBN, 2004)

Os rins são considerados órgãos reguladores que, seletivamente excretam e conservam água e vários compostos químicos. Desta forma, ajudam a preservar a constância do meio interno, onde: mantêm o volume líquido, a osmolaridade, as concentrações de eletrólitos, e do estado ácido-básico; promovem excreção de produtos finais do metabolismo como, uréia, ácido úrico, fosfatos e sulfatos, bem como drogas e medicamentos. Além disto, os rins regulam a pressão arterial, produzem eritropoetina e promovem a ativação da vitamina D, essencial na regulação do balanço de cálcio e fósforo.

Os rins ainda catabolizam proteínas de baixo peso molecular, sendo responsáveis por várias funções metabólicas como, por exemplo: amoniogênese e gliconeogênese (Valtin & Schafer, 1995).

O néfron é a unidade funcional dos rins, e é nesta estrutura onde ocorrem todas as funções renais. Os rins contêm aproximadamente dois milhões de néfrons (Figura 2).

Figura 2: Estrutura do Néfron (Marieb, 1991).

A perda lenta, progressiva e irreversível dessas funções renais caracteriza a Doença Renal Crônica (DRC). Segundo a literatura, esta doença resulta em significativa morbimortalidade, pois devido à importância da função dos rins na manutenção da homeostasia, a DRC pode afetar quase todos os sistemas do organismo (Snively & Gutierrez, 2004).

Segundo o National Kidney Foundation (1998), (Quadro I) a progressão da doença foi dividida em 5 estágios de acordo com a taxa de filtração glomerular (TFG), sendo que os quatro primeiros correspondem à fase pré-dialítica (tratamento conservador), marcada pela síndrome urêmica, com progressivas alterações da homeostasia do organismo. Quando este tratamento não é mais suficiente, a terapia renal substitutiva deve ser introduzida, como, hemodiálise ou diálise peritoneal (Baiardi, 2002).

Quadro I: Divisão dos Estágios da DRC de acordo com o NKF, 2002.

Estágios	Descrição	TFG* (mL/min.1,73m ²)
1	Lesão renal – TFG normal ou ↑	≥90
2	Lesão renal – discreto ↓ TFG	60-89
3	Moderada ↓ TFG	30-59
4	Severa ↓ TFG	15-29
5	Insuficiência renal	< 15

Fonte: NKF, 2002.

A diálise peritoneal (DP), utiliza a membrana peritoneal como um filtro, onde mantém o equilíbrio metabólico através de uma solução eletrolítica de glicose (solução de diálise) na cavidade abdominal do paciente. Utiliza-se um cateter (rígido ou flexível) para acesso à cavidade, que envia a solução de diálise. As substâncias tóxicas e o excesso de água passam do peritônio para a solução de diálise. Depois de algumas horas a solução é drenada do abdômem e repete-se todo o processo novamente (Gloor, 2003).

Figura 3: Ilustração de um paciente em diálise peritoneal. Fonte NKF, 1998

A hemodiálise (HD) é um processo de filtração do sangue realizado por uma máquina, para remover o excesso de líquidos e metabólitos acumulados no organismo. Antes de iniciar o programa de HD, é necessário o acesso à circulação sanguínea do paciente. Esse acesso é a via através da qual o sangue é removido, enviando para dentro do hemodialisador, depurado e, então, retornado ao paciente. Existem diferentes tipos acesso, e todos requerem uma pequena cirurgia. Uma fístula arterio-venosa (FAV) é uma ligação interna de uma artéria com uma veia (Riella & Martins, 2003).

Figura 4: Ilustração de um paciente na hemodiálise. Fonte NKF, 1998

Figura 5: Acesso vascular na hemodiálise (fístula arterio-venosa). Fonte: NKF, 1998

Essas terapias substitutivas são fundamentais para prolongar a vida do paciente, no entanto, podem produzir reações inflamatórias e estresse oxidativo, devido ao contato do sangue com a superfície do dialisador, resultando no acúmulo de proteínas modificadas e produtos da peroxidação lipídica, aumentando a formação de LDL oxidada, o que poderia favorecer o desenvolvimento da aterosclerose (Fields 1999; Ziouzenkova *et al.*, 2002; Van *et al.*, 2003; Kalantar-Zadeh *et al.*, 2005). Assim, o estresse oxidativo parece ter um papel importante no desenvolvimento de DCV, que é uma causa importante de mortalidade nos pacientes renais crônicos (Prichards, 2003).

2.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como dano tissular decorrente de um desequilíbrio decorrente da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou deficiência dos mecanismos de defesa antioxidante (Cadenas & Sies, 1985; Locatelli *et al.*, 2003). As EROs podem ser produzidas em diversas vias metabólicas, tais como, cadeia respiratória mitocondrial, NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, lipoxigenase, cicloxigenase, heme oxigenase, enzimas do citocromo P-450, óxido nítrico sintase, dentre outras enzimas (Vaziri, 2004; Valko *et al.*, 2006).

Em condições normais, existe um equilíbrio entre a produção de EROs e os sistemas antioxidantes compostos por enzimas e antioxidantes da dieta. Na redução unieletrônica do oxigênio, a primeira ERO produzida é ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é gerado a partir da redução do oxigênio molecular por um elétron.

Que é posteriormente convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por dismutação direta ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD).

O peróxido de hidrogênio é reduzido à água pela catalase (CAT).

Ou glutathione peroxidase (GPX), que utiliza glutathione como doador de hidrogênio.

Fisiologicamente, as EROs são convertidas a água e oxigênio molecular, mas em presença de metais de transição (ferro ou cobre) ou excesso de $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 é convertido a radical hidroxila ($\cdot OH$), que é altamente reativo e causa lesões oxidativas em lípides, proteínas, açúcares e ácidos nucleicos. Este radical livre pode iniciar a peroxidação lipídica na presença de íons de metais de transição, tais como ferro e cobre (Descamps-Latscha, 2001; Drüeke *et al.*, 2001; Vaziri, 2004; Valko *et al.*, 2006).

(reação de Fenton)

(Reação de Haber-Weiss)

A mieloperoxidase (MPO) utiliza peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para a geração do ácido hipocloroso (HOCL), que é também altamente reativo. O HOCL pode interagir com várias moléculas, especialmente proteínas. Outra reação importante é a interação do $O_2^{\cdot-}$ com o óxido nítrico ($\cdot NO$), que leva à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual pode causar danos no DNA, nitração de proteínas e peroxidação lipídica (Vaziri, 2004).

2.3 Peroxidação Lipídica

Uma das principais consequências do aumento das EROs é a oxidação das partículas de LDL, formando LDL oxidada (LDL-ox), que possui alta bioatividade (Molavi & Mehta, 2004). EROs geradas por células inflamatórias ou derivadas de peroxidases têm sido propostas como agentes responsáveis pela oxidação da LDL na parede arterial. A peroxidação lipídica é iniciada pelo ataque de radicais livres às duplas ligações de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), onde ocorre a remoção do átomo de hidrogênio do grupo metila do PUFA e a formação de um dieno conjugado com uma configuração mais estável. Esse dieno conjugado reage rapidamente com oxigênio molecular, formando o radical peroxila, o qual remove um átomo de hidrogênio de um PUFA adjacente para formar hidroperóxido e outro radical lipídico, havendo a propagação da cadeia radicalar da lipoperoxidação. Desta forma, ocorre a produção de oxiesteróis, hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, incluindo o malonaldeído (MDA)

(Sniderman, 2004). Esses aldeídos reativos podem se ligar ao grupo amino da apoB100 na LDL, aumentando a carga negativa. O receptor de LDL em situações normais, reconhece um domínio específico na ApoB100, contendo cargas positivas da lisina, arginina e histidina; no entanto, alterações neste domínio resulta na diminuição da ligação da ApoB com o receptor. Um aumento da carga negativa da ApoB100, resultante da formação de lisolecitina e da derivatização de resíduos lisina, faz com que ocorra menor afinidade da LDL por seus receptores B/E e maior reconhecimento da LDL por receptores *scavenger*, presentes em macrófagos, o que induz a formação das *foam cells* (células espumosas) no processo inicial da aterogênese (Young & McEneny, 2001; Sniderman, 2004). Portanto, o acúmulo de lipídios na parede arterial depende da modificação oxidativa da LDL (Radulesco *et al.* 2004). A partícula de LDLox é considerada um importante fator na iniciação e propagação da placa aterosclerótica, processos inflamatórios e acúmulo de lipídios na parede arterial (Asatryan *et al.* 2003; Molavi & Mehta, 2004).

No início do processo aterosclerótico, a LDL oxidada estimula as células endoteliais a produzirem numerosas moléculas pró-inflamatórias, incluindo moléculas de adesão e fatores de crescimento. O rolamento dos leucócitos através da superfície endotelial é mediado por selectinas; a adesão de monócitos e células T ao endotélio, é mediada pela integrina VLA-4 presente nestas células, que interagem com VCAM-1. A citocina M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) estimula a proliferação e diferenciação de macrófagos e influencia suas funções como por exemplo, a expressão de receptores *scavenger*. O reconhecimento das partículas de LDLox pelos receptores *scavenger* induz a formação das células espumosas (*foam cells*). Na evolução das lesões ocorre a formação da placa fibrosa, formada em decorrência da proliferação e acúmulo de células musculares lisas. Na lesões caracterizadas por uma fina cápsula fibrosa e aumento de células inflamatórias pode ocorrer o rompimento da placa aterosclerótica e o desenvolvimento da trombose. A estabilidade da lesão aterosclerótica pode ser influenciada pela calcificação ou neovascularização, fatores comuns em lesões avançadas. As lesões podem reduzir o lúmen arterial, diminuindo o fluxo sanguíneo, o que causa manifestações clínicas tais como a angina pectoris e infarto agudo do miocárdio. Este processo ocorre de forma progressiva e gradual ao

longo da vida (Lusis, 2000; Libby, 2002). Na figura 3 pode ser visto o processo inicial da formação das placas ateroscleróticas.

Fonte: Libby, 2002

Figura 6: Estágios iniciais da formação da lesão aterosclerótica.

Como já citado acima, os aldeídos reativos podem aumentar a carga negativa da LDL e isso foi visto pela primeira vez em 1988 por Avogaro *et al.*, que isolaram por cromatografia de troca aniônica, uma fração da LDL com maior carga negativa do plasma de indivíduos normolipidêmicos, denominando-a de LDL eletronegativa, [LDL(-)], a qual apresentava características semelhantes à LDL minimamente oxidada.

O *pool* de partículas de LDL(-) não é formado exclusivamente pela oxidação da LDL, mas também origina-se de outros processos, como a glicação não enzimática, o enriquecimento em ácidos graxos não esterificados (NEFAs), modificações enzimáticas por fosfolipases, reação cruzada com a hemoglobina e outros mecanismos ainda não identificados ((Ursini & Sevanian 2002; Sanchez-Quesada *et al.*, 2004). A subfração de LDL(-) constitui-se em um *pool* de partículas heterogêneas em tamanho, com tendência à agregação, conteúdo diminuído de fosfolipídios e vitamina E, e aumento de colesterol

livre e proteínas, quando comparada à LDL nativa (LDL_n) (Avogaro *et al.*, 1988). Diferente da LDL oxidada *in vitro*, a LDL(-) não apresenta fragmentação da ApoB100 e outras alterações decorrentes de uma oxidação excessiva. Esta observação deu origem ao termo “LDL minimamente modificada” (LDL_{mm}), empregado por alguns grupos ao se referirem à LDL de Avogaro (Berliner *et al.*, 1990).

A presença da LDL(-) tem sido demonstrada por vários pesquisadores, porém sua origem ainda não está esclarecida (Avogaro *et al.*, 1988; Demuth *et al.*, 1996; Védie *et al.*, 1998; Tertov *et al.*, 1998; Moro *et al.*, 1999; De Castellarnau *et al.*, 2000; Rigla *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2004; Sanchez-Quesada *et al.* 2005; Bernítez *et al.* 2006, Oliveira *et al.*, 2006; Tai *et al.* 2006; Barros *et al.*, 2006).

A LDL(-) está presente no plasma de indivíduos normolipidêmicos na faixa de 0,1 a 5% da LDL total, mas aumenta consideravelmente em diferentes condições que poderiam produzir modificações na estrutura da LDL (Ursini *et al.*, 2002). Alguns estudos mostram um aumento da LDL(-) em pacientes com alto risco cardiovascular (Oliveira *et al.*, 2006) e com hipercolesterolemia familiar (Bittolo-Bon *et al.* 1986; Gomes *et al.*, 2004), hipertrigliceridemia (Védie *et al.* 1998; Sanchez-Quesada *et al.*, 2002; Tai *et al.*, 2006), diabetes mellitus tipos 1 e 2 [Sanchez-Quesada *et al.*, 2001; Moro *et al.*, 1999; Yano *et al.*, 2004; Sanchez-Quesada *et al.*, 2005; Bernítez *et al.*, 2006; Gambino *et al.*, 2006, Apolinário *et al.*, 2006), e atletas com atividade aeróbica intensa (Bernítez *et al.*, 2002). A LDL eletronegativa é citotóxica para células endoteliais, induzindo a apoptose e a produção de citocinas (IL-8), proteínas quimiotáticas para monócitos (MCP-1), e moléculas de adesão de células vasculares (VCAM-1) (Bernítez *et al.* 2004).

