

Estrés Oxidativo y Disfunción Endotelial en la Enfermedad Renal Crónica

Valeria Costa-Hong¹, Luiz Aparecido Bortolotto¹, Vanda Jorgetti², Fernanda Consolim-Colombo¹, Eduardo M Krieger¹, Jose Jayme Galvão de Lima¹

Unidade de Hipertensão, Instituto do Coração (InCor)¹; Disciplina de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo², São Paulo, SP - Brasil

Resumen

Fundamento: La enfermedad renal crónica (ERC) se caracteriza por la alta prevalencia de aterosclerosis. Siendo el estrés oxidativo y la disfunción endotelial promotores de la aterosclerosis, es interesante verificar si las dos condiciones están asociadas en pacientes con ERC, aun sin enfermedad cardiovascular (ECV) clínica.

Objetivo: Evaluar las relaciones entre el estrés oxidativo y la función endotelial en pacientes con ERC estado 5, sin ECV.

Métodos: Se estudiaron 22 pacientes con ERC, no diabéticos, no fumadores, sin ECV y tratados por hemodiálisis; además de 22 individuos normales. En todos los individuos se evaluaron la reactividad vascular, dependiente e independiente de endotelio (ecografía de alta resolución de la arteria braquial), y el estrés oxidativo (niveles plasmáticos de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico – TBARS).

Resultados: La reactividad vascular dependiente de endotelio ($6,0 \pm 4,25\%$ vs. $11,3 \pm 4,46\%$, $p < 0,001$) y la reactividad independiente de endotelio ($11,9 \pm 7,68\%$ vs. $19,1 \pm 6,43\%$, $p < 0,001$) se redujeron en la ERC, mientras el estrés oxidativo ($2,63 \pm 0,51$ vs. $1,49 \pm 0,43$, $p < 0,001$) se vio aumentado. Los niveles de TBARS, cuando se utiliza en la totalidad de individuos del estudio (pacientes y controles), se correlacionaron con la reactividad vascular dependiente de endotelio ($r = -0,56$, $p < 0,001$) y con la presión arterial sistólica ($r = 0,48$, $p = 0,002$).

Conclusión: El estrés oxidativo está asociado a la disfunción endotelial. Pacientes con ERC presentan aumento del estrés oxidativo y compromiso de la reactividad vascular. Los resultados sugieren además que el estrés oxidativo y la disfunción endotelial pueden estar involucrados en la susceptibilidad exagerada de la ERC a las complicaciones cardiovasculares. (Arq Bras Cardiol 2009;92(5):398-403)

Palabras clave: Estrés oxidativo, aterosclerosis, falla renal crónica, insuficiencia renal, diálisis renal.

Introducción

El estrés oxidativo se define como un daño tisular causado por el desequilibrio entre los factores pro y antioxidantes. Éste está presente en una gran variedad de condiciones patológicas y se cree que funciona como agente patogenético en muchas de esas condiciones. Uno de los principales efectos del estrés oxidativo es la reducción de la actividad biológica del NO¹. Este efecto se expresa a través de la disfunción endotelial, que a su vez se considera un precursor de aterosclerosis².

La enfermedad renal crónica (ERC) se caracteriza por un estado de vasculopatía generalizada, acompañada por una elevada mortalidad cardiovascular, causada principalmente por la aterosclerosis³. Puesto que la disfunción endotelial está involucrada en la génesis de la aterosclerosis, y que el estrés oxidativo puede causar esta disfunción, es interesante verificar

si las dos condiciones están asociadas en pacientes con ERC, aun sin enfermedad cardiovascular (ECV) clínica. Este enfoque puede permitir la identificación precoz de los pacientes con mayor riesgo de sufrir complicaciones futuras.

El objetivo de esta investigación fue evaluar las posibles relaciones entre el estrés oxidativo y la disfunción endotelial en un grupo de pacientes con ERC avanzada (estado 5), libres de ECV clínicamente evidente.

Métodos

Los participantes (pacientes y controles) firmaron el término de consentimiento informado y la investigación fue aprobada por la Comisión de Ética de la institución. Los pacientes se seleccionaron en el Ambulatorio de Osteodistrofia Renal del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo (HC-FMUSP) y encaminados al Instituto del Corazón (InCor) para evaluación cardiovascular.

Se estudiaron 22 pacientes con ERC, tratados por hemodiálisis, de ambos sexos y con fístula arteriovenosa para acceso vascular para diálisis sólo en uno de los miembros superiores. Los criterios

Correspondencia: Luiz Aparecido Bortolotto •

Unidade de Hipertensão, Instituto do Coração (InCor) - Rua Enéas Carvalho Aguiar, 44, 05.403-000, São Paulo, SP - Brasil
E-mail: luiz.bortolotto@incor.usp.br, luizab@cardiol.br
Artículo recibido el 16/07/08; revisado recibido el 27/08/08; aceptado el 04/09/08.

de exclusión fueron los siguientes: diabetes; cáncer; enfermedad cardiovascular clínicamente evidente; tabaquismo; enfermedad hepática o de tiroides; uso de anticonceptivo o drogas para tratamiento de dislipidemia; antecedentes de infarto de miocardio; accidente vascular cerebral; revascularización miocárdica o vascular periférica; trasplante renal y paratiroidectomía.

Evaluación clínica y de laboratorio

Todos los pacientes se sometieron a una evaluación cardiovascular y de laboratorio amplia que incluyó radiografía de tórax, ecocardiograma bidimensional y electrocardiograma en reposo. La enfermedad arterial coronaria fue investigada y excluida, en todos los casos, por centellograma miocárdico con estrés farmacológico con dipiridamol. El colesterol (total y fracciones), triglicéridos, albúmina, hematocrito y creatinina se determinaron por métodos convencionales.

El estrés oxidativo se evaluó en el plasma por determinación, a través de método colorimétrico, de los productos de la peroxidación de lípidos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). La determinación de las TBARS se realizó en el Laboratorio de Investigación Básica en Enfermedad Renal (LIM 12, Disciplina de Nefrología, Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo). La acción de las especies reactivas de oxígeno sobre los lípidos lleva a la producción de varias sustancias, que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y pueden dosificarse por espectrofotometría. Las muestras de plasma se trataron con ácido tricloroacético antes de la adición de ácido tiobarbitúrico al 0,6%. La densidad óptica del sobrenadante se determinó por espectrofotometría y entonces se calculó la concentración de los productos de peroxidación lipídica. Los niveles de TBARS se expresaron en nanomoles/ml⁴.

La Tabla 1 presenta los principales datos clínicos y de laboratorio de los pacientes.

Hemodiálisis

Los pacientes venían siendo tratados por hemodiálisis por períodos que variaban de 17 a 148 meses (mediana de 67 meses) a través de fístula arteriovenosa, tres veces por semana, durante 4 horas.

Medicación

El tratamiento se basó en la reducción de la ingesta de alimentos ricos en fósforo y en la prescripción de calcitriol y sevelamer, además de suplementos de calcio. Del total, el 44% de los pacientes estaban haciendo uso de quelantes de fósforo a base de calcio, el 42% utilizaban sevelamer, el 27% tomaban calcitriol y el 7% usaban desferal. La medicación antihipertensiva se basó en el uso de los inhibidores del sistema renina-angiotensina, betabloqueadores e inhibidores de canales de calcio, aisladamente o combinados en, respectivamente, 48%, 44% y 48% de los pacientes. Toda medicación, inclusive la hipotensora, se suspendió cuatro días antes de los tests.

Evaluación de la función endotelial

Los tests se realizaron en el período de la mañana, después de ayuno de ocho horas, con el individuo en

Tabla 1 – Características clínicas, de laboratorio, demográficas y valores de la evaluación de la reactividad vascular y de la anatomía y función de las grandes arterias de los pacientes y controles.