A relação entre a LDL(-) e a aterosclerose revela uma variedade de atividades biológicas, incluindo citotoxicidade e recrutamento de leucócitos (Hodis *et al.*, 1994; Sevanian *et al.*, 1995 e 1997; Chang *et al.*, 1997). Chen *et al.* (2003), demonstraram que em pacientes com hipercolesterolemia familiar, a LDL eletronegativa induzia apoptose de células endoteliais vasculares pela inibição da transcrição do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2). A LDL(-) isolada de pacientes normolipidêmicos (de Castellarnau *et al.*, 2000; Sanchez-Quesada *et al.* 2003) e hipercolesterolêmicos (Bernítez *et al.*,

2004) induz a expressão de IL-8 e da proteína quimiotática de monócitos 1(MCP-1), citocinas responsáveis pelo recrutamento de linfócitos e monócitos respectivamente na fase inicial da aterosclerose. Yang *et al.*(2003) observaram que a LDL(-), isolada de pacientes com hipercolesterolemia familiar, estimulava a adesão de células mononucleares em culturas de células endoteliais, o que poderia estar relacionado à expressão de IL-8, MCP-1 e VCAM-1 pela presença da LDL(-). A LDL(-) também aumenta a expressão do fator de necrose tumoral α (TNF- α), induzindo a expressão de VCAM 1 através da ativação do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- κ B) (Ziouzenkova *et al.*,2003).

Adicionalmente, muitas evidências sugerem o papel de lipídios polares não oxidados (ácidos graxos não esterificados-NEFA e lisofosfatidilcolina), na indução da expressão de citocinas pela LDL(-). Suriyaphol *et al.* (2002) observaram que a LDL, modificada enzimaticamente pela colesterol esterase e tripsina, aumentava o conteúdo de NEFAs e induzia a produção de IL-8 por células endoteliais. Sonoki *et al.* (2003) relataram que PLA2 (fosfolipase A2) ligada à LDL modificada induzia a expressão de MCP-1, o que poderia estar relacionado à lisolecitina ou aos ácidos graxos insaturados, oxidados ou não, que poderiam atuar como indutores de respostas inflamatórias no endotélio. A associação entre a enzima PAF-AH (acetil hidrolase do fator ativador de plaquetas) e a LDL(-) também poderia contribuir para a liberação de citocinas (Bernitez *et al.*, 2003), uma vez que a hidrólise mediada pela PAF-AH gera lisofosfatidilcolina e NEFAS oxidados, que são mediadores inflamatórios (Stafforini *et al.*, 1997; Macphee *et al.*, 1999; Tsimihodimos *et al.*, 2002).

Estes estudos mostram que apesar de sua heterogenicidade quanto à origem, a LDL(-) apresenta características inflamatórias e citotóxicas para células endoteliais, sugerindo seu envolvimento na aterosclerose (Sanchez-Quesada *et al.*, 2004), conforme indicado na figura 7.

Fonte: Sánchez-Quesada *et al.*, 2004

Figura 7: Heterogenicidade da LDL eletronegativa e participação na aterogênese.

Anticorpos que reconhecem as partículas de LDL modificadas também têm sido considerados como marcadores de risco da aterosclerose (Bergesio, 2001).

A presença da LDL minimamente modificada no plasma gera uma resposta autoimune com a formação de anticorpos e a subsequente formação de imunocomplexos (IC), que podem refletir a atividade da doença por um lado, mas também podem conferir proteção arterial. De acordo com Becarevic *et al.*, (2005), esses anticorpos estão envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose em modelos animais.

O papel dos anticorpos e sua relação com a progressão da aterosclerose em humanos ainda não está claramente estabelecida (Bing *et al.*, 2004). Mironova *et al.*, (1997) demonstraram que a incubação de macrófagos humanos com LDL-IC induziu a formação de células espumosas. O papel pró-aterogênico dos LDL-IC *in vivo* também foi proposto, demonstrando-se níveis plasmáticos aumentados de LDL-IC em pacientes com doença coronariana (Tertov *et al.*, 1996).

2.4 Peroxidação Lipídica na Doença Renal Crônica

Na doença renal crônica (DRC), a patologia cardiovascular é complexa e a aterosclerose tem sido discutida como sendo uma das principais causas de mortalidade. A prevalência de placas de ateroma em pacientes urêmicos é de aproximadamente 30% (Amann *et al.*, 2003).

O estresse oxidativo possui numerosos fatores de relevância para aterogênese, mas os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do estresse oxidativo nos doentes renais crônicos ainda não estão completamente elucidados (Ece *et al.*, 2006). O paciente renal apresenta um processo inflamatório crônico, sendo este vinculado também ao estresse oxidativo que ativa o NF- κ B, que induz a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e PCR), que por sua vez, leva à ativação e geração de EROs por leucócitos e macrófagos, formando assim, um ciclo intimamente associado ao processo de aterosclerose (Pecoits-Filho, 2002; Vaziri, 2004). O aumento na produção de EROs pode ocorrer também através da ativação de neutrófilos e monócitos polimorfonucleares pelas toxinas urêmicas (Vaziri, 2004; Jung *et al.*, 2004), ou pela bioincompatibilidade com membranas de diálise (Sommerburg *et al.* 1999; Lucchi *et al.* 2000; Descamps-Laischa *et al.*, 2001; Kosch, *et al.* 2003).

Estudos relatam o aumento dos níveis de LDLox em hemodialisados, porém, isto é pouco documentado na diálise peritoneal (Futatsuyama *et al.* 2002; O'Byrne *et al.*, 2001). Westhuyzen, *et al.* (1997), observaram que a LDL dos pacientes hemodialisados apresenta maior susceptibilidade à oxidação, quando comparada àquela de um grupo de indivíduos saudáveis. Mimic-Oka *et al.* (1999) e Clermont *et al.* (2000) observaram que o aumento da disfunção renal é acompanhado pela maior formação de MDA, peróxidos lipídicos e peróxido de hidrogênio, ou seja, pacientes hemodialisados estão mais susceptíveis ao estresse oxidativo. Adicionalmente, Muller *et al.* (2004) investigaram lesão em DNA, níveis de glutatona e MDA de pacientes em HD, comparados um grupo controle, e também verificaram que o estresse oxidativo está aumentado nos pacientes hemodialisados.

Alterações dos lipídios plasmáticos, apo B e apo E, foram avaliadas em pacientes sob diálise peritoneal, observando-se alterações na concentração de

lipoproteína e modificações na composição química de partículas lipoprotéicas, que podem contribuir para acelerar o processo de aterosclerose nestes pacientes (Horkko *et al.* 1994). Canestrari *et al.* (1995) determinaram as concentrações de MDA, glutatona oxidada e glutatona peroxidase em pacientes sob DP, comparados ao grupo controle, demonstrando que não houve diferença destes marcadores entre os grupos, em contraste aos estudos anteriores. Kim *et al.* (2000) avaliaram as concentrações de MDA e a capacidade antioxidante total do plasma, em relação à albumina, em pacientes sob DP, sugerindo que a peroxidação lipídica estava aumentada nestes pacientes e que isso não estava vinculado à capacidade antioxidante do plasma. Nourooz-Zadeh (1999), comparando grupos de pacientes em tratamento conservador, RD e DP, sugeriram que o aumento do estresse oxidativo pode estar relacionado ao tratamento dialítico e não à doença *per se*. Analisando as concentrações de LDLox em pacientes sob diálise peritoneal e hemodiálise, Futatsuyama *et al.* (2002) observaram que os pacientes em DP, especialmente os diabéticos, apresentaram níveis mais elevados de LDLox. Em contraste, alguns estudos não detectaram diferenças na peroxidação lipídica e nos marcadores de estresse oxidativo em pacientes renais crônicos sob tratamento conservador e hemodiálise, sugerindo não haver correlação entre o aumento do estresse oxidativo e os tipos de tratamento dos pacientes renais crônicos (Belazzi *et al.*, 1993; Prakash *et al.*, 2004).

A concentração de anticorpos anti-LDLox foi determinada no sangue de pacientes urêmicos sob tratamento conservador e hemodiálise por Bergesio *et al.* (2001), que demonstraram aumento progressivo da peroxidação lipídica em paralelo à diminuição da função renal. Da mesma forma, O'Byrne *et al.* (2001) observaram um aumento de anticorpos anti-LDLox em pacientes renais crônicos sob hemodiálise e diálise peritoneal, comparados ao grupo controle.

Com relação a LDL(-), existe apenas um único estudo na literatura, onde Ziouzenkova *et al.* (1999) verificaram que pacientes hemodialisados (HD) apresentaram aumento de LDL(-) e propuseram um mecanismo de formação da LDL(-) no sangue, durante o processo de hemodiálise, onde o heme da hemoglobina (Hb) poderia ser oxidada para o estado ferril (Fe^{4+}) ou perferril (Fe^{5+}) pela reação com hidroperóxidos lipídicos ou com H_2O_2 . Este último pode ser gerado por células inflamatórias, eritrócitos e plaquetas, ou,

durante a autoxidação da hemoglobina. A oxidação para o estado de Hb-ferril pode ser acompanhada pela formação do radical tirosil (Esquema 1), que poderia mediar reações de adição com outras proteínas.

Esquema 1: Autoxidação da hemoglobina (Ziouzenkova *et al.* 1999)

Desta forma, é possível que a LDL(-) seja formada em parte via ligação covalente com a hemoglobina e a ApoB-100 (Esquema 2) (Ziouzenkova & Sevanian, 2000).

Esquema 2: Reação entre Hemoglobina e ApoB-100 (Ziouzenkova *et al.* 1999)

O estudo das respostas bioquímicas e imunológicas mediadas pela LDL(-) poderia fornecer informações para se avaliar a progressão da doença e o papel desta subfração como um biomarcador de susceptibilidade de oxidação da LDL nos processos oxidativos *in vivo*. Considerando que a LDL(-) seja um indicador dos estágios iniciais da oxidação da LDL na circulação sistêmica, sua avaliação no plasma poderia representar uma ferramenta para acompanhar a progressão da aterosclerose nestes pacientes (Oliveira *et al.*, 2006).

2.5 Vitamina E e C como antioxidantes na Doença Renal Crônica (DRC)

O aumento das concentrações de LDL modificada também pode ser explicado pela diminuição dos sistemas de defesa antioxidante (Zwolinska *et al.*, 2006).

O efeito das EROs é balanceado pela ação dos antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos. Essas defesas antioxidantes são de extrema importância, pois representam a remoção direta dos radicais livres (pró-oxidantes), promovendo máxima proteção aos sítios biológicos alvos destas espécies. Os antioxidantes podem atuar por diversos mecanismos, tais como: reação específica com radicais livres ou metais de transição, regeneração de outros antioxidantes, modulação da expressão de genes que codificam as enzimas antioxidantes ou outras vias de proteção antioxidante. Adicionalmente, os antioxidantes devem ter boa biodisponibilidade, ou seja, ser bem absorvidos, atingir uma concentração adequada nos tecidos e fluidos biológicos, protegendo os compartimentos aquosos e/ou lipofílicos (Valko *et al.*, 2006). Baixas concentrações de antioxidantes no plasma favorecem a peroxidação lipídica (Mayer, 2003; Radulescu, 2004).

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel que existe em oito formas diferentes. O α -tocoferol, é a forma mais ativa da vitamina E em humanos e é um potente antioxidante biológico presente nas membranas celulares e lipoproteínas. Além de proteger contra a peroxidação lipídica, pode participar de outros mecanismos protetores através da modulação de algumas vias de sinalização celular (Pryor, 2000). A vitamina C (ácido ascórbico) é muito importante, pois atua em ambientes aquosos do organismo, onde regenera o radical α -tocoferol em membranas e lipoproteínas (Carr *et al.*, 1999; Kojo, 2004; Retsky *et al.*, 1999).

Lim *et al.* (2000) mostraram que os níveis de antioxidantes lipossolúveis estão alterados na hemodiálise e podem ser considerados marcadores de risco para estresse oxidativo nestes pacientes. Loughrey *et al.* (1994), determinaram as concentrações de MDA, selênio, glutathione peroxidase e vitaminas antioxidantes em pacientes sob tratamento conservador e hemodiálise, sugerindo exacerbação do estresse oxidativo pela hemodiálise, como indicado pelo aumento da peroxidação lipídica e diminuição dos

níveis de antioxidantes. Nesta mesma linha, Fiorillo *et al.* (1998) observaram que pacientes sob hemodiálise apresentam estresse oxidativo devido à diminuição da defesa antioxidante e um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Aguilera *et al.* (2002) encontraram diminuição dos níveis intracelulares de vitamina A e E em pacientes hemodialisados. Mayer *et al.* (2003) verificaram que o aumento da oxidação de lipídios e proteínas pelo processo dialítico foi inversamente proporcional à diminuição dos antioxidantes.