Variable	Pacientes	Controles	p
Número	22	22	
Edad (años)	42,8 ± 12	40 ± 10,3	0,15
Sexo masculino n (%)	12 (55)	12 (55)	0,33
Caucásicos n (%)	10 (45)	13 (59)	0,52
Afro brasileños n (%)	12 (55)	9 (31)	0,45
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	24 ± 4,0	24,7 ± 3,5	0,79
Presión sistólica (mmHg)	152 ± 33	118 ± 12	0,001
Presión diastólica (mmHg)	91 ± 17	77 ± 1	0,002
Vasodilatación mediada por el flujo (%)	6,00 ± 4,25	11,30 ± 4,46	< 0,001
Vasodilatación endotelio independiente (%)	11,9 ± 7,68	19,10 ± 6,43	0,001
TBARS* (nmoles/mL)	2,63 ± 0,51	1,49 ± 0,43	< 0,001
Creatinina (mg/100mL)	10,3 ± 3,7	-	-
Albúmina (g/100mL)	4,3 ± 0,3	-	-
Colesterol (mg/100mL)	177,7 ± 58	-	-
Triglicéridos (mg/100mL)	138 ± 82	-	-
Hematocrito (%)	34 ± 4	-	-

* Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.

reposo, posicionado en decúbito horizontal, en un ambiente calmo, con monitoreo electrocardiográfico y de la presión arterial. La vasodilatación mediada por flujo (VMF, dependiente del endotelio) y la respuesta del músculo liso vascular al vasodilatador nitroglicerina (independiente del endotelio) se evaluaron de forma secuencial en la arteria braquial, en el miembro contralateral al de la fístula arteriovenosa utilizada en la diálisis. Los tests se realizaron de acuerdo con las directivas de la *International Brachial Artery Reactivity Task Force* (versión 2002)⁵. El acceso a la arteria braquial que se realizó encima del doblez del codo. Enseguida, se verificó el diámetro de la arteria por aparato de ecografía (*Sequoia Echocardiography System, version 6.0, Acuson, Siemens, Ca, USA*), equipado con un transductor lineal de alta resolución (7-12 MHz) y acoplado a una computadora específicamente programada para grabar y analizar este tipo de dato. Entonces se seleccionaron para análisis, seis imágenes para cada fase del test coincidiendo con la onda R del electrocardiograma. Los datos se obtuvieron en condiciones basales, después de la inducción de la hiperemia reactiva y después de la administración, por aerosol oral, de 0,45 mg de nitroglicerina (*Natrispray; Procter & Gamble Pharmaceuticals, France*). El grado de vasodilatación obtenido se expresó como porcentaje en relación a los valores basales.

Se recolectaron las muestras de sangre y se realizaron todos los exámenes dentro de las 20 a 30 horas siguientes a una sesión de diálisis, en un día entre dos sesiones consecutivas de diálisis.

Controles

El grupo de control estaba compuesto por 22 individuos normales, que no usaban ninguna medicación y no eran tabaquistas. Los controles se sometieron a la evaluación de la reactividad vascular en la arteria braquial y del estrés oxidativo, cumpliendo con los mismos protocolos utilizados en los pacientes.

Estadística

Los resultados se expresan como: promedio \pm desviación estándar del promedio, mediana y porcentajes. El valor de $p < 0.05$ se consideró significativo. Las variables fueron comparadas por los tests t de Student, ji-cuadrado y análisis de covarianza (ANCOVA), cuando era apropiado. Las correlaciones se verificaron por análisis de correlación de Pearson. Inicialmente, las siguientes variables se evaluaron en el modelo univariante: edad; sexo; raza; duración de la diálisis; índice de masa corporal; presiones arteriales, sistólica y diastólica; hematocrito y niveles de TBARS; albúmina; colesterol total y triglicéridos. Las variables seleccionadas por el modelo univariante se probaron entonces en el modelo multivariante (regresión logística) para verificar los factores independientemente asociados con las alteraciones en la función y estructura vascular. Todos los cálculos se realizaron en un programa estadístico SPSS, versión 10.0.