Pelo fato do α -tocoferol (vitamina E) ser transferido do soro para os eritrócitos pela HDL, Pastor *et al.* (1993) analisaram as concentrações de α -tocoferol no soro, na HDL e nos eritrócitos de pacientes sob hemodiálise e diálise peritoneal, observando que as concentrações de α -tocoferol estavam normais nos dois grupos estudados. Usberti *et al.* (2002) verificaram a relação entre a gravidade da doença cardiovascular, alguns marcadores de estresse oxidativo e a atividade antioxidante em pacientes sob hemodiálise e diálise peritoneal, demonstrando que existe uma relação entre o grau da peroxidação lipídica e a gravidade da doença cardiovascular em pacientes hemodialisados, mas os níveis de antioxidantes não tiveram relação com a doença cardiovascular. Em pacientes hemodialisados, por mais de 20 anos, observou-se níveis normais de vitaminas antioxidantes (A e E) e aumento de MDA, sugerindo que o estresse oxidativo estava presente nestes pacientes e não estava relacionado com níveis de antioxidantes (Drai *et al.*, 2001).

Sugere-se que a suplementação do alfa-tocoferol possa prevenir doenças cardiovasculares em pacientes renais crônicos, provavelmente através da redução dos prejuízos causados pelo estresse oxidativo (Amann *et al.*, 2002). Boaz *et al.* (2000) investigaram o efeito da suplementação com vitamina E na doença cardiovascular em pacientes hemodialisados e observaram uma redução de infarto do miocárdio. Da mesma forma, Galli *et al.* (2001) suplementaram vitamina E em pacientes hemodialisados e os resultados sugeriram que esta suplementação pode ser importante no combate à peroxidação lipídica nestes pacientes.

Dursun *et al.* (2002) estudaram os níveis de peroxidação lipídica expressos por TBARS, algumas enzimas antioxidantes e níveis de vitaminas E e C em pacientes renais crônicos sob tratamento conservador e sob hemodiálise em uso de vitaminas

antioxidantes, observando diminuição dos marcadores de estresse oxidativo em ambos os grupos estudados. Em contraste, a suplementação de pacientes hemodialisados com vitamina C, por via oral durante 2 meses, não alterou os marcadores de estresse oxidativo (Fumeron *et al.* 2006).

Wieczorowska-Tobis *et al.* (1996) demonstraram que a suplementação intraperitoneal de vitamina E em ratos sob diálise peritoneal promoveu uma diminuição dos níveis de MDA e aumento da permeabilidade do peritônio, o que poderia diminuir a efetividade da diálise. Mydlik *et al.* (2002), ao estudarem a influência da vitamina E (400mg/dia) em alguns parâmetros de defesa antioxidante (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, e vitamina A, C e E no plasma) e a peroxidação lipídica (MDA), em pacientes sob diálise peritoneal, concluíram que quando administrada oralmente esta vitamina é um agente antioxidante muito importante, pois houve uma diminuição significativa nos níveis de MDA.

Estudos mostram que a membrana de diálise enriquecida com α -tocoferol pode melhorar efetivamente o estresse oxidativo associado à hemodiálise e reduzir suas complicações (Satoh *et al.*, 2001; Baragetti *et al.*, 2006; Sasaki, 2006). Kobayashi *et al.* (2003) observaram que a vitamina E suplementada através do hemodialisador é muito útil, no ponto de vista clínico, para a melhoria dos riscos para aterosclerose.

Com base na presente revisão, observa-se que há aumento de estresse oxidativo em pacientes renais crônicos, principalmente sob hemodiálise. Estudos sobre o monitoramento da peroxidação lipídica nestes são de extrema importância, visto que o diagnóstico precoce permite a intervenção e pode ajudar a reduzir o desenvolvimento de doença cardiovascular e manter a qualidade de vida nos pacientes renais crônicos (Kohlhagen & Kelly, 2003; Snively & Gutierrez, 2004).

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

↳ Investigar a relação do estado nutricional, avaliado por indicadores antropométricos, com a LDL eletronegativa em pacientes renais crônicos sob hemodiálise e diálise peritoneal.

3.2 Objetivos Específicos

- ↳ Avaliar o estado nutricional antropométrico dos pacientes renais crônicos;
- ↳ Verificar as concentrações plasmáticas de LDL(-), anticorpos anti-LDL(-) e imunocomplexos (IC) LDL(-)/IgG;
- ↳ Avaliar as concentrações plasmáticas de ascorbato e α -tocoferol nestes pacientes;
- ↳ Relacionar as variáveis relativas ao estado nutricional com as concentrações de LDL(-), seus autoanticorpos e imunocomplexos.

4. METODOLOGIA

4.1 Casuística

Foram selecionados 25 pacientes com doença renal crônica (DRC) sob hemodiálise, 11 sob diálise peritoneal e 10 indivíduos sem doença renal crônica para compor o grupo controle.

Os pacientes foram atendidos na Clínica de Nefrologia *Centro Integrado de Nefrologia* (CIN), localizada em Realengo, município do Rio de Janeiro. Os pacientes renais crônicos sob hemodiálise realizavam 3 sessões de diálise por semana, com duração de 4 horas cada uma.

Tais pacientes foram selecionados e acompanhados pelo médico e docente do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro) Prof. Dr. Maurilo de Nazaré de Lima Leite Junior, nefrologista da clínica.

Os indivíduos saudáveis foram voluntários da Universidade Federal Fluminense selecionados (UFF) pela Prof^a Dr^a. Denise Mafra, colaboradora do projeto.

Todos os pacientes foram previamente consultados e participaram voluntariamente da pesquisa.

4.2 Procedimentos Éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado ao Comitê de Ética do FCFUSP, recebendo o número de protocolo CEP nº 324 (Anexo I).

4.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo todos aqueles pacientes que apresentavam as seguintes características: homens e mulheres na faixa etária de 18 a 65 anos, não fumantes. Para os pacientes hemodialisados, foram incluídos apenas os pacientes com fístula arteriovenosa como acesso vascular.

4.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com idade inferior a 18 anos e superior a 65 anos, fumantes, pacientes com doenças autoimune e infecciosa, diabetes mellitus, câncer e Aids; pacientes em uso de drogas catabolizantes, uso de cateter para o acesso hemodialítico e de suplementos vitamínicos antioxidantes.

4.5 Dados demográficos, clínicos e bioquímicos

As informações bioquímicas como valores das determinações plasmáticas do colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicérides, além de dados demográficos e clínicos foram obtidos por análise do prontuário médico e por entrevista com os pacientes.

4.6 Avaliação Antropométrica

A avaliação foi realizada por meio dos dados antropométricos: peso (peso seco p/ os dialisados), estatura, prega cutânea tricipital, circunferência braquial e da cintura, área muscular do braço e pelo cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC).

A aferição da massa corporal atual foi realizada com auxílio de uma balança calibrada especificamente, da marca FILIZOLA, com capacidade máxima de 150kg e subdivisões a cada 100 gramas. O indivíduo era posicionado de pé, no centro da base da balança, descalço e com roupas leves. A estatura foi obtida com o auxílio de um estadiômetro acoplado à balança, referida anteriormente, ficando o indivíduo descalço, com os calcanhares juntos, costas retas e braços estendidos ao lado do corpo.

O estado nutricional foi avaliado segundo o índice de massa corporal (IMC), obtido pela razão entre o peso e o quadrado da estatura, e sua classificação seguiu o proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 1995; OMS, 1997). A classificação do estado nutricional segundo o IMC é apresentada no quadro II.

Quadro II: Estado Nutricional de Adultos segundo o IMC.

Classificação	IMC
Magreza	$\leq 18,4 \text{ kg/m}^2$
Eutrofia	$18,5\text{-}24,9\text{kg/m}^2$
Pré-obesidade	$25\text{-}29,9\text{Kg/m}^2$
Obesidade	$\geq 30\text{Kg/m}^2$

Fonte: OMS, 1995; OMS, 1997.

Para melhor avaliar a reserva do tecido muscular, devido à correção da área óssea, foi calculada a área muscular do braço corrigida (AMBc) de acordo com a seguinte fórmula:

$$AMBc = [CB \text{ (cm)} - (\pi \times PCT \text{ (cm)})]^2 / 4\pi - n,$$

sendo $n = 6,5$ para mulheres e $n = 10$ para homens.

O protocolo para aferição da circunferência do braço seguiu o descrito a seguir. O braço a ser avaliado foi flexionado em direção ao tórax, formando um ângulo de 90°. Em seguida, localizou-se o ponto médio entre o acrômio e olécrano, e foi solicitado ao indivíduo permanecer com o braço estendido ao longo do corpo com a palma da mão voltada para a coxa. O braço foi então contornado com uma fita flexível no ponto marcado de forma ajustada, evitando compressão da pele ou folga. Para a aferição da prega cutânea tricipital o mesmo ponto médio utilizado para a circunferência do braço foi separado levemente do tecido adiposo do braço não-dominante e foi aplicado o adipômetro da marca Lange (Lohman et al. 1991).

Baseado nos valores de referência estabelecidos por FRISANCHO (1981), a classificação do estado nutricional através da AMBc foi feita de acordo com a Tabela 1.

Quadro III: Estado Nutricional de Adultos segundo a AMBc.

	Normal	Desnutrição Leve/Moderada	Desnutrição Grave
AMBc	Percentil > 15	Percentil entre 5 e 15	Percentil < 5

Para avaliar a reserva adiposa, foi utilizada a Prega Cutânea Tricipital (PCT), com método de aferição já citado anteriormente. Os cálculos de adequação foram efetuados para posterior classificação do estado nutricional de acordo com BLACKBURN & THORNTON (1979), como mostrado na Tabela 2.

$$\text{Adequação da PCT (\%)} = ((\text{PCT obtida (mm)} / \text{PCT percentil 50}) \times 100)$$

Quadro IV: Estado Nutricional de Adultos segundo a PCT.

	Desnutrição Grave	Desnutrição Moderada	Desnutrição Leve	Eutrofia	Sobrepeso	Obesidade
PCT	< 70%	70 - 80%	80 - 90%	90 - 110%	110 - 120%	> 120%

Fonte: BLACKBURN & THORNTON, 1979.

Para analisar o perfil de distribuição de gordura corporal foi aferida a circunferência da cintura. Para isto o paciente devia manter-se em pé e, com auxílio de uma fita métrica não-extensível, o indivíduo era circundado na linha natural da cintura, na região mais estreita entre o tórax e o quadril, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. A leitura era feita no momento da expiração. Os valores obtidos foram comparados com os valores limítrofes associados ao risco de desenvolvimento de complicações relacionadas à obesidade. Para homens este risco encontra-se aumentado quando os valores de circunferência da cintura são maiores que 102cm e para mulheres, quando maiores que 88cm (NCEP, 2002).

4.7 Coleta de sangue

Foram coletados 15mL de sangue em tubos *Vacutainer*[®] contendo EDTA como anticoagulante (1mg/mL) dos pacientes em jejum de 12h. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos, a 4°C, para a obtenção do plasma. Ao plasma foi adicionado um coquetel contendo BHT 100 µM, Aprotinina 10.0 µg/mL, Benzamidina 10.0 µM e PMSF 5.0 µM, antes do armazenamento a -80°C até a realização das análises.

4.8 Separação da LDL(-)

Purificação de LDL do plasma

O sangue foi obtido de voluntários hipercolesterolêmicos, coletado em tubos contendo EDTA e imediatamente centrifugado à 2500 rpm por 10 minutos à 4°C. O plasma obtido foi misturado a um coquetel contendo benzamidina 10.0 µM, PMSF 5.0 µM, BHT 100 µM e Aprotinina 10.0 µg/mL. Em seguida, o plasma foi submetido à ultracentrifugação sequencial à 55.000 rpm por 8h à 4°C para obtenção da LDL, utilizando-se uma ultracentrifuga Sorvall®, modelo Ultra Pro 80, com um rotor T-1270. A LDL isolada foi dializada contra tampão tris-HCL, pH 7,4, contendo EDTA, à 4°C, durante 4 horas com trocas sucessivas do tampão a cada hora (Redgrave *et al.*, 1975).

Obtenção da LDL (-) por cromatografia líquida (FPLC) Fast Protein Liquid Chromatography

O isolamento da LDL (-) foi realizado por FPLC com uma coluna UNO Q1(Bio Rad). O procedimento foi iniciado com a lavagem da coluna com 300 ml do tampão B (10 mmol/L tris-HCL, 1 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7,4) e depois equilibrada com 300 ml de tampão A (10 mmol/L tris- HCL, 1 mmol/L EDTA, pH 7,4). A LDL foi dializada contra o tampão A, sendo então injetada na coluna (antes da injeção na coluna a LDL foi filtrada com 2 filtros diferentes, 0,45µm e 0,22 µm para evitar entupimento da coluna). O procedimento cromatográfico estabeleceu-se um fluxo de 4 ml/ min em diferentes gradientes: 0 a 100 ml: 0% tampão A; 100 a 200 ml gradiente contínuo: 0 a 10 % tampão B; 200 a 400 ml: 22% tampão B; 400 a 600 ml: 50% tampão B; 600 a 800 ml: 100% tampão B (De Castellarnau *et al.*, 2000).

Eletroforese de lipoproteínas

A eletroforese foi realizada com a aplicação de 0,5 μ L de cada fração de LDL, separada por FPLC, em gel de agarose utilizando-se kit comercial (Celm; CELMGEL®) com o tampão tris, pH 9,5 a 100 volts. O tempo de corrida eletroforética foi de 14 minutos. O corante do gel utilizado foi Amido Black.