Resultados

La Tabla 1 muestra las principales características demográficas y clínicas y los valores de reactividad vascular de los pacientes y controles. Edad, sexo, raza e índice de masa corporal eran semejantes en los dos grupos. Por otro lado, las presiones arteriales sistólica y diastólica eran más elevadas en los pacientes.

Reactividad vascular

Tanto la VMF, dependiente de endotelio ($6,0 \% \pm 4,3$ vs. $11,3 \% \pm 4,5$ %; $p < 0,001$), como la vasodilatación independiente de endotelio ($11,9 \% \pm 7,7$ vs. $19,1 \% \pm 6,4$ %; $p < 0,001$) fueron reducidas en comparación con los valores observados en los controles (Tabla 1 y Figura 1). En los pacientes, los valores obtenidos fueron cerca de un 50% menores que los observados en los controles.

El estrés oxidativo, determinado por la concentración plasmática de las TBARS, fue significativamente más elevado en los pacientes que en los controles ($2,63 \pm 0,51$ vs. $1,49 \pm 0,43$, $p < 0,001$, Tabla 1 y Figura 2).

En el análisis univariante (Tabla 2), verificamos que la edad ($r = -0,365$, $p = 0,04$) fue el único predictor de la disfunción endotelial en los pacientes. La relación observada fue inversa, es decir, la vasodilatación mediada por flujo era reducida en proporción a la edad. Los niveles de TBARS, así como todas las demás variables ensayadas, no se correlacionaron con la VMF. Ya la vasodilatación independiente de endotelio, evaluada por la respuesta al vasodilatador de acción directa, se correlacionó únicamente con la VMF ($r = 0,483$, $p < 0,01$). Este resultado sugiere que la reducción observada en la VMF se debió, primariamente, a la disfunción endotelial, y

no sólo a la incapacidad del músculo vascular de responder a vasodilatadores.

Factores como sexo, raza, duración de la diálisis, índice de masa corporal, presiones arteriales sistólica y diastólica, hematocrito y niveles de TBARS, albúmina, colesterol total y triglicéridos no se correlacionaron con la vasodilatación dependiente e independiente de endotelio en los pacientes. Por otro lado, haciendo uso de la totalidad de los individuos del estudio (pacientes y controles) observamos, en el análisis univariante (Tabla 3), que el estrés oxidativo se correlacionó negativamente con la vasodilatación mediada por flujo ($p < 0,001$) y con la vasodilatación independiente de endotelio ($p = 0,004$). Hubo también correlaciones positivas con las presiones sistólica y diastólica. Sin embargo, en el análisis multivariante (Tabla 4, Figura 3), sólo la vasodilatación mediada por flujo ($p = 0,001$) y la presión arterial sistólica ($p = 0,001$) permanecieron en el modelo.

Discusión

El resultado más interesante de este trabajo fue la observación de la relación inversa entre el estrés oxidativo y la vasodilatación mediada por flujo dependiente de endotelio. Esta correlación, sin embargo, no se observó cuando analizamos conjuntamente los pacientes y los controles. En los pacientes, no detectamos correlaciones significativas entre el estrés oxidativo y la reactividad vascular, a pesar del estrés oxidativo ser más elevado en los pacientes que en los controles. Interpretamos este resultado negativo como una consecuencia de la poca variabilidad de los valores individuales del TBARS en torno al valor promedio. Ello puede significar que, en pacientes con ERC avanzada, el estrés oxidativo alcanza niveles máximos y que otros factores pasan a desempeñar un papel preponderante en la disfunción endotelial, aunque no sea excluida necesariamente la participación del estrés oxidativo⁶. Finalmente, la ausencia de correlación entre el estrés oxidativo y la vasodilatación

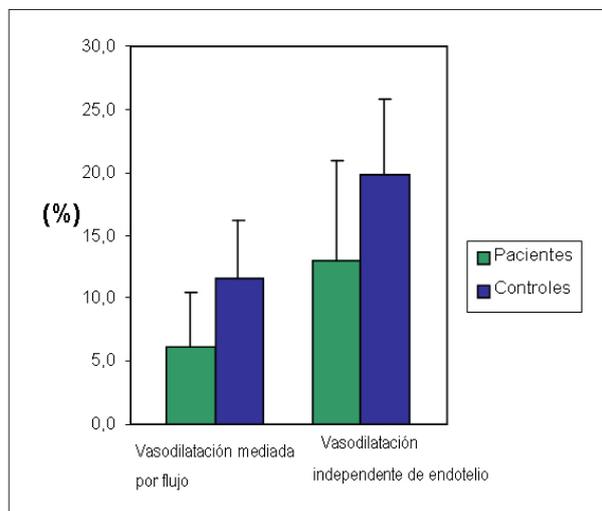


Figura 1 - Vasodilatación mediada por flujo y vasodilatación independiente de endotelio en pacientes con ERC (n= 22) y controles (n= 22). Diferencias entre los grupos $p < 0,001$.

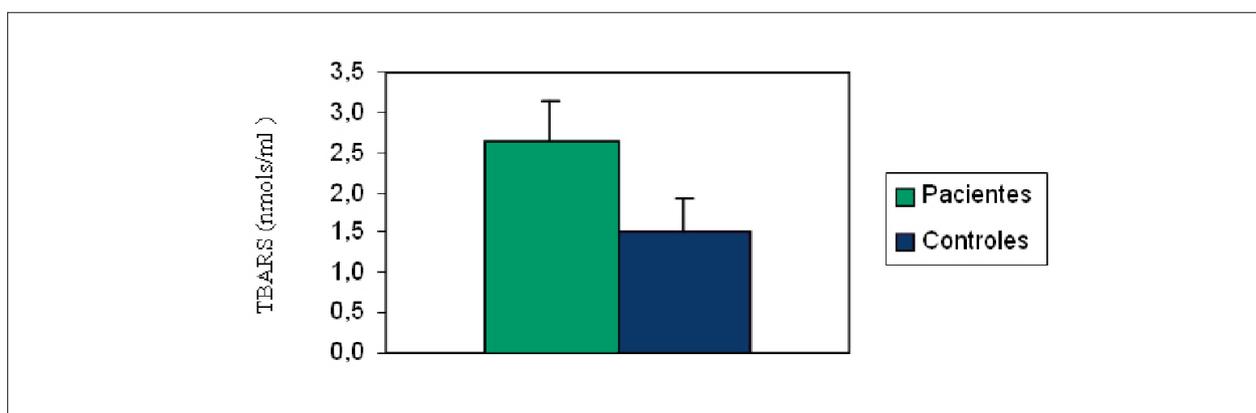


Fig. 2 - Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico en Pacientes con ERC (n=22) y Controles (n= 22). Diferencia entre los grupos < 0,001.

Tabla 2 – Correlación entre variables clínicas y de laboratorio, y vasodilatación mediada por flujo y vasodilatación independiente de endotelio en los pacientes

Variable	Vasodilatación Medida por Flujo		Vasodilatación independiente de endotelio	
	r	p	r	p
Edad (años)	- 0,365	0,04	- 0,61	0,75
Sexo masculino	- 0,155	0,404	- 0,252	0,17
Duración de la diálisis (meses)	- 0,189	0,32	- 0,154	0,41
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	- 0,250	0,18	- 0,009	0,96
Presión arterial sistólica (mmHg)	- 0,242	0,19	- 0,148	0,42
Presión arterial diastólica (mmHg)	- 0,166	0,37	- 0,166	0,37
TBARS* (nmols/mL)	- 0,140	0,54	- 0,015	0,95
Albúmina (g/100mL)	- 0,126	0,515	- 0,022	0,91
Colesterol total (mg/100mL)	0,027	0,885	0,020	0,91
Triglicéridos (mg/100mL)	0,046	0,805	0,304	0,10
Hematocrito (%)	- 0,50	0,793	- 0,058	0,76

* Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.

independiente de endotelio, en el análisis multivariante, está de acuerdo con la hipótesis de que la reducción de la reactividad vascular en los individuos estudiados (pacientes y controles) se debió, primariamente, a la disfunción endotelial con la participación del estrés oxidativo⁷⁻⁹.