4.9 Determinação da concentração de LDL(-)

Método de ELISA com anticorpos monoclonal e policlonal (ELISA-misto)

Placas de imunoensaio de 96 poços (EIA/RIA, Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com 50 μ L de anticorpo policlonal de coelho anti-LDL eletronegativa (10 μ g/mL) diluído com tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,4, e incubadas *overnight* à 4°C. Após este período, o excesso de anticorpo foi removido e as placas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em PBS (tampão fosfato) e armazenadas em estufa a 37 °C por 1 hora e meia. Em seguida, as placas foram lavadas em 3 ciclos de 200 μ L por well com tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%) (pH 7,4). Posteriormente, 50 μ L de amostras dos soros dos grupos estudados foram previamente diluídas em PBS 5% de leite desnatado (1:10) e distribuídas na placa e incubada à 37°C por 90 minutos, em triplicata. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima, adicionando-se posteriormente 50 μ L de anticorpo monoclonal anti-LDL(-) biotilado (descrição abaixo) (diluído 1:1000 em PBS) com incubação de 90 minutos à 37°C. Após a lavagem, foram adicionados 50 μ L de streptavidina marcada com peroxidase (Stressgen Biotechnologies Corp.), diluída com PBS (1:1000) e incubado durante 1 hora. Após a lavagem da placa, foram adicionados a mistura de isoluminol e H₂O₂ (0,25 μ L/mL isoluminol). A leitura da quimiluminescência produzida foi realizada imediatamente, utilizando-se uma leitora de placas de ELISA para quimiluminescência (LumiCount, Packard Meriden, USA). A análise quantitativa foi realizada utilizando-se curvas padrão de LDL em cada placa, em triplicata. A curva padrão foi feita a partir das preparações com LDL(-) humana nas faixa de diluições de 1/1, 1/2, 1/4, 1/20 e 1/100.

Biotinilização do Anticorpo Monoclonal Anti-LDL(-)

O Anticorpo Monoclonal anti-LDL(-) foi dialisado com tampão Borato de Sódio 0,1M, pH 8,8, durante 12 horas. A seguir foi adicionado ao anticorpo 1 mg de biotina (éster de D-biotinoil- ϵ -ácido aminocaproic-N-hidroxisuccinimida) dissolvida em 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), nas seguintes proporções 250 μ g biotina/mg anticorpo. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 4 horas. Após este período foi adicionado 1M NH_4Cl por 10 minutos. Finalmente, o anticorpo foi dialisado em PBS pH 7,4.

5.0 Determinação de anticorpos anti-LDL eletronegativa

A determinação dos anticorpos foi realizada através de imunoensaio ELISA (Damasceno, 2006). Alíquotas da LDL eletronegativa foram diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,4, até a concentração final de 1 μ g/poço. Após o preparo das amostras, placas de 96 poços (EIA/RIA, Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas e incubadas *overnight* à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, sendo os sítios livres bloqueados com leite desnatado a 5% diluído em tampão fosfato (PBS), pH 7,4. As placas foram incubadas em estufa à 37°C por 1 hora e meia. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween (0,05%). Após esta etapa, as amostras de plasma foram diluídas em leite desnatado PBS 1% (1:100). Foram adicionados 50 μ L de cada amostra/poço, incubando-se por 2 horas à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas, conforme descrito acima. Posteriormente, foram adicionados 50 μ L/poço do anticorpo anti-IgG humana marcado com peroxidase (1:4000) diluído em leite 1%-PBS, sendo as placas incubadas por 1 hora à 37°C. Após este período, as placas foram lavadas e reveladas com OPD 1 pastilha para 5 mL de tampão (tampão citrato fosfato e 0,25 μ L de H_2O_2 /mL) e bloqueadas com 50 μ L/well de H_2SO_4 . As placas foram incubadas à temperatura ambiente, sendo a absorbância monitorada a 490nm. Os resultados foram apresentados como equivalentes de IgG anti-LDL eletronegativa (absorbância aplicada à equação da curva padrão, sendo o

valor obtido multiplicado pelo título). A curva padrão foi feita a partir das preparações com IgG total humana (10 mg/mL; marca Rockland) nas faixa de diluições de 1/10 a 1/500.

5.1 Detecção de imunocomplexos

A presença de imunocomplexos dos grupos estudados, foi realizada por ELISA (Tinahones *et al.* 2005). Brevemente, placas de polivinil (Costar) de 96 orifícios foram sensibilizadas com 10µg/ml de anticorpo policlonal de coelho fragmentado (porção Fab) diluído em PBS, 50µl/poço e mantido overnight a 4°C. Depois do bloqueio com PBS contendo 5% de leite desnatado por 2 horas a temperatura ambiente 200µl/poço, as placas foram incubadas com soro dos grupos estudados diluído 1/50 em PBS (50µl/poço) por 3 horas, à temperatura ambiente. Após este período adicionou-se 50µl/poço de anti-IgG humano conjugada a peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente. A revelação foi feita com 50 µl/poço (OPD, 1mg/ml, Sigma), dissolvido em tampão citrato-fosfato 100mM pH5,8, contendo 0,05% (v/v) de H₂O₂. A reação foi interrompida, após o aparecimento de cor, com 50µl/poço de H₂SO₄ 4N. Os resultados foram avaliados por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 492nm. Entre cada etapa as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-tween 0,01% (200µl/poço).

5.2 Determinação de ascorbato e α -tocoferol

A concentração de α -tocoferol nas amostras de plasma dos pacientes foi determinada por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). A extração dos antioxidantes lipossolúveis do plasma foi realizada pela adição de 0,25 ml de SDS 4 mM a 0,25 ml de amostra (plasma) em um tubo de extração protegido da luz, agitando-se por 10 segundos no vortex; em seguida foi adicionado 1 ml de metanol, agitando-se novamente por 1 minuto. A seguir, foi adicionado 1,5 ml de hexano contendo BHT (0,5 g/l) e agitou-se por 2,5 minutos; o material foi centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante retirado (hexano) para evaporação no nitrogênio. Após secagem, foi ressuspenso com 0,25 ml de fase móvel, com filtração em filtro Millex 0,22 μ m (Millipore) e foram injetadas no cromatógrafo. A determinação dos antioxidantes lipossolúveis foi feita utilizando-se o sistema cromatográfico com detector eletroquímico com potencial de +600mV (detecção de α -tocoferol). A coluna utilizada foi a de fase reversa C18 CG Nucleosil (CG do Brasil S/A) com fluxo de 1,0 mL por minuto da fase móvel composta por metanol:acetonitrila:clorofórmio (35:35:30, v/v/v) contendo perclorato de lítio 20 mM (necessária para a detecção eletroquímica). A curva de calibração dos antioxidantes lipossolúveis e a quantificação das amostras foi estabelecida com injeção de 20 μ L (Thurnhan *et al.*, 1988).

A análise das concentrações plasmáticas do ascorbato foi determinada por HPLC com detector eletroquímico (potencial = + 600 mv). As proteínas do plasma foram precipitadas com ácido perclórico 0,75% (Tsao ^Q Salimi, 1981) e o sobrenadante foi filtrado em membranas com poros de 22 μ m e injetado no cromatógrafo (20 μ L), através do injetor automático SIL-10A (Shimadzu). A quantificação das amostras foi feita com padrões externos, através de curvas de calibração com níveis múltiplos. Foi utilizado o mesmo sistema cromatográfico anterior, com uma coluna de fase reversa C18 CG-Nucleosil (CG do Brasil S/A). A fase móvel foi composta de acetato de sódio trihidratado (0,04 M), decilamina (1 mL) e EDTA (0,200 g/l) em 950ml de água deionizada; ácido acético glacial foi adicionado até atingir-se pH 5 e o volume foi completado para 1 litro com água deionizada. O fluxo da fase móvel foi de 1mL/minuto para todas as análises.

As concentrações plasmáticas de alfa-tocoferol foram normalizadas pelo conteúdo de colesterol da seguinte forma: Dividiu-se os valores das concentrações de alfa-tocoferol plasmático (μM) por 10 para se obter a concentração em $\mu\text{moles/dL}$ e em seguida dividiu-se diretamente pela concentração de colesterol, (mg/dL), obtendo-se a concentração de alfa-tocoferol em $\mu\text{moles/mg}$ de colesterol.

5.3 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ DP (Desvio padrão) ou mediana (máx.- min.). Foi utilizado One-Way ANOVA (ou Kruskal-Wallis, quando apropriado) para comparações, e o teste de Bonferroni foi utilizado para análises posteriores. As correlações entre as variáveis do estudo foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Os resultados estatisticamente significantes foram aceitos com $p < 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SPSS 11.0.

6. RESULTADOS

6.1 Características dos grupos

As características dos grupos estudados estão apresentadas na tabela 1. Hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi a causa de DRC em 72% dos pacientes sob HD e 90.9% sob DP. Não houve diferença significativa no tempo de diálise.

Tabela 1: Características gerais dos grupos estudados.

Parâmetros	HD =25	DP =11	Controles =10
Sexo F/M	13/12	9/2	7/3
Idade (anos)	48,1 ± 8,4 ^a	55,1 ± 6,3 ^a	42,2 ±12,5
Causa da doença			
HAS	18	10	-
RP	2	1	-
GC	5	-	-
Tempo de diálise (meses)	34,7 ± 20,9	29,8 ± 12,3	-

(HAS) = Hipertensão arterial sistêmica; (RP) = Rins policísticos; (GC) = Glomerulonefrite crônica

^a diferença entre os grupos p=0,002.

6.2 Dados Antropométricos dos Participantes do Estudo

A tabela 2 mostra o estado nutricional dos grupos estudados. Em relação ao IMC, 17 pacientes HD, 4 DP e 6 controles foram classificados como normais. Apenas 1 dos pacientes sob DP, foi considerado como moderadamente desnutrido. Foram considerados com sobrepeso e obesidade, 4 sob HD, 6 sob DP e 3 controles.

De acordo com a massa de gordura avaliada pelo PCT, 12 dos pacientes sob HD, 4 sob DP e 2 controles estavam abaixo do percentil 5. Sete HD, 7 DP e 2 controles apresentaram valores de circunferência da cintura acima dos valores recomendados.

Com relação à massa magra avaliada pela AMB, 4 dos pacientes HD, 1 DP e 3 controles estavam entre os percentis 5 e 15, enquanto 3 dos pacientes HD e 2 DP estavam abaixo do percentil 5. Os demais estavam dentro da normalidade.

Tabela 2: Dados Antropométricos dos grupos estudados

Grupos	HD(N=25)	DP(N=11)	Controle(N=9)
IMC (kg/m ²)	23,1±3,0	24,7±4,1	23,8±3,9
CC (cm) M/F	83,5±18,3/	97,7±10,2/	105,5±12,3/
	83,5±15,2	82,16±11,2	75,5 ± 10,4
PCT (mm)	13,4±5,0 ^{ab}	19±4,5 ^b	18,2±4,1 ^a
AMB (cm ²)	27,3±4,0	28,7±4,7	29±4,0

^a diferença entre grupos p=0,04;

^b diferença entre os grupos p=0,01.

6.3 Perfil Lipídico

As alterações no perfil lipídico segundo a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007), podem ser vistas no Gráfico 1, onde está apresentada a porcentagem dos pacientes que tinham baixas concentrações de HDL e concentrações elevadas de LDL-colesterol, colesterol total e triglicérides (TG). Na tabela 3 está apresentado o perfil lipídico dos grupos estudados.

Gráfico 1: Porcentagem dos pacientes com baixas concentrações de HDL-colesterol e concentrações elevadas de LDL-colesterol, colesterol total e triglicérides (TG).

Tabela 3: Perfil Lipídico dos grupos estudados

Grupos	HD	DP	Controles	Valores de referência
Colesterol Total (mg/dL)	194 ± 36	218 ± 34	186 ± 38	<200
HDL-c (mg/dL)	35 ± 7	39 ± 10	33 ± 13	>40
LDL-c (mg/dL)	117 ± 44	141 ± 33	127 ± 34	<130
VLDL-c (mg/dL)	43 ± 26	38 ± 13	30 ± 8	<30
Triglicerídeos (mg/dL)	217 ± 130	189 ± 64	151 ± 38,2	<150

6.4 LDL eletronegativa

As concentrações de LDL(-) nos pacientes HD ($576 \pm 233 \mu\text{g/mL}$) foram significativamente maiores quando comparadas às dos pacientes DP ($223 \pm 118 \mu\text{g/mL}$) e controles ($55 \pm 33 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,00001$). (Gráfico 2). Observou-se que as concentrações de LDL(-) nos pacientes sob HD e DP foram 10 vezes e 5 vezes (respectivamente) superiores às do grupo controle.

Gráfico 2: Concentrações de LDL (-) ($\mu\text{g/mL}$) nos grupos estudados.

6.5 Auto anticorpo anti LDL(-)

As análises mostraram que o grupo controle teve uma concentração maior do auto-anticorpo anti-LDL(-) IgG ($0,36 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$), quando comparado aos grupos DP ($0,28 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,003$) e HD ($0,2 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,001$). (Gráfico 3).