Otros factores también deben recordarse como posibles responsables por la reducción de la reactividad vascular en nuestros pacientes. La dimetilarginina asimétrica (ADMA), cuyos niveles son elevados en la ERC, interfiere con la generación de NO por inhibición competitiva con la enzima NO-sintasa^{8,10}. Una inflamación crónica, con elevación de factores como la proteína C reactiva y varias citocinas, también ocurre en la ERC e interfiere con la función endotelial^{11,12}. No obstante, no tenemos datos para verificar la participación de estos factores en la presente investigación.

La disfunción endotelial es actualmente considerada un marcador precoz de aterosclerosis y de enfermedad cardiovascular en general¹³⁻¹⁵. En nuestro trabajo mostramos que la vasodilatación mediada por flujo está comprometida

Tabla 3 – Correlaciones entre especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) con datos clínicos y variables vasculares de pacientes y controles analizados en conjunto (n = 44)

Variable	TBARS	
	r	p
Vasodilatación mediada por el flujo (%)	- 0,56	< 0,001
Vasodilatación endotelio independiente (%)	- 0,44	0,004
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	0,35	0,84
Edad (años)	0,05	0,74
Presión arterial sistólica (mmHg)	0,48	0,002
Presión arterial diastólica (mmHg)	0,44	0,004

en pacientes con ERC sin enfermedad aterosclerótica sistémica o coronaria. Los datos permiten especular que esta alteración puede ser, en parte, causada por el estrés oxidativo,

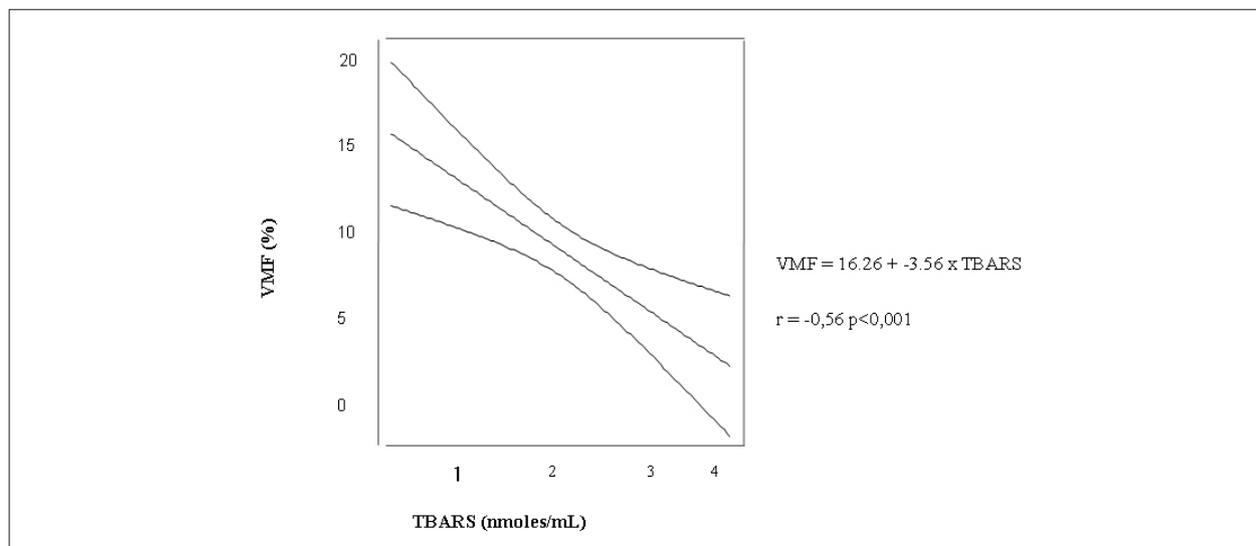


Figura 3 - Relación de la VMF y TBARS

Tabla 4 – Variables asociadas a la concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el conjunto de pacientes y controles (n= 44) (regresión logística)

	Ji-cuadrado	F	p
Vasodilatación mediada por el flujo (%)	5,12	11,8	0,001
Presión arterial sistólica (mmHg)	6,85	8,6	0,001

tal como ya fue demostrado en la población general¹². Si éste es el caso, maniobras destinadas a reducir o controlar el estrés oxidativo podrían influir en el pronóstico de estos pacientes, especialmente aquellos todavía libres de lesiones arteroscleróticas significativas.

Este trabajo tiene algunas limitaciones. El número de pacientes es relativamente pequeño, utilizamos sólo un marcador de estrés oxidativo y no evaluamos otros factores potencialmente involucrados en la disfunción endotelial. No obstante, la principal virtud del trabajo reside en el hecho de no haber estudiado una población homogénea de no diabéticos donde la enfermedad cardiovascular fue investigada en profundidad. Por este motivo, podemos afirmar, con seguridad razonable, que las alteraciones observadas fueron

debidas, primariamente, a ERC, y no a comorbilidades.

En resumen, el trabajo confirma la existencia de compromiso de la reactividad vascular en pacientes con ERC y sugiere que este fenómeno es causado por la uremia, y no por otras condiciones asociadas. El compromiso de la reactividad vascular, aunque involucre la vasodilatación dependiente e independiente de endotelio, parece ser debido, primariamente, a la disfunción endotelial, y el estrés oxidativo está probablemente involucrado en este proceso.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiamiento

El presente estudio no tuvo fuentes de financiamiento externas.

Vínculo Académico

Este artículo es parte de la tesis de Doctorado de Valéria Aparecida da Costa Hong de la Universidad de São Paulo - Instituto del Corazón.

Referencias

1. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42: 1149-60.
2. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 168-75.
3. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004; 351: 1296-305.
4. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-8.
5. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 257-65.

6. London GM, Pannier B, Agharazii M, Guerin AP, Verbeke FH, Marchais SJ. Forearm reactive hyperemia and mortality in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2004; 65: 700-4.
7. Ghiadoni L, Cupisti A, Huang Y, Mattei P, Cardinal H, Favilla S, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in chronic renal failure. *J Nephrol.* 2004; 17: 512-9.
8. Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K, Cakir E, Sonmez A, Ozgurtas T, et al. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. *Am J Kidney Dis.* 2006; 47: 42-50.
9. Siems W, Quast S, Carluccio F, Wiswedel I, Hirsch D, Augustin W, et al. Oxidative stress in chronic renal failure as a cardiovascular risk factor. *Clin Nephrol.* 2002; 58 (Suppl 1): S12-9.
10. Kocak H, Gumuslu S, Ermis C, Mahsereci E, Sahin E, Gocmen AY, et al. Oxidative stress and asymmetric dimethylarginine is independently associated with carotid intima media thickness in peritoneal dialysis patients. *Am J Nephrol.* 2008; 28: 91-6.
11. Annuk M, Soveri I, Zilmer M, Lind L, Hulthe J, Fellstrom B. Endothelial function, CRP and oxidative stress in chronic kidney disease. *J Nephrol.* 2005; 18: 721-6.
12. Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellstrom B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 2747-52.
13. Patel AR, Kuvin JT, Sliney KA, Rand WM, Chiang JC, Udelson JE, et al. Gender-based differences in brachial artery flow-mediated vasodilation as an indicator of significant coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2005; 96: 1223-6.
14. Perrone-Filardi P, Cuocolo A, Brevetti G, Silvestro A, Storto G, Dellegrottaglie S, et al. Relation of brachial artery flow-mediated vasodilation to significant coronary artery disease in patients with peripheral arterial disease. *Am J Cardiol.* 2005; 96: 1337-41.
15. Kamycheva E, Sundsfjord J, Jorde R. Serum parathyroid hormone levels predict coronary heart disease: the Tromso Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2004; 11: 69-74.