Gráfico 3: Concentrações de Anti-LDL (-) IgG auto-anticorpos ($\mu\text{g/mL}$) nos grupos estudados.

6.6 Imunocomplexos

Os níveis de Imunocomplexos (IgG- LDL-) no grupo controle ($0,35 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$) foram significativamente maiores comparados aos grupos HD ($0,15 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,00001$) e DP ($0,22 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,009$) (Gráfico 4).

Gráfico 4: Concentrações de Imunocomplexos LDL(-)/IgG ($\mu\text{g/mL}$) nos grupos estudados.

6.7 Ascorbato Plasmático

As concentrações plasmáticas de ascorbato de pacientes hemodialisados ($138 \pm 43 \mu\text{M}$) foram maiores comparados aos dos pacientes sob diálise peritoneal ($105 \pm 26 \mu\text{M}$) e controles ($98 \pm 36 \mu\text{M}$). (Gráfico 5). As concentrações de ascorbato em todos os pacientes estavam dentro dos valores referência ($>23 \mu\text{M}$).

Gráfico 5: Concentrações de ascorbato plasmático (μM) nos grupos estudados.

6.8 Alfa-Tocoferol plasmático

Não houve diferença estatística para as concentrações plasmáticas de alfa-tocoferol entre os grupos estudados, após a correção pelas concentrações de colesterol ($\mu\text{moles alfa-tocoferol /mg de colesterol}$ (Tabela 4).

Tabela 4: concentração de tocoferol em $\mu\text{moles/mg}$ de colesterol

Grupos	concentração de tocoferol em $\mu\text{moles/mg}$ de colesterol
HD	$0,2 \pm 1,3$
DP	$0,9 \pm 1,5$
CT	$1,2 \pm 2,8$

6.9 Correlações

As análises de correlação demonstraram que os valores de prega cutânea tricipital (PCT) se correlacionaram diretamente com as concentrações plasmáticas dos imunocomplexos ($r = 0,37$; $p = 0,01$) (Gráfico 6) e inversamente com as concentrações plasmáticas de LDL(-) ($r = -0,37$; $p = 0,018$) (Gráfico 7). As concentrações plasmáticas dos anticorpos IgG anti-LDL(-) se correlacionaram diretamente com os valores do IMC ($r = 0,83$ $p = 0,00001$) (Gráfico 8) e da circunferência da cintura (Gráfico 9) ($r = 0,75$ $p = 0,00001$). Houve correlação negativa entre as concentrações de LDL(-) e dos anticorpos IgG anti-LDL(-) ($r = -0,43$; $p = 0,003$) como mostra o gráfico 10. Não houve correlação entre IMC e LDL(-) no presente estudo.

Gráfico 6: Correlação entre Imunocomplexos LDL(-)/IgG ($\mu\text{g/mL}$) e PCT (mm).

Gráfico 7: Correlação entre LDL(-) ($\mu\text{g/mL}$) e PCT (mm).

Gráfico 8: Correlação entre anticorpos IgG (ug/mL) anti LDL(-) e IMC (Kg/m²).

Gráfico 9: Correlação entre anticorpos IgG (ug/mL) anti LDL(-) e circunferência da cintura (cm).

Gráfico 10: Correlação entre LDL(-) ($\mu\text{g/mL}$) e Anticorpos IgG anti-LDL(-) ($\mu\text{g/mL}$).

7. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a maioria dos pacientes encontrava-se eutrófico segundo o IMC, sendo que, apenas 1 paciente sob DP estava moderadamente desnutrido, 4 pacientes sob hemodiálise e 6 sob diálise peritoneal encontravam-se com sobrepeso e obesidade. Na população geral, este parâmetro está associado com aumento de doença cardiovascular. No entanto, o efeito do sobrepeso ou obesidade no pacientes renais crônicos é paradoxalmente na direção oposta, ou seja, um IMC alto está associado com maior sobrevida. Este fenômeno tem sido referido como “epidemiologia reversa” (Kalantar-Zadeh *et al.*, 2005).

Estudos recentes mostraram que pacientes obesos sob diálise apresentavam menor mortalidade (Wolfe *et al.*, 2000; Leavey *et al.*, 2001; Port *et al.*, 2002; Glanton *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 2004; Kalantar-Zadeh *et al.*, 2005). Dentre os pacientes sob DP, a quantidade de glicose absorvida da solução de diálise faz com que a desnutrição calórica quase não exista. A desnutrição protéica é mais comum devido à perda de nutrientes pelo dialisado e inibição do apetite (Ruggieri G. *et al.*, 1993).

A vitamina E (α -tocoferol) é um importante antioxidante contra radicais livres causadores de danos à LDL e às membranas biológicas, sendo que os níveis de antioxidantes de pacientes sob diálise são menores devido à diminuição da ingestão oral, restrições dietéticas, interações fármaco-nutriente, perdas durante o processo dialítico, ou, como resultado do aumento da degradação (Latscha, 2001; Ikizler, 2004; Luciak, 2004).

Nosso estudo mostrou que o alfa-tocoferol plasmático estava abaixo da normalidade em todos os pacientes sob diálise peritoneal, nos controles e na maioria dos pacientes hemodialisados. Muitos estudos mostraram concentrações similares de alfa-tocoferol plasmático entre controles e hemodialisados (Hultqvist *et al.*, 1997; Rock *et al.*, 1997; Zima *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 2000; Roob *et al.*, 2000; Lippa *et al.*, 2000; Clermont *et al.*, 2000; Handelman *et al.*, 2001). Galli *et al.* (2001) mostraram que na determinação dos níveis de vitamina E em pacientes hemodialisados, é importante corrigir a quantidade de vitamina em relação à quantidade de colesterol/triglicerídeos ou fosfolipídios, no plasma ou membranas celulares, respectivamente, porque quando esta

normalização não é realizada a concentração plasmática de vitamina E de pacientes hemodialisados pode ficar próxima à faixa de referência. Isto foi confirmado em nosso estudo. Além disso, os mesmos autores, sugeriram que os níveis de vitamina E no plasma de pacientes hemodialisados, mesmo dentro da normalidade, poderia ser insuficiente para proteger contra a peroxidação lipídica.

Com relação à vitamina C, sua deficiência é também uma complicação no tratamento de pacientes em diálise desde o início da terapia renal substitutiva, pois a principal fonte de vitamina C na dieta provém de alimentos ricos também em potássio, como por exemplo: laranja, morango e brócolis. Desta forma, os alimentos ricos em potássio são quase sempre restritos para pacientes em diálise, pois o processo de diálise remove o potássio com pouca eficiência e a hipercalemia é um dos maiores riscos de morbimortalidade nestes pacientes. Dentro dessas circunstâncias, pode ocorrer baixa ingestão de vitamina C (Ahmed & Weisberg, 2001). No entanto, este estudo mostrou que a ingestão de vitamina C nos pacientes hemodialisados estava dentro do recomendado.

Estudos mostram que os níveis de vitamina C plasmáticos em pacientes renais crônicos e sob diálise são menores quando comparados aos de indivíduos saudáveis (Locatelli *et al.*, 2003, Deicher & Hörl, 2003). A vitamina C plasmática nos pacientes sob diálise é freqüentemente <10 mM, sendo que níveis muito altos de vitamina C podem ocorrer, pois rins normais excretam vitamina C quando os níveis plasmáticos excedem 60 mM, mas o efeito da diálise sobre a vitamina C é muito variável (Jackson *et al.*, 1996; Levine *et al.*, 1996). Além disso, as concentrações plasmáticas de vitamina C refletem mais adequadamente a ingestão dietética do que o conteúdo nos tecidos e o *pool* corporal (Neumcke *et al.*, 1999). Isto poderia justificar as concentrações plasmáticas mais altas desta vitamina observadas no presente trabalho, em relação aos estudos anteriores.

A dislipidemia é um fator de risco independente associado com a aterosclerose e encontrado freqüentemente em pacientes sob diálise. O padrão clássico de dislipidemia nestes pacientes é caracterizado por aumento dos triglicerídeos, diminuição do HDL colesterol e, geralmente, colesterol total e o LDL-colesterol normal ou apenas um pouco

elevado o (Wanner & Quaschnig, 2001). Este perfil também foi observado no presente estudo.

Com relação a LDL (-), o único estudo já publicado (Ziouzenkova *et al.*, 1999), demonstrou que os níveis de LDL(-) nos pacientes sob hemodiálise foram significativamente maiores quando comparados ao grupo de indivíduos saudáveis. Nossos dados sobre LDL(-) foram semelhantes aos do trabalho supracitado e também mostramos, pela primeira vez, que pacientes sob DP apresentam níveis elevados de LDL(-), porém, menores quando comparados aos pacientes HD. De acordo com Tetta *et al.* 1991, os níveis plasmáticos de LDL minimamente modificada podem ser um parâmetro potencialmente útil para estimar o risco de progressão da aterosclerose associada à inflamação.

Em relação aos anticorpos IgG anti-LDL(-), este estudo demonstrou que este parâmetro estava aumentado no grupo controle em relação aos pacientes. O papel pró- ou anti-aterogênico dos anticorpos reativos a partículas de LDL modificadas ainda não está completamente elucidado, sendo que as respostas imuno-humoral específicas podem ser moduladas diferentemente quando comparadas com outros processos na aterogênese (Barros *et al.* 2006). Neste estudo, encontramos um aumento dos níveis de IgG anti-LDL(-) nos controles em relação aos pacientes. Este resultado sugere que os anticorpos IgG anti-LDL(-) podem ter um efeito protetor assim como podem estar associados com os estágios iniciais da aterosclerose nos pacientes HD e DP.

Os estudos são contraditórios, sendo que alguns indicam efeitos benéficos dos anticorpos anti-LDLox enquanto outros sugerem uma ação pró-aterogênica. Paiker *et al.*, (2000), investigaram os níveis de anticorpos reativos a LDLox como um marcador de aterosclerose em pacientes com hipercolesterolemia familiar (HF) e concluíram que os anticorpos anti-LDLox não poderiam ser utilizados como marcadores de risco aterosclerótico nestes pacientes. Em pacientes com doença renal crônica, demonstrou-se uma associação inversa entre a concentração de anticorpos anti-LDLox e a densidade da parede arterial, o que suportaria o conceito do papel anti-aterogênico destes anticorpos (Shoji *et al.*, 2003).

Os níveis de anticorpos IgG anti-LDL(-) foram avaliados por Barros *et al.* (2006) em crianças com antecedentes de HF, hipercolesterolêmicos ou

normocolesterolêmicos, com ou sem doença arterial coronariana relativa aos primeiros estágios, comparando-as a crianças sem antecedentes de HF. Os resultados mostraram que as crianças HF possuíam níveis baixos de anticorpos anti-LDL(-) independentemente dos níveis de LDL-colesterol e LDL(-).

Em um estudo recente, Oliveira *et al.* 2006, determinaram os níveis de LDL eletronegativa e seus auto-anticorpos em pacientes com angina estável e instável comparados a indivíduos sem doença cardiovascular, demonstrando que as duas variáveis poderiam ser utilizadas como marcadores para avaliar pacientes com alto risco de eventos coronarianos. De qualquer maneira, ainda não está definido qual classe de anticorpos, assim como, se sua ligação com diferentes epítomos nas partículas de LDLox facilitaria ou preveniria o processo aterogênico em adultos (Barros *et al.*, 2006).

A presença de anticorpos anti-LDLox e de imunocomplexos IgG/LDL tem sido demonstrada em pacientes com doença vascular e indivíduos saudáveis (Salonen *et al.*, 1992; Chiesa *et al.*, 1998; Festa *et al.*, 1998; Paiker *et al.*, 2000). Em nosso estudo, os níveis de imunocomplexos no grupo controle foram significativamente maiores comparados aos dos pacientes, sugerindo não haver relação destes imunocomplexos com o desenvolvimento da aterosclerose.

Holvoet *et al.* (2001) mostraram que o IMC é uma das variáveis mais envolvidas na concentração de LDLox circulante, embora os estudos que relacionam IMC com LDLox sejam controversos. Porreca *et al.* (2004) verificaram que o IMC se correlacionou positivamente com a LDLox em mulheres na pós menopausa. Em contraste, Uzun *et al.* (2004) não observaram essa correlação em pacientes obesos antes e depois da cirurgia de redução de estômago. As concentrações de LDLox e seus anticorpos não variaram significativamente entre indivíduos com peso normal e sobrepeso numa população japonesa, no entanto, neste mesmo estudo altas concentrações de LDLox foram encontradas em mulheres obesas e indivíduos obesos com hipertensão (Suzuki *et al.*, 2003).

No presente estudo não se observou correlação significante entre os valores de IMC e as concentrações de LDL(-), mas as concentrações plasmáticas dos anticorpos IgG anti-LDL(-) se correlacionaram diretamente com os valores do IMC e da

circunferência da cintura nos indivíduos estudados. Tem sido demonstrado que a obesidade está relacionada ao estresse oxidativo (Urakawa *et al.*, 2003) pelo fato do tecido adiposo possuir uma grande atividade metabólica. Embora a gordura abdominal possa estar envolvida com o estresse oxidativo, os estudos associando a gordura abdominal com estresse oxidativo ainda são escassos (Weinbrenner *et al.*, 2006). Alguns estudos que investigaram a redução da gordura corporal mostraram uma diminuição das concentrações plasmáticas de marcadores de estresse oxidativo após a redução de peso através de dieta (Dandona *et al.*, 2001; Vasankari *et al.*, 2001; Davi *et al.*, 2002; Porreca *et al.*, 2004; Raitakari *et al.*, 2004).

Têm-se observado que existe uma associação independente entre sobrepeso, gordura abdominal, marcadores de inflamação e estresse oxidativo (Pihl *et al.*, 2006). Recentemente Weinbrenner *et al.*, (2006) descreveram uma associação independente de circunferência da cintura e IMC com a LDLox e PCR (proteína C reativa) e observaram que a medida de da circunferência da cintura estava associada às concentrações de LDLox independentemente do IMC.

A medida da prega cutânea tricipital também retrata a reserva adiposa (Despre's *et al.*, 1991). Observamos neste estudo, que os valores de PCT se correlacionaram diretamente com as concentrações plasmáticas dos imunocomplexos e inversamente com as concentrações plasmáticas de LDL(-). Os pacientes hemodialisados apresentaram uma medida de PCT menor comparada aos outros grupos e uma maior concentração de LDL(-), ou seja, o aumento do estresse oxidativo pode estar relacionado com a diminuição da reserva de gordura nestes pacientes. Adicionalmente, foi encontrada uma correlação negativa entre as concentrações de LDL(-) e seus auto-anticorpos. Nossos dados sugerem que, diferente da população geral, um maior IMC e uma maior reserva de gordura podem estar relacionados com menor estresse oxidativo em pacientes renais crônicos sob diálise.

O presente estudo foi pioneiro no estudo da relação entre o estado nutricional, avaliado por indicadores antropométricos e LDL(-), seus auto-anticorpos e Imunocomplexos em pacientes renais crônicos, sob hemodiálise e diálise peritoneal. O papel da LDL(-) na aterosclerose tem sido bem descrito na literatura, assim como a relação entre doença cardiovascular em pacientes renais crônicos principalmente sob

hemodiálise. Um bom estado nutricional poderia influenciar o prognóstico da doença e o bem estar desses pacientes. Apesar de termos encontrado poucos pacientes desnutridos, a desnutrição ainda é bastante prevalente nesta população, o que indica a necessidade de outros estudos para se avaliar esta relação, contribuindo assim para um melhor monitoramento da doença.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As concentrações de LDL(-) foram mais elevadas nos pacientes sob hemodiálise comparados àqueles submetidos à diálise peritoneal e ao grupo controle.
- Pacientes sob hemodiálise e diálise peritoneal, apresentaram níveis diminuídos de anticorpos IgG anti-LDL(-) em relação ao grupo controle.
- Não houve correlação entre as concentrações plasmáticas de ascorbato e α -tocoferol com as de LDL(-), IgG anti-LDL (-) e imunocomplexos.
- Os valores de prega cutânea tricipital (PCT) se correlacionaram diretamente com as concentrações plasmáticas dos imunocomplexos e inversamente com as concentrações plasmáticas de LDL(-). As concentrações plasmáticas dos anticorpos anti-LDL(-) se correlacionaram diretamente com os valores do IMC e da circunferência da cintura;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, K.C.; GLANTON, C.W.; TRESPALACIOS, F.C., *et al.* Body mass index, dialysis modality, and survival: analysis of the United States Renal Data System Dialysis Morbidity and Mortality Wave II Study. *Kidney Int* Vol. 65, p. 597–605, 2004.

AGUILERA, A.; BAJO, M.A.; DEL PESO, G.; *et al.*; True deficiency of antioxidant vitamins E and A in dialysis patients. Relationship with clinical patterns of atherosclerosis. *Adv. Perit. Dial.* Vol. 18, p.206-11, 2002.

AHMED, J.; WEISBERG, L.S.; Hyperkalemia in dialysis patients. *Semin Dial* , Vol. 14, p. 348–356, 2001.

AMANN, K.; TORNIG, J.; BUZELLO, M.; *et al.*; Effect of antioxidant therapy with dl-alpha-tocopherol on cardiovascular structure in experimental renal failure. *Kidney Int.* Vol. 62(3), p.877-884, 2002.

AMANN, K.; TORNIG, J.; BUZELLO, M.; *et al.*; Effect of antioxidant therapy with dl-alpha-tocopherol on cardiovascular structure in experimental renal failure. *Kidney Int.* Vol. 62(3), p. 877-84, 2003.

APOLINÁRIO, E.; FERDEBAR, S.; PEREIRA, E.C.; *et al.*; Minimally modified (electronegative) LDL- and anti-LDL- autoantibodies in diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Intern. J. of Atherosclerosis*, Vol. 1, p. 42-47, 2006.

ASATRYAN, L.; ZIOUZENKOVA, O.; DUNCAN, R.; *et al.*; Heme and lipid peroxides in hemoglobin-modified low-density lipoprotein mediate cell survival and adaptation to oxidative stress. *Blood*. Vol. 102(5), p.1732-9, 2003.

AVOGARO, P.; BON, G.B.; CAZZOLATO, G.; Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis*. Vol. 8, p. 79-87, 1988.

BAIARDI, F.; ESPOSTI, E.D.; COCCHI, R.; *et al.*; Effects of clinical and individual variables on quality of life in chronic renal failure patients. *J Nephrol*, Vol. 15, p.61-67, 2002.

BAGARETTI, I.; FURIANI, S.; VETTORETTI, S.; *et al.*; Role of vitamin E-coated membrane in reducing advanced glycation end products in hemodialysis patients: a pilot study. *Blood Purif.* Vol. 24(4), p. 369-376, 2006.

BARROS, M.R.; BERTOLAMI, M.C.; ABDALLA, D.S.; *et al.*; Identification of mildly oxidized low-density lipoprotein (electronegative LDL) and its auto-antibodies IgG in children and adolescents hypercholesterolemic offsprings. *Atherosclerosis*. Vol.184(1), p.103-7, 2006.

BECAREVIC, M.; ANDREJEVIC, M.; BONACI-NIKOLIC, B.; et al.; Anti-oxLDL antibodies—marker for arterial thromboses in antiphospholipid syndrome? Clin Lab. Vol. 51(5-6), p. 279-83, 2005.

BELLAZZI, R.; MAGGI, E.; BELLOMO, G.; et. al. Low-density lipoprotein oxidation and antioxidized LDL antibodies in peritoneal dialysis patients; Adv. Perit. Dial. Vol. 9, p.312-7, 1993.

BERNÍTEZ, S.; SANCHEZ-QUESADA, J.L.; LUCERO, L.; et al.; Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. Atherosclerosis. Vol.160(1), p. 223-32, 2002.

BERNÍTEZ, S.; SANCHEZ-QUESADA, J.L.; RIBAS, V.; et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative LDL subfraction. Circulation; Vol.108 p.92–96, 2003.

BERNÍTEZ, S.; ORDONEZ-LLANOS, J.; FRANCO, M.; et al. Effect of simvastatin in familial hypercholesterolemia on the affinity of charge-differing low-density lipoprotein subfractions to the low-density lipoprotein receptor. Am J Cardiol; Vol. 93 p.414–420, 2004.

BERNÍTEZ, S.; PEREZ, A.; WAGNER, A.M.; et al.; Electronegative low-density lipoprotein subfraction from type 2 diabetic subjects is proatherogenic and unrelated to glycemic control. Diabetes Metab Res Rev. Vol. 23(1), p. 26-34, 2006.

BERGESIO, F.; MONZANI, G.; CIUTI, R.; et. al.; Autoantibodies against LDL in Chronic renal failure: role of renal functions, diet and lipids. Nephron, Vol. 87(2), p.127-33, 2001.

BERLINER JA, TERRITO MC, SEVANIAN A, RAMIN S, KIM JA, BAMSHAD B, ET AL. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. J Clin Invest Vol. 85, p.1260-6, 1990.

BING, H.; WANG, J.; ZHANG, C.; et al.; Positive correlation between in vivo LDL and LDL immune complexes. Clin. Biochem. Vol. 37 p. 72-75, 2004.

BITTOLO-BON, G.; CAZZOLATO, G.; AVOGARRO, P.; Probucol protects low-density lipoproteins from in vitro and in vivo oxidation. Pharmacol. Res. Vol. 29(4), p.337–44, 1994.

BLACKBURN, G.L.; THORNTON, P.A. Nutritional assessment of the hospitalized patients. Med. Clin. North. Am. Vol. 63, p. 1103-1115, 1979.

BOAZ, M.; SMETANA, S.; WEINSTEIN, T.; et. al.; Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. Lancet. Vol. 7;356(9237), p.1213-8, 2000.

CADENAS, E.; SIES, H.; Oxidativestress: excited oxygen species and enzyme activity. *Adv. Enzyme Regul.* Vol. 23, p.217-37, 1985.

CANESTRARI, F.; BUONCRISTIANI, U.; GALLI, F.; Redox state, antioxidative activity and lipid peroxidation in erythrocytes and plasma of chronic ambulatory peritoneal dialysis patients. *Clin. Chim. Acta.* Vol. 31;234(1-2), p.127-36, 1995.

CARR, A.; FREI, B.; Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.*;Vol.13 p.1007-1024, 1999.

CHANG, Y.H.; ABDALLA, D.S.P.; SEVANIAN, A.; Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Rad Biol Med* ; Vol. 23 p.202–214, 1997.

CHEN, C.H.; JIANG, T.; YANG, J.H.; et al. Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription. *Circulation*; Vol.107 p.2102–2108, 2003.EA

CHIESA, R.; MELISSANO, G.; CASTELLANO, R.; et al.; In search of biological markers of high-risk carotid artery atherosclerosis plaque-enhanced LDL oxidation; *Ann. Vasc. Surg.* Vol. 12 p. 1-9, 1998.

CLERMONT, G.; LECOUR, S; LAHET,J.; et. al.; Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients.*Cardiovasc. Res.* Vol.18;47(3), p. 618-23, 2000.

DAMASCENO, N.; SEVANIAN, A.; APOLINÁRIO, E.; et al.; Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL-) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. *Clin. Biochem.* Vol. 39, p, 28–8, 2006.

DANDONA, P., MOHANTY, P., GHANIM, H., et al.;The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* Vol.86, p.355– 62, 2001.

DAVI, G., GUAGNANO, M.T., CIABATTONI, G., et al.; Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA* Vol.288, p.2008 –14, 2002.

DE CASTELLARNAU, C.; SANCHEZ-QUESADA, J.L.; BENYTEZ, S.; et al. Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; Vol. 20 p.2281–2287, 2000.

DEICHER, R.; HÖRL, W.H.; Vitamin C in chronic kidney disease and hemodialysis patients. *Kidney Blood Press Res*, Vol. 26, p. 100–106, 2003.

DEMUTH, K.; MYARA, I.; CHAPPEY, B.; et al. A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; Vol.16 p.773–783, 1996.

DESCAMPS-LATSCHA, B.; DRUEKE, T.; WITKO-SARSAT, V.; Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial*. Vol. 14(3), p.193-9, 2001.

DESPRÉS, J.; PRUD'HOMME, D., POULIOT, M., et al.; Estimation of deep abdominal adipose-tissue accumulation from simple anthropometric measurements in men. *Am J Clin Nutr* Vol. 3, p.471–477, 1991.

DRAI, J.; BANNIER, E.; CHAZOT, C.; et. al.; Oxidants and antioxidants in long-term haemodialysis patients. *Farmacol*, Vol. 56(5-7), p.463-5, 2001.

DRUEKE, T.B.; NGUYEN-KHOA, T.; MASSY, Z.A.; et al.; Role of oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerosis of uremia. *Kidney Int Suppl*. Vol. 78, p. 114-9, 2001.

DURSUN, E.; OZBEN, T.; SULEYMANLAR, G.; et. al. Effect on hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. *Clin. Chem. Lab. Med*. Vol. 40(10), p.1009-13, 2002.

ECE, A.; GURKAN, F.; KERVANCIOGLU M.; et al.; Oxidative stress, inflammation and early cardiovascular damage in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* Vol. 21, p. 545–552, 2006.

FESTA, A.; KOPP, H.P.; SCHENTHANER, G.; et al.; Autoantibodies to oxidized Low density lipoprotein in IDDM are related to metabolic control and microvascular complications. *Diabetologia* vol.41 p. 350-356, 1998.

FIELDS, M.; Invited commentary: Role of trace elements in coronary heart disease. *British Journal of Nutrition*, Vol. 81, p. 85-86, 1999.

FIORILLO, C.; OLIVIERO, C.; RIZZUTI, G.; et. al.; Oxidative stress and antioxidant defenses in renal patients receiving regular haemodialysis. *Clin. Chem. Lab. Med*. Vol. 36(3), p.149-53, 1998.

FRISANCHO, A.R.; Anthropometric Standards for the assessment of growth and nutritional status. University of Michigan, p.189, 1990.

FUTATSUYAMA, M.; OIWA, T.; KOMATSU, Y.; Correlation between oxidized low-density lipoprotein and other factors in patients on peritoneal dialysis. *Adv. Perit. Dial*. Vol. 18, p.192-4, 2002.

FUMERON, C.; NGUYEN-KHOA, T.; SALTIEL, C.; et al.; Effects of oral vitamin C supplementation on oxidative stress and inflammation status in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* Vol. 20(9) p. 1874-9, 2006.

GALLI, F.; ZSUZSA, V.; BALLA, J.; et al.; Vitamin E, lipid profile, and peroxidation in hemodialysis patients. *Kidney Int.* Vol. 59, 78, s-, p.148-154, 2001.

GAMBINO, R.; PISU, E.; PAGANO, G.; et al.; Low-density lipoproteins are more electronegatively charged in type 1 than in type 2 diabetes mellitus. *Lipids*. Vol. 41(6), p. 529-33, 2006.

GLANTON, C.W.; HYPOLITE, I.O.; HSHIEH, P.B.; et al. ; Factors associated with improved short term survival in obese end stage renal disease patients. *Ann Epidemiol*, Vol. 13 p. 136-43, 2003.

GLOOR, H.J.; 20 years of peritoneal dialysis in a mid-sized Swiss hospital. *Swiss Med. Wkly*, 13; Vol. 133(45-46), p. 619-24, 2003.

GOMES, L.F.; ALVES, A.F.; SEVANIAN, A.; et al.; Role of beta2-glycoprotein I, LDL-, and antioxidant levels in hypercholesterolemic elderly subjects. *Antioxid Redox Signal* Vol. 6(2), p. 237-44, 2004.

HANDELMAN, G.J.; WALTER, M.F.; ADHIKARLA, R.; et al.; Elevated plasma F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney Int.* Vol.59 p. 1960-1966, 2001.

HODIS, H.N.; KRAMSCH, D.M.; AVOGARRO, P.; et al.; Biochemical and cytotoxic characteristic of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). *J Lipid Res* 3Vol. 5, p.663-77, 1994.

HOLVOET, P., MERTENS, A., VERHAMME, P., et al.; Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Vol.21, p.844-8, 2001.

HORKKO, S.; HUTTUNEN, K.; LAARA, E.; et al.; Effects of three treatment modes on plasma lipids and lipoproteins in uraemic patients. *Ann Med.* Vol. 26(4), p. 271-82, 1994.

HORKKO, S.; HUTTUNEN, K.; KORHONEN, T.; et al.; Decreased clearance of low-density lipoprotein in patients with chronic renal failure. *Kidney Int.* Vol. 45(2), p. 561-70, 1994.

HULTQVIST, M.; HEGBRANT, J.; NILSSON-THORELL, C.; et al.; Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E, and/or malondialdehyde as markers of oxygen free radical production during hemodialysis. *Clin. Nephrol.* Vol. 47, p. 37-46, 1997.

IKIZLER, T.; Role of Nutrition for Cardiovascular risk reduction in chronic Kidney disease patients. *Adv. In Chronic. Kidney disease*, Vol. 11(2), p.162-171, 2004.

ISLAM, K.N.; O'BRYNE, D.; DEVARAJ, S.; *et al.*; Alpha-tocopherol supplementation decreases the oxidative susceptibility of LDL in renal failure patients on dialysis therapy. *Atherosclerosis*, Vol.150(1), p.217-24, 2000.

JACKSON, P.; LOUGHREY, C.M.; LIGHTBODY, J.H.; *et al.* Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin Chem*; Vol. 41, p. 1135–1138, 1995.

JUNG,H.; CHOI, D.; LEE, S.; Serum Malondialdehyde and Coronary Artery Disease in Hemodialysis Patients. *Am. J. Nephrol.* Vol. 24, p. 537-542, 2004.

KALANTAR-ZADEH, K.; ABBOTT, K.C.; SALAHUDEEN, A.K.; *et al.*; Survival advantages of obesity in dialysis patients. *Am J Clin Nutr* Vol. 81, p. 543–554, 2005.

KALANTAR-ZADEH, K.; KOOPLE, J.D.; KILPATRICK, R.D.; *et al.*; Association of morbid obesity and weight change over time with cardiovascular survival in hemodialysis population. *Am J Kidney Dis*, Vol. 46(3), p. 489-500, 2005.

KIM, S.B.; YANG, W.S.; MIN, W.K.; *et al.*; Reduced oxidative stress in hypoalbuminemic CAPD patients. *Perit. Dial. Int.* Vol. 20(3), p.290-4, 2000.

KOBAYASHI, S.; MORIYA, H.; ASO, K.; *et al.*; vitamin E-bonded hemodialyzer improves atherosclerosis associated with a rheological improvement of circulating red blood cells. *Kidney Int.* Vol. 63(5), p. 1881-7, 2003.

KOHLAGEN, J.; KELLY, J.; Prevalence of vascular risk factors and vascular disease in predialysis chronic renal failure. *Nephrology(Carlton)*. Vol. 8(6), p. 274-9; 2003.

KOJO, S.; VITAMIN C: basis metabolism and its function as a index of oxidative stress, *Curr. Med. Chem.* Vol. 11 p.1041-1064, 2004.

KOSCH, M.; LEVERS, A.; FOBKER, M.; *et al.*; Dialysis filter type determines the acute effect of haemodialysis on endothelial function and oxidative stress. *Nephrol. Dial. Transplant.* Vol. 18(7), p. 1370-1375, 2003.

LATSCHA, B.; DRUEKE, T.; SARSAT, V.; Dialysis-induced oxidative stress: Biological Aspects, clinical consequences, and therapy. *Seminars in Dialysis*, Vol. 14(3), p.193-199, 2001.

LEAVEY, S.F.; MCCULLOUGH, K.; HECKING, E.; *et al.*; Body mass index and mortality in 'healthier' as compared with 'sicker' haemodialysis patients: results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 16, p. 2386–94, 2001.

LEVINE, M.; RUNSEY, S.; WANG, Y.; *et al.* Vitamin C. In: Ziegler EE, Filer LJ,Jr, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. ILSI Press, Washington, DC: p. 146–159, 1996.

LIBBY, P.; Atherosclerosis. *Nature* Vol. 420 p. 19-26, 2002.

LIM, P.S.; CHAN, E.C.; LU, T.C.; et al. Lipophilic antioxidants and iron status in ESRD patients on hemodialysis. *Nephron*, Vol. 86(4), p. 428-35, 2000.

LIPPA, S.; COLACICCO, F.; BONDANINI, C.; et al.; Plasma levels of coenzyme Q10, vitamin E and lipids in uremic patients on conservative treatment: some possible biochemical and clinical implications. *Clin. Chim. Acta*. Vol. 291 p. 81-91, 2000.

LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; ECKARDT, K.U.; et al.; Oxidative stress in end-stage renal disease: An emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 18, p. 1272 –1280, 2003.

LOHMAN, T.G.; ROCHE, A.F.; MARTORELL, R.; Anthropometric standardization reference manual. Abridged edition, p.90, 1991.

LOUGHREY, C.M.; YOUNG, I.S.; LIGHTBODY, J.H.; et al.; Oxidative stress in haemodialysis. *QJM*, Vol. 87(11), p. 679-83, 1994.

LUCCHI, L.; BERGAMINI, S.; BOTTI, B., et al., Influence of Different Hemodialysis membranes on Red Blood cell susceptibility to oxidative stress. *Artificial Organs*, Vol. 24(1), p. 1-6, 2000.

LUCIAK, M.; Antioxidants in the treatment of patients with renal failure. *Rocz. Akad. Med. Biaymst.* Vol. 49, p.157-161, 2004.

LUSIS, A.J.; Atherosclerosis. *Nature*. Vol. 14, p.233-41, 2000.

MACPHEE, C.H.; MOORES, K.E.; BOYD, H.F.; et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J.* Vol. 338 p.479–487, 1999.

MARIEB, E.N. Essentials of human anatomy and physiology. 3.ed. Redwood City: Benjamin, Cummings, p.405, 1991.

MAYER, B.; ZITTA, S.; GREILBERGER, J.; et al.; Effect of hemodialysis on the antioxidative properties of serum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1638-267-272, 2000.

MIMIC-OKA, J.; SIMIC, T.; DJUKANOVIC, L.; et al.; Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin Nephrol.* Vol. 51(4), p.233-41, 1999.

MIRONOVA, M.; VIRELLA, G.; VIRELLA-LOWELL, I.; et al.; Anti-modified LDL antibodies and LDL-containing immune complexes in IDDM patients and healthy controls. *Clin. Immunol. Immunopathol.* Vol. 85(1), p. 73-82, 1997.

MOLAVI, B.; MEHTA, J.L.; Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Curr. Opin. Cardiol.* Vol. 19(5), p.488-93, 2004.

MORO, E.; ALESSANDRINI, P.; ZAMBO, C.; et al.; Is glycation of low density lipoproteins in patients with Type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition? *Diabet Med* Vol. 16(8), p. 663-9, 1999.

MULLER, C.; EISENBRAND, G.; GRADINGER, M.; et. al.; Effects of hemodialysis, dialyser type and iron infusion on oxidative stress in uremic patients. *Free Radic. Res.* 38(10):1093-100, 2004.

MYDLIK, M.; DERZSIOVA, K.; RACZ, O.; et al. Vitamin E as an antioxidant agent in CAPD patients. *Int. J. Artif. Organs.*, Vol. 25(5), p. 373-8, 2002.

NEUMCKE, I.; SCHNEIDER, B., FANDREY, J.; et al.; Effects of pro- and antioxidative compounds on renal production of erythropoietin. *Endocrinology*, Vol. 140 p. 641–645, 1999.

NOUROOZ-ZADEH, J.; Effect of dialysis on oxidative stress in uraemia. *Redox Rep.* Vol. 4(1-2), p.17-22, 1999.

O'BYRNE, D.; DEVARAJ, S.; ISLAM, K. et. al.; Low-density lipoprotein (LDL)-induced monocyte-endothelial cell adhesion, soluble cell adhesion molecules, and autoantibodies to oxidized-LDL in chronic renal failure patients on dialysis therapy. *Metabolism.* Vol. 50(2), p. 207-15, 2001.

OLIVEIRA, J.A.; SEVANIAN, A.; RODRIGUES, R.J.; et al.; Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. *Clin Biochem* Vol. 39(7), p. 708-14, 2006.

PASTOR, M.C.; SIERRA, C.; BONAL, J.; et. al.; Serum and erythrocyte tocopherol in uremic patients: effect of hemodialysis versus peritoneal dialysis. *Am. J. Nephrol.* Vol. 13(4), p. 238-43, 1993.

PECOITS-FILHO, R.; LINDHOLM, B.; STENVINKEL, P.; The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis(MIA) syndrome-The heart of the matter; *Nephrol. Dial. Transplant. Suppl.* Vol.11, p.28-31, 2002.

PAIKERJ.E.; RAAL, F.J.; VON ARB, M.; Auto-antibodies against LDL as a marker of coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolaemia. *Ann. Clin. Biochem.* Vol.37 p. 174-178, 2000.

PIHL, E., ZILMER, K., KULLISAAR, T., et al.; Atherogenic inflammatory and oxidative stress markers in relation to overweight values in male former athletes. *Int Obes (Lond)* Vol. 30(1), p. 141-6, 2006.

PEREIRA, E.C.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; et al.; Antioxidant effect of simvastatin is not enhanced by its association with alpha-tocopherol in hypercholesterolemic patients. *Free Radic Biol Med* Vol. 37(9), p. 1440-8, 2004.

PRAKASH, M.; UPADHYA, S.; PRABHU, R.; Protein thiol oxidation and lipid peroxidation in patients with uraemia. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* Vol. 64(6), p. 599-604, 2004.

PRICHARDS. Risk factors for coronary artery disease in patients with renal failure. *Am. J. Med Sci.* Vol. 325(4), p. 209-23, 2003.

PRYOR, W.A.; Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Rad. Biol. Med.* Vol. 28 p.141-164, 2000.

PORT, F.K.; ASHBY, V.B.; DHINGRA, R.K.; et al.; Dialysis dose and body mass index are strongly associated with survival in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, Vol. 13, p. 1061-6, 2002.

PORRECA, E., DI FEBBO, C., MORETTA, V., et al.; Circulating leptin is associated with oxidized LDL in postmenopausal women. *Atherosclerosis* Vol.175, p.139-43, 2004.

RADULESCO, L.; STANCU, C.; ANTOHE, F.; Antibodies against human oxidized low-density lipoprotein (LDL) as markers for human plasma modified lipoproteins. *Med Sci Monit*, Vol. 10(7), p. 207-214, 2004.

REDGRAVE, T. G., ROBERTS, D. C., WEST, C. E.: Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem* Vol. 65 (1-2), p. 42-9, 1975.

RAITAKARI, M., ILVONEN, T., AHOTUPA, M., et al.; Weight reduction with very-low-caloric diet and endothelial function in overweight adults: role of plasma glucose. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Vol. 24, p.124-8, 2004.

RETSKY, K.L.; CHEN, K.; ZEIND, J.; et al.; Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radic. Biol. Med.* Vol. 26(1-2), p. 90-98, 1999.

RIELLA, M.C., MARTINS, C.; *Nutrição e hemodiálise*. In: Riella, M.C.; Martins, C. Guanabara Koogan S.A. (Ed.). *Nutrição e o Rim*. Rio de Janeiro, p.114-130, 2003.

RIGLA, M.; SANCHEZ-QUESADA, J.L.; ORDONEZ-LLANOS, J.; et al.; Effect of physical exercise on lipoprotein (a) and low-density lipoprotein modifications in type 1 and type 2 diabetic patients. *Metabolism*. Vol. 49(5), p. 640-7, 2000.

ROCK, C.L.; JAHNKE, M.G.; GORENFLO, D.W; et al; Racial group differences in plasma concentrations of antioxidant vitamin and carotenoids in hemodialysis patients. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol. 65, p. 844-850, 1997.

ROOB, C.L.; KHOSCHSORUR, G.; TIRAN, A.; et al.; Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. *J. Am.Soc. Nephrol.* Vol. 11, p. 539-549, 2000.

RUGGIERI, G.; SPINELLI, C.; D'ADAMO, G.; et al.; Nutritional status of CAPD patients in Lazio. *Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.* Vol. 15(3-4), p. 149-53, 1993.

SALONEN J.T.; YLA-HERTTUALA, S.; YAMAMOTO, R.; et al.; Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* Vol. 339 p. 883-886, 1992.

SANCHEZ-QUESADA, J.L.; PEREZ, A.; CAIXAS, A.; et al.; Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J Clin Endocrinol Metab* Vol.86, p.3243-3249, 2001.

SANCHEZ-QUESADA, J.L.; BENÍTEZ, S.; FRANCO, M.; et al.; Density distribution of electronegative LDL (LDL(-)) in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J Lipid Res.* Vol. 43, p.699-705, 2002.

SANCHEZ-QUESADA, J.L.; CAMACHO, M.; ANTON, R.; et al. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis*; Vol.166 p. 261-270, 2003.

SANCHEZ-QUESADA, J.L.; BENÍTEZ, S.; ORDONEZ-LLANOS, J.;Electronegative low-density lipoprotein *Current Opinion in Lipidology*; Vol.15 p.329-335, 2004.

SANCHEZ-QUESADA, J.L.; BERNÍTEZ, S.; PEREZ, A.; et al.; The inflammatory properties of electronegative low-density lipoprotein from type 1 diabetic patients are related to increased platelet-activating factor acetylhydrolase activity. *Diabetologia.* Vol. 48(10), p. 2162-9, 2005.

SASAKI, M.; Development of vitamin E-modified polysulfone membrane dialyzers. *J. Artif. Organs.* Vol. 99(1), p. 50-60, 2006.

SATOH, M.; YAMASAKI, Y.; NAGAKE, J.; et. al.; Oxidative stress is reduced by the long-term use of vitamin E-coated dialysis filters. *Kidney Int.* Vol. 59(5), p. 1943-50, 2001.

SEVANIAN, A.; HODIS, H.N.; HWANG, J.; et al. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. *J Lipid Res*; Vol.36 p.1971-1986, 1995.

SEVANIAN, A.; BITTOLO-BON, G.; CAZZOLATO, G., et al. Electronegative LDL is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J Lipid Res* Vol. 38 p.419–428, 1997.

SHOJI, T.; KIMOTO, E.; EMOTO, M.; The association of antibodies against oxidized low-density lipoprotein with atherosclerosis in hemodialysis patients. *Kidney Int. Suppl.* Vol. 84, p.128-30, 2003.

SNIDERMAN, A.D. Applying apoB to the diagnosis and therapy of the atherogenic dyslipoproteinemias: a clinical diagnostic algorithm. *Curr. Opin Lipidol.* Vol. 15(4), p. 433-8. 2004.

SNIVELY, C.S.; GUTIERREZ, C.; Chronic Kidney disease: prevention and treatment of common complications. *Am. Fam. Physician.* Vol.15;70(10), p. 1921-8, 2004.

SOMMERBURG; SOSTMANN, K.; GRUNE, T.; et al.; Oxidative stress in hemodialysis patients treated with a dialysis membrane which has alpha-tocopherol bonded to its surface.. *Biofactors* Vol. 10(2-3), p. 121-124, 1999.

SONOKI, K.; IWASE, M.; IINO, K.; et al. Atherogenic role of lysophosphatidylcholine in low-density lipoprotein modified by phospholipase A2 and in diabetic patients: protection by nitric oxide donor. *Metabolism*; Vol. 52 p.308–314., 2003.

STAFFORINI, D.M.; MCINTYRE, T.M.; ZIMMERMAN, G.A; et al. Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem*; Vol.272 p.17895–17898, 1997.

SURIYAPHOL, P.; FENSKE, D.; ZACHRINGER, U.; et al. Enzymatically modified nonoxidized low-density lipoprotein induces interleukin-8 in human endothelial cells: role of free fatty acids. *Circulation*; Vol.106 p.2581–2587, 2002.

SUZUKI, K., ITO, Y., OCHIAI, J., et al.; Relationship between obesity and serum markers of oxidative stress and inflammation in Japanese. *Asian Pac J Cancer Prev* Vol. 4, p.259–66, 2003.

TAI, M.H.; KUO, S.M.; LIANG, H.T.; et al.; Modulation of angiogenic processes in cultured endothelial cells by low density lipoproteins subfractions from patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* Vol. 86(2), p.448-57, 2006.

TERTOV, V.V.; SOBENIN, I.A.; OREKHOV, A.N.; et al.; Characteristics of low density lipoprotein isolated from circulating immune complexes. *Atherosclerosis* Vol. 122, p. 191-199, 1996.

TETTA, C.; SEGOLONI, G.; MARIANO, F.; et al.; Leukocyte-derived mediators and biocompatibility. *Nephrol Dial Transplant* Vol. 6(2), p. 24–30, 1991.

THIRD REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report. *Circulation*. Vol.106 p. 3143–3421, 2002.

THURNHAN, D.I.; SMITH, E.; FLORA, P.S.; Concurrent liquid-chromatographic assay of retinol, α -tocopherol, β -carotene, α -carotene, lycopene and β -cryptoxanthin. *Clin. Chem.*, Vol. 34, p. 337-343, 1988.

TINAHONE, F.J.; GOMEZ-ZUMAQUERO, J.M.; GARRIDO-SANCHEZ, L.; et al.; Influence of age and sex on levels of anti-oxidized LDL antibodies and anti-LDL immune complexes in the general population. *J Lipid Res*. Vol. 46(3), p. 452-7, 2005.

TSAO, C.S., SALIMI, S.L., Ultramicromethod for the measurement of ascorbic acid in plasma and white blood cells by high-performance liquid chromatography with electrochemical. *J. chromatogr.*, Vol. 224, p. 477, 1981.

TSIMI-HODIMOS, V.; KARABINA, S.A.; TAMBAKI, A.P.; et al. Altered distribution of platelet-activating factor-acetylhydrolase activity between LDL and HDL as a function of the severity of hypercholesterolemia. *J Lipid Res*; Vol. 43 p.256–263, 2002.

USBERTI, M.; GERARDI, G.M.; GAZZOTTI, R.M.; et. al.; Oxidative stress and cardiovascular disease in dialyzed patients. *Nepron*, Vol. 91(1), p. 25-33, 2002.

URSINI, F.; SEVANIAN, A.; Postprandial oxidative stress. *Biol Chem*;Vol. 383, (3–4) p.599–605, 2002.

URSINI, F.; DAVIES, K.J.; MAIORINO, M.; et al.; Atherosclerosis: another protein misfolding disease?. *Trends Mol Med*. Vol. 8(8), p.370-4, 2002.

URAKAWA, H., KATSUKI, A., SUMIDA, Y., et al.; Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab* Vol.88, p. 4673– 6, 2003.

UZUN, H., ZENGİN, K., TASKIN, M., et al.; Changes in leptin, plasminogen activator factor and oxidative stress in morbidly obese patients following open and laparoscopic Swedish adjustable gastric banding. *Obes Surg* Vol.14, p.659–65, 2004.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOLA, J.; et al.; Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. *Int J Biochem Cell Biol*. Vol. 39(1), p. 44-84, 2006.

VALTIN, H.; SCHAEFER, J.; *Renal Function*, 3^a ed. Boston:Little, Brown and Company, 1p. 1 –209, 1995.

VAN, T. L.; DE GRAAF, J.; HAK-LEMMERS, H.; et. al. Increased levels of low-density lipoprotein oxidation in patients with familial hypercholesterolemia and in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *Lab Invest.* Vol. 83(1), p.13-21, 2003.

VASANKARI, T., FOGELHOLM, M., KUKKONEN-HARJULA, K., et al.; Reduced oxidized low-density lipoprotein after weight reduction in obese premenopausal women. *Int J Obes Relat Metab Disord* Vol. 25, p.205, 2001.

VAZIRI, N., Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in Chronic kidney Disease and Hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* Vol.13, p.93-99, 2004.

VEDIE, B.; JEUNEMAITRE, X.; MEGNIEN, J.L.; et al.; Charge heterogeneity of LDL in asymptomatic hypercholesterolemic men is related to lipid parameters and variations in the ApoB and CIII genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Vol. 18(11), p. 1780-9, 1998.

YANG, C.Y.; RAYA, J.L.; CHEN, H.H.; et al. Isolation, characterization, and functional assessment of oxidatively modified subfractions of circulating low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; Vol. 23 p.1083–1090, 2003.

YANO, M.; INOUE, M.; MAEHATA, E.; et al.; Increased electronegative charge of serum low-density lipoprotein in patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta.* Vol. 340(1-2), p. 93-8, 2004.

YAO, Q.; AXELSSON, J.; HEIMBURGUER, O., STENVINKEL P, LINDHOLM B. Systemic inflammation in dialysis patients with end-stage renal disease: causes and consequences. *Minerva Urol Nephrol.* Vol. 56, p. 237-48, 2004.

YOUNG, L.S.; MCENENY, J.; Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, Vol. 29, p.358-362; 2001.

ZIMA, T.; JANEBOVA, M.; NEMECEK, K.; et al.; Retinol and alpha-tocopherol in hemodialysis patients. *Ren, Fail.* Vol. 20, p. 505-512, 1998.

ZIOUZENKOVA, O.; ASATRYAN, L.; SEVANIAN, A.; Oxidative stress resulting from hemolysis and formation of catalytically active hemoglobin protective strategies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* Vol. 37(3), p.125-32, 1999.

ZIOUNZENKOVA, O.; ASATRYAN, L.; AKMAL, M.; et al.; Oxidative Cross-linking of ApoB100 and Hemoglobin Results in Low Density Lipoprotein Modification in Blood, relevance to atherogenesis caused by Hemodialysis. *Am. Soci. Bio. Chem.*; Vol 274, N.27, p.18916-18924, 1999.

ZIOUNZENKOVA, O.; SEVANIAN, A.; Oxidative modification of low-density lipoprotein(LDL) in HD patients: role of electronegative LDL formation. *Blood Purif.* Vol. 8(3), p.169-76, 2000.

ZIOUNZENKOVA, O.; ASATRYAN, L.; TETTE, C.; et. al. Oxidative stress during Ex vivo Hemodialysis procedure utilizing antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 33, N.2, p.248-258, 2002.

ZIOUNZENKOVA, O.; ASATRYAN, L.; SAHADY, D.; et al. Dual roles for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activator receptor responses to electronegative low density lipoprotein. *J Biol Chem*; Vol. 278 p.39874–39881, 2003.

ZWOLINSKA, D.; GRZESZCZAK, W.; SZCZEPANSKA, M.; et al.; Vitamins A, E and C as non-enzymatic antioxidants and their relation to lipid peroxidation in children with chronic renal failure. *Nephron Clin Pract.* Vol. 103(1), p.12-8, 2006.

WANNER, C.; QUASCHNING, T.; Dyslipidemia and renal disease: pathogenesis and clinical consequences. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* Vol.10, p.195-201, 2001.

WEINBRENNER, T., SCHRÖDER, H., ESCURRIOL, V., et al.; Circulating oxidized LDL is associated with increased waist circumference independent of body mass index in men and women. *Clin Nutr* Vol. 83, p.30 –5, 2006.

WESTHUYZEN, J.; SALTISI, D.; HEALY, H. Oxidation of low density lipoprotein in hemodialysis patients: effect of dialysis and comparison with matched controls. *Atherosclerosis*, Vol. 21;129(2), p.199-205. 1997.

WIECZOROWSKA-TOBIS, K.; BREBOROWICZ, A.; WITOWSKI, J.; et. al.; Effect of vitamin E on peroxidation and permeability of the peritoneum. *J. Physiol. Pharmacol.* Vol. 47(3), p.535-43, 1996.

WOLFE, R.A.; ASHBY, V.B.; DAUGIRDAS, J.T.; AGODOA, L.Y.; JONES, C.A.; PORT, F.K.; Body size, dose of hemodialysis, and mortality. *Am J Kidney Dis*, Vol. 35, p. 80–8, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: WHO, p. 362-374, 1997.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 0166/2005

São Paulo, 13 de dezembro de 2005.

Ilmo(a). Sr(a).

Julie Calixto Lobo

Orientador: Prof. Dulcineia Saes Parra Abdalla
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 28 de novembro de 2005, **APROVOU** o projeto "Relação do estado nutricional com a peroxidação lipídica em pacientes renais crônicos sob tratamento conservador, hemodiálise e diálise peritoneal" (Protocolo CEP nº 324) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, com uma letra inicial 'V' muito grande e decorativa.

Prof.ª Dr.ª Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP