



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara



Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Avaliação de biomarcadores séricos do estresse oxidativo e do
potencial antioxidante em pacientes renais crônicos
submetidos ao tratamento hemodialítico**

Marcel Benedete Marques

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera
Coorientadora: Profa. Dra. Renata Pires de Assis

**Araraquara - SP
2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara



Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Avaliação de biomarcadores séricos do estresse oxidativo e do
potencial antioxidante em pacientes renais crônicos
submetidos ao tratamento hemodialítico**

Marcel Benedete Marques

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera
Coorientadora: Profa. Dra. Renata Pires de Assis

**Araraquara - SP
2019**

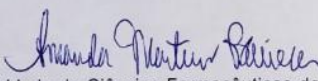
-
- M357a** Marques, Marcel Benedete.
Avaliação de biomarcadores séricos do estresse oxidativo e do potencial antioxidante em pacientes renais crônicos submetidos ao tratamento hemodialítico / Marcel Benedete Marques. – Araraquara: [S.n.], 2019.
118 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.
- Orientadora: Amanda Martins Baviera.
Coorientadora: Renata Pires de Assis.
1. Doença renal crônica. 2. Hemodiálise. 3. Estresse oxidativo. 4. Potencial antioxidante. I. Baviera, Amanda Martins, orient. II. Assis, Renata Pires de, coorient. III. Título.

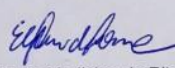
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

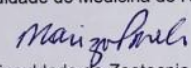
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SÉRICOS DO ESTRESSE OXIDATIVO E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO HEMODIALÍTICO"

AUTOR: MARCEL BENEDETE MARQUES
ORIENTADORA: AMANDA MARTINS BAVIERA
COORIENTADORA: RENATA PIRES DE ASSIS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. AMANDA MARTINS BAVIERA 
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara - UNESP

Profa. Dra. ELEN ALMEIDA ROMÃO 
Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP

Profa. Dra. MARIZA PIRES DE MELO 
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga da Universidade de São Paulo

Araraquara, 03 de dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar por ter me proporcionado esse curso de mestrado e dado paz, alegria, força e ânimo que me acompanharam durante todo este tempo.

Aos meus pais, Marcelo e Márcia, pelo apoio emocional, financeiro e o incentivo a continuar estudando e aprimorando ainda mais meus conhecimentos. Agradeço também à minha irmã Micaelli.

À professora Dra. Amanda Martins Baviera pela sua total dedicação e atenção especial que teve neste projeto. Pelo seu conhecimento e esclarecimento das minhas dúvidas que me ajudaram a progredir no mestrado e pela sua confiança em mim na realização desta pesquisa.

Ao professor Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti pela sua contribuição tanto prática quanto teórica que ajudaram a padronizar as metodologias descritas neste projeto.

À Dra. Renata Pires de Assis e Tayra Ferreira Oliveira de Lima pela ajuda com as suas ideias na padronização dos ensaios analíticos e pela paciência em me ensinar a parte prática e a interpretação destes resultados.

À minha colega Maíra Guaratti do Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas do Departamento de Análises Clínicas pela sua amizade, pelo seu apoio e sua companhia em todas as fases deste projeto.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas do Departamento de Análises Clínicas, Ingrid Delbone Figueiredo, Mariana de Campos da Costa, Maiara Destro Inácio e Anderson Kiyoshi Kaga pela amizade.

À Flávia Pavarina e o Diego Mason do Laboratório de Bioquímica da Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia / Núcleo de Atendimento à Comunidade - CACH/NAC pelo apoio nas análises laboratoriais e pela amizade.

Ao Centro Regional de Hemodiálise de Araraquara, DaVita Inc. Kidney Care (Tratamento Renal), e ao médico nefrologista José Luiz Saheb, por aceitar a realização desta pesquisa com os pacientes da clínica.

Aos pacientes que aceitaram a participar desta pesquisa, sendo que sem eles, este trabalho não aconteceria.

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
fundação do Ministério da Educação (MEC), pela bolsa de mestrado.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
pelo apoio financeiro.*

*À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo
apoio financeiro.*

*Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas, UNESP de Araraquara pelo seu excelente atendimento.*

*À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) do campus de Araraquara.*

RESUMO

No Brasil, o número de indivíduos com doença renal crônica (DRC) em terapia dialítica no ano de 2017 foi de aproximadamente 127 mil indivíduos; dentre estes, 92% realizavam hemodiálise (HD). A HD tem como principal objetivo a remoção dos solutos urêmicos e assim a redução dos sintomas relacionados à síndrome urêmica, melhorando a qualidade de vida do indivíduo com DRC. No entanto, aumentam as evidências de que a HD seja um fator exacerbante do estresse oxidativo, via aumento na produção de espécies reativas de oxigênio devido à ativação de leucócitos estimulada pela diálise ou pelo tipo de membrana utilizada, bem como via remoção dialítica de compostos antioxidantes solúveis em água e de baixo peso molecular. No entanto, a literatura reporta resultados contraditórios em relação às alterações em biomarcadores de lesão oxidativa e atividade antioxidante em indivíduos submetidos à HD. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações na capacidade antioxidante total, nas atividades de enzimas antioxidantes e nos níveis de biomarcadores de danos oxidativos no soro de indivíduos saudáveis e de indivíduos com DRC, antes (pré-HD) e após (pós-HD) uma sessão de HD. Foram selecionados 40 indivíduos saudáveis, sem DRC ou qualquer outra patologia, doadores de sangue do Hemonúcleo Regional de Araraquara para compor o grupo controle, e 40 indivíduos com DRC que realizam HD no Centro Regional de Hemodiálise de Araraquara. Amostras de soro foram utilizadas para determinação dos marcadores bioquímicos, biomarcadores de lipoperoxidação (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS) e de danos oxidativos em proteínas (proteínas carboniladas, PCO), estimativa de produtos finais de glicação avançada (AGEs, *advanced glycation end products*) incluindo pentosidina, atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e paraoxonase 1 (PON 1) e a capacidade antioxidante total. Observamos um aumento significativo nos níveis séricos de creatinina e ureia (13,8 e 4,5 vezes, respectivamente) de indivíduos na condição pré-HD em relação aos indivíduos do grupo controle. Também foram observados aumentos nos níveis de ácido úrico, potássio e glicose em soro de indivíduos pré-HD em relação aos indivíduos controle. Após uma sessão de HD, houve diminuição nos níveis séricos de creatinina (65%), ureia (70%), ácido úrico (72%), potássio (27%) e de glicose (40%), em comparação aos valores em soro de

indivíduos pré-HD. Os níveis de proteínas totais, albumina, colesterol total, colesterol-HDL e colesterol-LDL encontram-se diminuídos no soro de indivíduos pré-HD, no entanto, ainda dentro dos valores de referência; ao final da HD foi observado um discreto aumento nestes biomarcadores. Indivíduos com DRC, antes e após a sessão de HD, apresentam níveis de colesterol-VLDL acima dos valores de referência. Foram observados aumentos nos níveis séricos de TBARS (65%), PCO (51%), AGEs fluorescentes (8,9 vezes) e pentosidina (22,5 vezes) em indivíduos na condição pré-HD, em comparação aos valores em soro de indivíduos do grupo controle, sugerindo a presença de um quadro de estresse oxidativo. Uma sessão de HD reduziu os níveis séricos de TBARS, AGEs e pentosidina, em 28%, 31% e 64%, respectivamente. As atividades das enzimas antioxidantes CAT, GSH-Px e PON 1 encontram-se diminuídas no soro de indivíduos com DRC, antes e após a sessão de HD, em comparação com o grupo controle. É interessante salientar que, mesmo sendo observado um quadro de estresse oxidativo em indivíduos com DRC, há também um aumento na capacidade antioxidante total no soro de indivíduos com DRC na condição pré-HD, em comparação aos indivíduos do grupo controle. Considerando que este aumento na capacidade antioxidante foi revertido após a sessão de HD, podemos sugerir que tal aumento na condição pré-HD seja devido ao acúmulo de moléculas antioxidantes no soro como uma consequência da insuficiência renal, incluindo o ácido úrico. O estabelecimento de estresse oxidativo em indivíduos com DRC pode ter relação com diversos fatores, tais como o acúmulo de solutos urêmicos, presença de doenças relacionadas (diabetes mellitus, hipertensão), presença de inflamação crônica e diminuição nas defesas antioxidantes. De acordo com nossos resultados, uma sessão de HD não foi capaz de exacerbar o estresse oxidativo em indivíduos com DRC, pelo contrário, podemos sugerir que a HD contribui tanto para a remoção de solutos urêmicos como também para diminuir os níveis de biomarcadores de dano oxidativo nestes indivíduos.

Palavras-chave: Doença renal crônica. Hemodiálise. Estresse oxidativo. Potencial antioxidante.

ABSTRACT

In Brazil, the number of individuals with chronic kidney disease (CKD) under dialysis in 2017 was approximately 127,000 individuals; among these, 92% underwent hemodialysis (HD). HD has as main objective the removal of uremic solutes and thus the reduction of the symptoms related to the uremic syndrome, therefore improving the quality of life of individuals with CKD. However, there is increasing evidence that HD is an exacerbating factor of oxidative stress, due to an increase in the production of reactive oxygen species due to the activation of leukocytes stimulated by the dialysis or due to the type of membrane used, as well as via dialytic removal of antioxidant compounds, water-soluble and with low molecular weight. However, literature reports contradictory results regarding the changes in biomarkers of oxidative damage and antioxidant activity in individuals submitted to HD. The objective of this study was to evaluate the changes in the total antioxidant capacity, activities of antioxidant enzymes, and the levels of biomarkers of oxidative damage in serum of healthy individuals and patients with CKD, before (pre-HD) and after (post-HD) one HD session. Forty healthy individuals without clinical history of CKD or any other pathology were selected from the Hemonúcleo Regional de Araraquara, SP to compose the control group; and 40 patients with CKD undergoing HD were selected from the Centro Regional de Hemodiálise. Serum samples were used for the analysis of biochemical markers, biomarkers of lipid peroxidation (TBARS, thiobarbituric acid reactive substances) and protein oxidative damage (PCO, protein carbonyls), estimation of fluorescent advanced glycation end products (AGEs), activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and paraoxonase 1 (PON 1) and the total antioxidant capacity. It was observed a significant increase in the serum levels of creatinine and urea (13.8 and 4.5 times, respectively) of individuals in the pre-HD condition in comparison to individuals of control group. Increases in serum levels of uric acid, potassium, and glucose were also observed in pre-HD individuals, when compared to controls. After one HD session, serum levels of creatinine (65%), urea (70%), uric acid (72%), potassium (27%), and glucose (40%) were decreased, when compared to serum levels of pre-HD subjects. The levels of total protein, albumin, cholesterol, HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol were decreased in the serum of pre-HD subjects;

however, they are still within the reference values; a slight increase was observed in these biomarkers at the end of the HD. Individuals with CKD, before and after one HD session, presented the VLDL-cholesterol levels above the reference values. Increases in serum levels of TBARS (64%), PCO (51%), fluorescent AGEs (8,9-fold), and pentosidine (22,5-fold) were found in individuals in the pre-HD condition, in comparison to serum values of these biomarkers in controls, suggesting the development of oxidative stress. One HD session reduced the serum levels of TBARS, AGEs, and pentosidine, by 28%, 31%, and 64%, respectively. The activities of the antioxidant enzymes CAT, GSH-Px, and PON 1 were decreased in serum of individuals with CKD, before and after the HD session, when compared to the control group. It is interesting to emphasize that, even CKD patients having changes associated to a condition of oxidative stress, the total antioxidant capacity was increased in serum of CKD patients in pre-HD condition, in comparison to controls. Considering that this increase in antioxidant capacity was reversed after the HD section, it can be suggested that such increase in the pre-HD condition was due to the accumulation of antioxidant molecules in serum as a consequence of the kidney failure, including uric acid. The establishment of oxidative stress in individuals with CKD may be related to several factors, such as the accumulation of uremic solutes, the presence of related diseases (diabetes mellitus, hypertension), the presence of chronic inflammation, and a decrease in the antioxidant defenses. According to our results, one HD session was not sufficient to exacerbate the oxidative stress in individuals with CKD, on the contrary, we can suggest that HD contributes to the removal of uremic solutes and also to decrease the levels of biomarkers of oxidative damage in these individuals.

Key words: Chronic renal disease. Hemodialysis. Oxidative stress. Antioxidant potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas para a estimativa da TFG	21
Figura 2. Reação entre o TBA e o MDA, formando o composto colorido monitorado fluorimetricamente em comprimentos de onda de excitação de 510 nm e de emissão de 553 nm.....	39
Figura 3. Reação entre o grupo carbonil da proteína e o DNPH, formando DNP	40
Figura 4. Hidrólise do paraoxon com liberação de <i>p</i> -nitrofenol e dietil fosfato, catalisada pela PON 1.....	42
Figura 5. Atividade peroxidativa da CAT	43
Figura 6. Conversão de glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG) por ação da glutathiona peroxidase (GSH-Px), com conversão de hidroperóxido em água. Redução de GSSG em GSH por ação da glutathiona redutase (GSH-Rd) com oxidação de NADPH	44
Figura 7. Estrutura química da crocina	45
Figura 8. Reações envolvidas no ensaio de clareamento da crocina. A, representa um antioxidante.....	46
Figura 9. Oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), formando o $ABTS^{+}$ e sua reação com um antioxidante. AOH representa um antioxidante.....	48
Figura 10. Redução do DTNB por grupamentos sulfidrilas, formando TNB	49
Figura 11. Níveis séricos de creatinina (A), ureia (B) e ácido úrico (C) em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD	51
Figura 12. Níveis séricos de potássio em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.....	53
Figura 13. Níveis séricos de glicose em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.....	55
Figura 14. Níveis séricos de proteína total (A) e de albumina (B) em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD	56
Figura 15. Níveis séricos de triglicerídeos (A), colesterol total (B), colesterol-HDL (C), colesterol-LDL (D) e colesterol-VLDL (E) em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD	58
Figura 16. Níveis séricos de TBARS ($\mu\text{mol/L}$) em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD	59

Figura 17. Níveis estimados de AGEs fluorescentes (A) e pentosidina (B) no soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD	60
Figura 18. Níveis de proteínas carboniladas (nmol/mg de proteína) no soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD	61
Figura 19. Atividades da enzima CAT em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ (A) e $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína (B) e da GSH-Px em $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$ (C) e $\text{nmol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína (D) no soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD	63
Figura 20. Atividade da PON 1 em U/L (A) e mU/mg de proteína (B) no soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD	64
Figura 21. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina, com ácido úrico (A), ácido ascórbico (B), trolox (C), albumina humana (D) e tirosina (E).....	66
Figura 22. Ensaio de clareamento da crocina com diferentes volumes de soro, de indivíduo do grupo controle (A) e de indivíduo com DRC, pré-HD (B) e pós-HD (C)	68
Figura 23. Curvas representativas construídas com intervalo de valores das razões de velocidades (v_0/v) e a tangente média de cada grupo, obtendo assim as respectivas frações de volumes de soro. Os valores das frações de volumes de soro utilizados foram divididos pela fração de volume da crocina para obter um parâmetro substituto para o A/C. Indivíduos do grupo controle (A), e de indivíduos com DRC, antes (B) e após (C) a sessão de HD	70
Figura 24. Inibição (captura) do radical cátion ABTS^{*+} pela tirosina (A), trolox (B), ácido úrico (C), ácido ascórbico (D), albumina humana (E) e cisteína (F)	72
Figura 25. Representação de inibição (captura) do cátion radical ABTS^{*+} com diferentes diluições do soro de um indivíduo	74
Figura 26. Representação do “ EV_{50} ” (A), equivalentes de trolox ($\mu\text{M}/\mu\text{L}$ de amostra) (B), equivalentes de ácido úrico ($\mu\text{M}/\mu\text{L}$ de amostra) (C) e equivalentes de albumina humana ($\mu\text{M}/\mu\text{L}$ de amostra) (D) no ensaio de captura do ABTS^{*+} das amostras de soro dos indivíduos do grupo controle e dos indivíduos com DRC, antes e após a sessão de HD	75
Figura 27. Níveis de tióis totais em $\mu\text{mol}/\text{L}$ (A) e $\mu\text{mol}/\text{g}$ de proteína (B) no soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da DRC.....	22
Tabela 2. Características das principais lipoproteínas plasmáticas humanas.	25
Tabela 3. Níveis séricos de creatinina, ureia e ácido úrico em homens e mulheres do grupo controle e indivíduos com DRC, antes e após a HD.	52
Tabela 4. Níveis séricos de glicose em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC, sem e com diabetes mellitus, antes e após a HD.	55
Tabela 5. Comparação entre o EC_{50} (μM) e a inclinação da regressão linear do ácido úrico, ácido ascórbico, trolox, albumina humana e tirosina	67
Tabela 6. Valores médios de “ EV_{50} ” em volume (μL) de soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD	69
Tabela 7. Capacidade de captura do radical cátion $ABTS^{*+}$ expresso em concentração efetiva EC_{50} (μM)	73
Tabela 8. Equivalentes de trolox, ácido úrico e albumina humana no ensaio de captura do $ABTS^{*+}$ das amostras de soro dos indivíduos do grupo controle e dos indivíduos com DRC, antes e após a sessão de HD	76

LISTA DE ABREVIATURAS

DRC	Doença renal crônica
HD	Hemodiálise
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
TFG	Taxa de filtração glomerular
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
DRET	Doença renal em estágio terminal
DP	Diálise peritoneal
ERO	Espécies reativas de oxigênio
C-G	<i>Cockcroft-Gault</i>
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease – Epidemiology Collaboration</i>
NH ₃	Amônia
DCV	Doenças cardiovasculares
Q _m	Quilomicron
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
O ₂ • ⁻	Ânion superóxido
HO•	Radical hidroxil
ROO•	Radical peroxil
RO•	Radical alcoxil
H ₂ O ₂	Péroxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
ONOO ⁻	Peroxinitrito
L•	Radical lipídico
LOO•	Radical lipídico peroxil
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MDA	Malondialdeído
4-HNE	4-hidroxinonenal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
PCO	Proteínas carboniladas
AGE	<i>Advanced glycation end products</i>
RAGE	Receptors of advanced glycation end products
sRAGE	<i>Soluble receptor of advanced glycation end products</i>
Glo 1	Glioxalase 1
Glo 2	Glioxalase 2
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GPx ou GSH-Px	Glutational peroxidase
GSH	Glutational reduzida
PON 1	Paraoxonase 1
ATP	Adenosina trifosfato

NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
NO	Óxido nítrico
FAV	Fístula arteriovenosa
LPMN	Leucócitos polimorfonucleares
LPS	Lipopolissacarídeo
ADMA	Dimetil-arginina assimétrica
CAAE	Certificado de apresentação de apreciação ética
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Pré-HD	Pré hemodiálise
Pós-HD	Pós hemodiálise
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
TCA	Ácido tricloroacético
Purpald	4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazol
GSSG	Glutationa oxidada
GSH-Rd	Glutationa redutase
AAPH	Dicloridrato de 2,2'-azobis- (2metilpropanoamidina)
DTNB	5,5 ditiobis-2-nitrobenzóico
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-fulfonato)
DM	Diabetes mellitus
U/L	Unidades por litro
UA	Unidades arbitrárias
mU	miliUnidades
EC ₅₀	Concentração efetiva
TEAC	<i>Trolox equivalente antioxidante capacity</i>
EPM	Erro padrão da média

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Doença renal crônica	20
2.2 Estresse oxidativo	26
2.3 Estresse oxidativo na DRC	31
2.4 Estresse oxidativo na HD.....	32
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	37
4.1 Indivíduos e grupo de estudo	37
4.2 Critérios de exclusão	37
4.3 Aspectos éticos	37
4.4 Coleta e preparo das amostras	38
4.5 Biomarcadores bioquímicos	38
4.6 Avaliação da peroxidação lipídica	39
4.7 Estimativa dos produtos finais de glicação avançada	40
4.8 Quantificação de grupos carbonilas em proteínas	40
4.9 Atividade de paraoxonase 1 (PON 1)	42
4.10 Atividade de catalase (CAT)	42
4.11 Atividade de glutathione peroxidase (GSH-Px)	44
4.12 Ensaio de clareamento (<i>bleaching</i>) da crocina	44
4.13 Capacidade de captura do cátion radical ABTS ^{•+}	47
4.14 Determinação da concentração de grupos tióis totais	48
4.15 Análise dos resultados	49

5	RESULTADOS	50
5.1	Biomarcadores bioquímicos	50
5.2	Biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo	59
5.2.1	Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	59
5.2.2	Níveis estimados de produtos finais de glicação avançada	59
5.2.3	Níveis de proteínas carboniladas	61
5.3	Atividades das enzimas antioxidantes	62
5.4	Ensaio de clareamento (<i>bleaching</i>) da crocina	65
5.5	Ensaio de captura do radical cátion ABTS ^{•+}	71
5.6	Determinação da concentração de grupos tióis totais.....	77
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÕES FINAIS	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) tem recebido especial atenção tanto da comunidade científica quanto dos órgãos de saúde pública, visto que sua incidência e prevalência têm crescido tanto em países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Em março de 2019, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention - CDC*) dos Estados Unidos estimou que 15% da população adulta dos Estados Unidos (o que equivale a 37 milhões de pessoas) teriam DRC, com variados graus de severidade. O censo realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia em 2017 mostrou que o número de pacientes com DCR em diálise no Brasil neste mesmo ano foi de aproximadamente 127 mil indivíduos. Os dados sobre a atual situação de pacientes dialíticos apontam que, do total de pacientes, 92% estavam em hemodiálise e 7% em diálise peritoneal (THOMÉ et al., 2019).

A DRC é definida como um dano renal (estrutural ou funcional) e/ou uma taxa de filtração glomerular (TFG) abaixo de 60 mL/min/1,73m² que persiste por 3 meses ou mais. O grupo do *The Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) classifica a DRC em 5 estágios (de 1 a 5) baseado na TFG, sendo o estágio 5 denominado de doença renal em estágio terminal (DRET), quando a TFG é menor que 15 mL/min/1,73 m² com breve necessidade de uma terapia renal substitutiva, entre diálise peritoneal (DP), hemodiálise (HD) ou transplante renal (ROMAGNANI et al., 2017; GILBERT et al., 2018).

Dentre as terapias renais substitutivas, a HD é a principal utilizada, na maioria dos países, contribuindo para aumentar a sobrevida dos indivíduos com DRC (BARBOSA et al., 2017). O sistema de HD transfere o sangue do indivíduo ao dialisador e permite a remoção de toxinas urêmicas e o excesso de fluidos, e retorna o sangue depurado ao indivíduo (SAM, 2014). Assim, a HD tem como objetivo a eliminação dos sintomas relacionados à síndrome urêmica (azotemia), embora seja difícil a erradicação completa dos distúrbios associados ao acúmulo de solutos específicos em determinados tecidos em condições de síndrome urêmica, mesmo com sessões de HD regulares (MEYER; HOSTETTER, 2007). No entanto, é evidente que a manutenção da HD, além de diminuir os sintomas da síndrome urêmica, também melhora o status nutricional, reduz os distúrbios metabólicos, melhorando a qualidade de vida do indivíduo com DRC.

Outro aspecto importante relacionado à HD é o fato de que este processo tem sido considerado um fator exacerbante do estresse oxidativo em indivíduos com DRC (WRATTEN et al., 2002). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção excessiva de moléculas oxidantes e a diminuição dos sistemas de defesa antioxidantes (LIAKOPOULOS et al., 2017).

Nos primeiros estágios da DRC já é possível observar um aumento no estresse oxidativo, e este intensifica gradualmente conforme a progressão da doença, e parece ser acentuado pela HD (LIAKOPOULOS et al., 2017). Diversas complicações manifestadas nos indivíduos com DRC têm sido associadas ao aumento do estresse oxidativo, tais como: anemia, desnutrição, disfunção endotelial, riscos cardiovasculares e progressão da doença renal para estágio terminal (DAENEN et al., 2019; LIAKOPOULOS et al., 2017).

Dentre os fatores envolvidos no aumento do estresse oxidativo pela HD destacam-se: *i)* a bioincompatibilidade das membranas dialíticas com o sangue, provocando ativação de leucócitos polimorfonucleares, plaquetas e do sistema complemento, com subsequente produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, *ii)* a perda de vitaminas e outras moléculas antioxidantes durante o processo de hemodiálise (LIAKOPOULOS et al., 2017; LING; KUO, 2018).

Neste contexto, torna-se importante a investigação de biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo e potencial antioxidante no soro dos indivíduos com DRC em tratamento hemodialítico, antes e após uma sessão de HD.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doença renal crônica

Uma das principais funções dos rins é realizar a filtração de produtos finais do metabolismo celular, removendo-os do sangue, e assim promover sua eliminação pela urina. Condições relacionadas à perda da função renal implicam em remoção incompleta ou insuficiente destes produtos, que assim permanecem no organismo (BOVEE, 1986). A perda da função renal pode estar relacionada a algum evento agudo, como por exemplo, situações de falência ou injúria renal aguda, muitas vezes resultantes de isquemia, presença de toxinas ou traumas físicos. No entanto, a grande maioria dos casos de falência renal ocorre de forma gradual e progressiva, culminando no surgimento de diversas condições que levam à DRC (PRUNOTTO et al., 2012). Michishita e colaboradores (2016) observaram que um estilo de vida inadequado, com hábitos que incluem tabagismo, ingestão de dietas hipercalóricas culminando em obesidade, ingestão de álcool, falta de exercícios físicos e/ou má alimentação, todos estes fatores têm íntima associação com a elevada prevalência de DRC. Dentre as principais condições patológicas que levam à DRC, o diabetes mellitus e a hipertensão arterial são responsáveis por cerca de dois terços dos casos da doença. Glomerulonefrites, doenças hereditárias como a doença renal policística, malformações no feto durante a gestação, lúpus, condições obstrutivas (litíase renal, tumores) e infecções urinárias de repetição são condições também associadas ao desenvolvimento de DRC (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2017).

A progressão da DRC é entendida como a perda progressiva da função renal, avaliada pela TFG, que corresponde a taxa média de filtração de todos os néfrons funcionantes, e mensurada através de um biomarcador de filtração glomerular. Tem-se como valor ideal de TFG, no homem adulto, um intervalo de referência de 90 a 120 mL/min/1,73m² de superfície corporal (SILVA; BRUNE, 2011).

A TFG é muito utilizada para avaliar a função renal, diagnosticar e classificar a DRC. Para tanto, a dosagem de creatinina sérica é o biomarcador mais comumente realizado na prática clínica, sendo sua análise realizada em qualquer laboratório clínico com precisão e custo adequados. A creatinina tem produção constante durante o dia, é livremente filtrada pelos glomérulos e não é reabsorvida pelos túbulos renais. No entanto há algumas limitações quanto ao uso da creatinina sérica como marcador da

TFG: i) sua concentração pode variar de acordo com a massa muscular do indivíduo; ii) 15% da creatinina encontrada na urina ocorre via secreção pelos túbulos renais; iii) varia conforme a idade e iv) raça (KIRSZTAJN, 2007; BASTOS; KIRSZTAJN, 2011).

Para corrigir algumas das limitações encontradas na dosagem de creatinina sérica, foram propostas diversas fórmulas para estimar a TFG. As equações desenvolvidas para predizer a TGF são: *Cockcroft-Gault* (C-G), *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) e atualmente a equação do *Chronic Kidney Disease – Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) tem sido recomendada pelo KDIGO, pois categoriza com mais precisão o risco de mortalidade e progressão para DRET (Figura 1).

Figura 1. Fórmulas para a estimativa da TFG.

Equação de Cockcroft-Gault $Ccr(e) = 140 - \text{idade (anos)} \times \text{Peso (quilogramas)} / 72 \times Scr \text{ (x0,85 se mulher)}$
Equação do estudo MDRD $TFG(e) = 186 \times (Scr)^{-1,154} \times (Idade)^{-0,208} \times (0,742 \text{ se mulher}) \times (1,210 \text{ se negro})$
Equação CKD-EPI $TFG(e) = 141 \times [\min(Scr/k, 1)]^\alpha \times \max(Scr/k, 1)^{-1,209} \times \text{idade}^{-0,993} \times 1,018 \text{ (se mulher)} \times (1,157 \text{ se negro})$
α é 0,329 para mulher e 0,411 para homens; min= mínimo de Scr/k ou 1

Fonte: BASTOS, 2008.

De acordo com a organização KDIGO, a DRC é dividida em cinco estágios funcionais, definidos pela estimativa da TFG, sendo o estágio 3 subdividido em a e b, e também de acordo com 3 níveis de albuminúria (A1, A2 e A3), avaliada de acordo com a relação albumina-creatinina urinaria (mg/g ou mg/mmol em uma amostra matinal isolada de urina) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da DRC.

Estágios da DRC	TFG*	Albuminúria**		
		A1 (<30)	A2 (30-300)	A3 (>300)
1	≥ 90	-	+	++
2	60-89	-	+	++
3a	45-59	+	++	+++
3b	30-44	++	+++	+++
4	15-29	+++	+++	+++
5	< 15	+++	+++	+++

* mL/min/1,73m²

** mg/g de creatinina. Risco para DRC: (-): baixo risco (se ausência de outros marcadores de doença renal, não há DRC); (+): risco moderadamente aumentado; (++): alto risco; (+++): risco muito alto.

Fonte: KDIGO, 2012.

No estágio 1 da DRC, embora a TFG seja mantida dentro dos valores de normalidade, destacam-se os indivíduos em condições de risco, isto é, com predisposição ao desenvolvimento de alguma perda na função renal devido às comorbidades anteriormente relatadas, em especial a hipertensão arterial sistêmica não controlada e o diabetes mellitus. Já no estágio 2 da DRC, observa-se o início da perda da funcionalidade dos rins, mesmo que alguns biomarcadores da função renal ainda estejam dentro dos valores de referência; diferentemente do estágio 3, em que a avaliação laboratorial apresenta discreta alteração. Nos últimos estágios da DRC, é possível observar modificações nos padrões laboratoriais, assim como presença de sintomatologia, tais como anemia, fraqueza, mal-estar geral, agravamento da hipertensão arterial, dentre outros. Cabe ressaltar que no estágio 5, também conhecido como doença renal em estágio terminal, o indivíduo com DRC pode ou não ser submetido à terapia de substituição renal, sendo este tratamento necessário quando a TFG for menor que 15 mL/min/1,73m² (ROMÃO, 2004).

Diminuição da TFG pode ser uma consequência da diminuição no número de néfrons e/ou de uma redução da TFG em cada néfron, em consequência de alterações

fisiológicas ou hemodinâmicas. Outro fator envolvido no declínio da TFG é o processo de envelhecimento; após os 40 anos de idade a taxa média de redução na TFG é de aproximadamente 0,75 mL/min/ano, sendo que este declínio é mais rápido em indivíduos hipertensos (JOHNSON; FEEHALLY; FLOEGE, 2016; GUIMARÃES et al., 2007).

Com a diminuição da TFG, o *clearance* renal de muitos solutos reduz, e assim seus níveis se elevam no sangue, tais como creatinina, ureia, ácido úrico, entre outros (MAIR; SIRICH; MEYER, 2018).

Creatinina sérica: a creatinina é um metabólito nitrogenado derivado da desidratação espontânea da creatina ou da fosfocreatina no tecido muscular. A creatina pode ser sintetizada endogenamente pelo fígado, rins e pâncreas a partir de alguns aminoácidos, incluindo glicina e arginina. Outra via importante para a obtenção de creatina é pela absorção intestinal devido o consumo de carnes vermelhas e peixes (GUALANO et al., 2008). A creatinina é livremente filtrada pelos glomérulos renais, não é reabsorvida, no entanto 15% é secretada pelos túbulos renais. A concentração plasmática da creatinina não é dependente apenas da função renal, mas também da dieta e da massa muscular (PORTO et al., 2017).

Ureia: a ureia é o produto final do catabolismo proteico, é sintetizada no fígado a partir da amônia via reações que acontecem no citoplasma e mitocôndria de células hepáticas. Grande parte da amônia é proveniente do catabolismo de aminoácidos, derivados das proteínas da dieta (NELSON; COX, 2014). A ureia é um soluto permeável que apresenta baixo peso molecular, 60 daltons (VANHOLDER; GRYP; GLORIEUX, 2018). O aumento na concentração sérica da ureia pode ser consequência de: ingestão elevada de proteína, uso de certos medicamentos, como corticosteroides, e da redução na excreção de ureia devido a prejuízos na função renal. A ureia é livremente filtrada pelos glomérulos renais, porém é reabsorvida passivamente nos túbulos proximais e distais dos néfrons (BASTOS, 2008; WEINER; MITCH; SANDS, 2015).

A diminuição na concentração sérica de ureia após a sessão de HD é mensurada pelo Kt/V , que leva em consideração a depuração de ureia do dialisador (K), multiplicada pelo tempo de tratamento (t) e dividido pelo volume de distribuição de ureia do paciente (V) (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2006). O Kt/V é um

dado importante para avaliar a eficiência e adequação do tratamento hemodialítico. Para este cálculo, a fórmula de Daugirdas é frequentemente utilizada na prática clínica, pois é a fórmula que apresenta maior concordância com demais fórmulas indicadas para avaliação da HD, além de incluir informações individualizadas do paciente, tais como altura, peso, fluxo de sangue (BREITSAMETER; FIGUEIREDO; KOCHHANN, 2012).

Ácido úrico: o ácido úrico é o produto final do catabolismo de purinas (adenina e guanina). Várias enzimas estão envolvidas na degradação de purinas em ácido úrico. O ácido úrico encontra-se principalmente na forma de urato, o sal de ácido úrico, em pH fisiológico de 7,4 enquanto que na urina predomina a forma não ionizada do ácido úrico (PASALIC; MARINKOVIC; TURKOVIC, 2012).

A excreção de ácido úrico ocorre pelos rins, principalmente pela filtração glomerular, no entanto, uma quantidade é reabsorvida e também secretada no túbulo proximal. Apenas 10% do ácido úrico filtrado aparece na urina. A hiperuricemia é o resultado do aumento na produção de ácido úrico (10 a 15%) e/ou da redução da excreção de ácido úrico (85 a 90%). Seus níveis elevados podem ser citados como um fator de risco para o desenvolvimento de gota, disfunção renal, hipertensão, hiperlipidemia, diabetes mellitus e obesidade, bem como acúmulo de cristais de urato nas articulações e nos rins (MAIUOLO et al., 2016; PINHEIRO, 2008). No entanto, altos níveis de ácido úrico têm sido citados como benéficos na presença do estresse oxidativo; através de oxidação não enzimática, o ácido úrico é oxidado à alantoína e outros metabólitos, desta forma o ácido úrico pode neutralizar moléculas pró-oxidantes, tais como radicais hidroxil, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito (KUSHIYAMA et al., 2016).

A toxicidade relacionada ao acúmulo de solutos urêmicos em indivíduos com DRC é conhecida como síndrome urêmica, e é caracterizada por uma série de distúrbios sistêmicos que se relacionam a sintomas gastrointestinais (HAMMER et al., 1998), neurológicos (REESE; APPEL, 1981) e cardiológicos (FOLEY; PARFREY, 1998). Além dos distúrbios relacionados ao acúmulo de solutos urêmicos, um dos maiores problemas observados em indivíduos com DRC é o risco aumentado de desenvolvimento de eventos cardiovasculares, em especial infarto do miocárdio,

arritmias ou morte súbita, além da progressão para a falência renal total e permanente (SMALL et al., 2012).

A principal causa de mortalidade nos indivíduos com DRC são as doenças cardiovasculares (DCV). Logo, é de extrema importância a investigação e o controle precoce dos fatores de risco para DCV nos indivíduos com DRC, com o intuito de diminuir a mortalidade e morbidade via triagem e tratamento adequados. Um dos principais mecanismos fisiopatológicos na DRC que culminam em DCV é a formação de placas ateroscleróticas devido a hiperlipidemia, toxinas urêmicas, estresse oxidativo e disfunção endotelial (BULBUL et al., 2018).

A hiperlipidemia é um desequilíbrio nos níveis de lipoproteínas circulantes no sangue (KARR, 2017). As lipoproteínas são macromoléculas compostas de lipídeos e proteínas (Tabela 2). São classificadas de acordo com sua densidade, tamanho e composição lipídica e proteica: quilomícron (QM), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL, *very low density lipoprotein*), lipoproteína de baixa densidade (LDL, *low density lipoprotein*) e lipoproteína de alta densidade (HDL, *high density lipoprotein*) (FORTI; DIAMENT, 2006).

Tabela 2. Características das principais lipoproteínas plasmáticas humanas.

Lipoproteína	Densidade (g/mL)	Composição (% do peso)			
		Proteínas	Fosfolipídeos	Colesterol	Triacilgliceróis
QM	< 1,006	2	9	1	85
VLDL	0,95-1,006	10	18	7	50
LDL	1,006-1,063	23	20	8	10
HDL	1,063-1,210	55	24	2	4

Fonte: NELSON; COX, 2014.

Cada lipoproteína tem uma função específica de acordo com o seu local de síntese, composição lipídica e conteúdo proteico. Uma das funções das lipoproteínas é realizar o transporte de colesterol e triacilgliceróis do fígado ou intestino para os músculos e tecidos adiposos, através de QM, VLDL e LDL. Outra função das lipoproteínas é a remoção do excesso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos e destina-

los para o fígado, para serem eliminados pela bile, ação esta mediada pela HDL (BULBUL et al., 2018).

A dislipidemia é uma complicação comumente encontrada em indivíduos com DRC, sendo geralmente caracterizada por hipertrigliceridemia devido ao aumento nos níveis circulantes de VLDL e quilomícrons (MIKOLASEVIC et al., 2017). A DRC também pode levar a uma desregulação da lipoproteína lipase, reduzindo o catabolismo de triacilgliceróis e assim elevando seus níveis no sangue (TANNOCK, 2018). Deficiência na enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) também se encontra associada à dislipidemia, pois ocorre impedimento da maturação de HDL com consequente redução em seus níveis plasmáticos (BULBUL et al., 2018).

Além de exercer o transporte reverso do colesterol, a HDL também apresenta características antioxidantes e anti-inflamatórias importantes, devido a associação de enzimas antioxidantes na estrutura da HDL, incluindo a paraoxonase (PON 1) e a glutathione peroxidase (GSH-Px). Estas enzimas podem prevenir a oxidação de LDL e assim podem atenuar a formação de placas ateroscleróticas resultante de processos oxidativos (MIKOLASEVIC et al., 2017; BULBUL et al., 2018).

2.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como prejuízos e/ou disfunções moleculares e celulares como consequência do desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e a capacidade antioxidante (HALLIWELL, 2007). Na maioria dos casos, o estabelecimento de estresse oxidativo tem relação com o aumento na produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN). Dentre as ERO, destacam-se as espécies radicalares, em especial ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), radical peroxil ($ROO^{\bullet}$) e radical alcoxil ($RO^{\bullet}$), e as espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$). Já o peroxinitrito ($ONOO^-$) pode ser citado como a principal ERN (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Um dos processos oxidativos de reconhecida importância no estresse oxidativo é a lipoperoxidação; a peroxidação de lipídeos em membranas celulares causa perda de permeabilidade, fluidez e elasticidade, prejuízos no funcionamento celular e ruptura da célula. Esses danos celulares, que frequentemente estão aumentados nos indivíduos com

DRC, predisõem às comorbidades, tais como dislipidemias, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e também neoplasias (FRANÇA et al., 2013).

Os lipídeos e as lipoproteínas podem ser modificados pelo estresse oxidativo quando radicais livres, como por exemplo $\cdot\text{OH}$, reagem com ácidos graxos poli-insaturados, resultando em um radical lipídico ($\text{L}\cdot$). Este reage com o oxigênio e forma o radical lipídico peroxil ($\text{LOO}\cdot$), que por sua vez retira hidrogênio de um outro lipídeo, resultando novamente em um $\text{L}\cdot$ e um hidroperóxido lipídico (LOOH). A degradação do LOOH fornece novos radicais lipídicos ($\text{L}\cdot$ e $\text{LOO}\cdot$) e alguns produtos secundários do processo de lipoperoxidação, tais como malondialdeído (MDA), propanal, hexanal e 4-hidroxinonenal (4-HNE). O MDA pode ser citado como o produto de lipoperoxidação mais mutagênico, enquanto que o 4-HNE é o mais tóxico (FLORENS et al., 2016; AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

O MDA é um produto da peroxidação lipídica, derivado da decomposição de hidroperóxidos lipídicos formados após a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados com mais de uma dupla ligação, tais como os ácidos linoleico, araquidônico e docosahexanóico; estes ácidos graxos encontram-se presentes nos fosfolipídeos das bicamadas lipídicas de membranas celulares; estes fosfolipídeos também estão presentes nas lipoproteínas do plasma sanguíneo. Atualmente, o MDA é considerado um dos principais biomarcadores de dano oxidativo em plasma sanguíneo, avaliado pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A determinação dos níveis de MDA tem sido utilizada para estimar a magnitude da peroxidação lipídica associada à DRC (TUCKER et al., 2013; MODARESI; NAFAR; SAHRAEI, 2015). Boaz e colaboradores (1999) observaram que indivíduos submetidos à HD com história documentada de doença cardiovascular apresentavam níveis circulantes de MDA significativamente maiores em comparação aos indivíduos em HD sem este histórico estabelecido, sugerindo ser o estresse oxidativo um fator que pode acelerar a doença cardiovascular nesta população.

Já a oxidação de proteínas pelas ERO dá origem às proteínas carboniladas (PCO), um importante biomarcador de dano oxidativo em proteínas sob condições de estresse oxidativo (SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010). A oxidação de determinados resíduos de aminoácidos em proteínas, tais como lisina, arginina, prolina e treonina, gera derivados carbonílicos (WENG et al., 2017). Acúmulo de proteínas modificadas devido ao estresse carbonílico tem sido observado em condições de uremia

(MIYATA et al., 2001). As modificações em suas estruturas levam a diversas alterações, com destaque para a fragmentação de ligações peptídicas ou a formação de ligações cruzadas entre cadeias polipeptídicas distintas, em última instância ambas levam à perda da função da biomolécula (CAIMI et al., 2013).

A oxidação de ácidos nucleicos, em especial o ácido desoxirribonucleico (DNA), tem como consequência a instalação de defeitos genéticos. Todas estas alterações oxidativas em biomoléculas participam da etiologia da perda progressiva da função renal na DRC bem como suas complicações (RAJU; LALITHA; KIRANMAYI, 2013; SUNG et al., 2013).

Além do potencial lesivo direto das ERO, o estresse oxidativo também contribui para a formação de produtos conhecidos como AGEs (do inglês *advanced glycation end products* ou produtos finais de glicação avançada). A produção de AGEs ocorre principalmente após processos de glicação não-enzimática de açúcares redutores com proteínas, lipídeos ou DNA, em especial em situações de hiperglicemia. No entanto, aumento nos níveis de AGEs também são observados mesmo em situações de normoglicemia; condições associadas ao aumento nos níveis de ERO também parecem aumentar os AGEs, tal como a DRC (STINGHEN et al., 2016).

Diminuição da excreção renal de AGEs pode culminar em acúmulo de AGEs no soro e tecidos. O acúmulo de AGEs (advindos de glicação, glicoxidação, lipoxidação ou produção de compostos carbonílicos) é observado tanto em indivíduos com DM quanto em indivíduos urêmicos (OLENIUC et al., 2011). Fatores associados com o aumento de AGEs plasmáticos em pacientes com DRC sem DM se devem ao aumento do estresse oxidativo, bem como diminuição da excreção renal de AGEs ou seus precursores (glioxal, metilglioxal) em razão da redução na TFG, com subsequente acúmulo de AGEs. Assim, os AGEs podem exercer seus efeitos deletérios via ligação com seus receptores RAGE, interferindo nas respostas celulares e exacerbando a geração de ERO, a inflamação e a disfunção endotelial (OLENIUC et al., 2011).

Níveis elevados de AGEs contribuem com situações de disfunção endotelial, aumentando a prevalência de eventos cardiovasculares e a progressão da aterosclerose em indivíduos com DRC (LINDEN et al., 2008; MALLIPATTU; URIBARRI, 2014). O acúmulo de AGEs nos rins também pode participar do processo de diminuição da excreção renal, via aumento na rigidez do tecido vascular, contribuindo assim para a

progressão da DRC mesmo em indivíduos com nefropatia não diabética (ASSIRI; KAMEL; ALREFAI, 2018).

Uma vez que os AGEs são tão prejudiciais, o organismo possui sistemas capazes de atenuar seus efeitos. O sistema da glioxalase é constituído por duas enzimas, a glioxalase 1 (Glo 1) e a glioxalase 2 (Glo 2), as quais participam da eliminação de precursores dos AGEs (STINGHEN et al., 2016), em especial dicarbonilas reativas. A Glo 1 utiliza a glutatona reduzida para converter metilglioxal e glioxal em S-D-lactoilglutathione. Este produto é convertido em D-lactato (menos tóxico) por ação da Glo 2 (RABBANI; THORNALLEY, 2018). Outra estratégia para minimizar os efeitos de AGEs seria sua ligação aos receptores do tipo AGE-R1, estes se ligam aos AGEs (proteínas modificadas por AGEs) e promovem diminuição de seus níveis intra e extracelulares pois estimulam sua degradação proteolítica (STINGHEN et al., 2016). Em várias doenças, há uma diminuição nos níveis de receptores AGE-R e um aumento na expressão de receptores RAGE, e estes últimos, ao interagirem com AGEs, culminam em respostas intracelulares com subsequente aumento nos níveis de pró-oxidantes (STINGHEN et al., 2016).

Além dos AGEs se ligarem em seus receptores do tipo RAGE na superfície das células, novos estudos relatam a ligação de AGEs com receptores RAGE na forma solúvel (sRAGE), estes presentes no sistema circulatório a partir de processamento pós-traducional de RAGE de membrana ou gerados via *splicing* alternativo de RNAm de RAGE. Evidências recentes indicam que elevados níveis circulantes de AGEs e sRAGE têm relação com risco aumentado para desenvolvimento de aterosclerose e doença arterial coronariana, sendo sRAGE sugerido como um biomarcador preditivo de doença cardiovascular em indivíduos em HD (ASSIRI; KAMEL; ALREFAI, 2018). Os AGEs também promovem aumento na oxidação e na glicação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), contribuindo para o risco de desenvolvimento de aterosclerose em indivíduos com insuficiência renal (BUCALA et al., 1994). Uma sessão de HD é capaz de diminuir os níveis circulantes de AGEs em até 20%; esta porcentagem pode aumentar de acordo com a frequência e a duração da sessão (STINGHEN et al., 2016).

Para combater os efeitos deletérios de ERO ou ERN, existem os sistemas de defesa antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos. As defesas antioxidantes enzimáticas são representadas principalmente pelas enzimas: **superóxido dismutase**

(SOD) que catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet}$ em H_2O_2 e O_2 . Três isoformas da SOD (SOD1, SOD2 e SOD3) são encontradas nos rins, presentes tanto nas mitocôndrias quanto no citoplasma; a isoforma SOD1 tem atividade de até 80% nas células renais; **catalase** (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 em O_2 e H_2O . A CAT possui elevada expressão nos rins e desempenha um papel importante na prevenção de peroxidação lipídica; **glutathione peroxidase** (GPx ou GSH-Px) atua sobre peróxidos e utiliza o potencial redutor do tripeptídeo **glutathione reduzida** (GSH). Além da GSH, outros antioxidantes não enzimáticos que merecem destaque são: **vitamina E** (tocoferol), que confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação; **carotenoides**, pigmentos lipossolúveis com capacidade de capturar ERO; **vitamina C** (ascorbato), um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as ERO, no entanto também pode funcionar como pró-oxidante quando em doses elevadas ou na presença de metais, levando à lipoperoxidação; **ácido úrico**, um dos solutos urêmicos, produto final do metabolismo das purinas, apresenta atividade antioxidante significativa e sua concentração no plasma é maior que a de outros antioxidantes, como as vitaminas C e E. (DAVIES, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; RATLIFF et al., 2016). Aumento nos níveis de alguns antioxidantes, tais como CAT e GSH-Px, encontra-se associado com maior eficiência no combate aos efeitos deletérios de H_2O_2 em células epiteliais tubulares renais (GOLIGORSKY et al., 1993). Um desequilíbrio nos sistemas antioxidantes, particularmente CAT e GSH-Px, resulta em acúmulo de H_2O_2 , aumentando as chances desta espécie reagir com metais de transição, culminando na formação de outras espécies de oxigênio altamente reativas e que produzem efeitos nocivos às células (RATLIFF et al., 2016).

A paraoxonase 1 (PON 1) é uma enzima dependente de cálcio, presente no plasma de várias espécies de mamíferos. Foi descoberta pela sua capacidade de detoxificar compostos organofosforados, incluindo o paraoxon (metabólito tóxico do parathion, muito utilizado em inseticidas agrícolas) (SHUNMOOGAM; NAIDOO; CHILTON, 2018). A PON 1 é sintetizada no fígado e está presente na corrente sanguínea associada com a HDL. A paraoxonase (PON) apresenta 3 isoformas: PON 1, PON 2 e PON 3. As isoformas PON 1 e PON 3 estão associadas com a HDL, enquanto PON 2 não é encontrada no plasma e tem ocorrência intracelular (MACKNESS;

MACKNESS, 2015). A PON tem a capacidade de hidrolisar peróxidos lipídicos, hidroperóxidos e outros compostos, tornando-a uma enzima com potencial antioxidante importante no combate ao estresse oxidativo (CHRISTIAKOV et al., 2017).

Tanto a atividade quanto a concentração de PON 1 encontram-se reduzidas na DRC. Indivíduos com DRC apresentam níveis elevados de toxinas urêmicas e de AGEs, que podem modificar quimicamente a PON 1, prejudicando sua atividade, bem como redução nos níveis séricos de HDL e consequentemente redução de PON 1 circulantes (GUGLIUCCI et al., 2012).

Além da PON 1, no soro também são encontradas outras enzimas antioxidantes, incluindo a GSH-Px e a CAT. A GSH-Px apresenta-se em duas isoformas principais, GPx1 e GPx3. A GPx1 é encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias; e a GPx3 presente nas partículas de HDL (BUJISSE et al., 2012). Zargari e colaboradores (2015) observaram redução nos níveis das enzimas antioxidantes CAT, GSH-Px e SOD em eritrócitos de indivíduos com DRC. Eles sugerem que a perda ou inativação dos fatores antioxidantes possa estar relacionada com a cronicidade elevada na produção ERO e o aumento da lipoperoxidação lipídica, comprometendo os sistemas de defesa antioxidantes.

2.3 Estresse oxidativo na DRC

O aumento na produção de ERO devido à disfunção mitocondrial tem sido proposto como uma das principais causas envolvidas na promoção do estresse oxidativo na DRC (SMALL et al., 2012). De fato, o rim é o segundo maior órgão em relação ao consumo de oxigênio e de abundância mitocondrial, perdendo apenas para o coração. Assim, a disfunção mitocondrial tem um papel crítico no desenvolvimento das doenças renais. Essa alta demanda tanto de oxigênio quanto de mitocôndrias nos rins é necessária para fornecer energia suficiente para a remoção de resíduos orgânicos, reabsorção de nutrientes, manutenção da homeostase e do equilíbrio hidroeletrolítico e para o controle da pressão arterial (BHARGAVA; SCHNELLMANN, 2017).

A geração de moléculas oxidantes (como por exemplo $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $OH^{\bullet}$, entre outros) ocorre principalmente na mitocôndria, durante a geração de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) após gradiente de prótons e redução de oxigênio à água durante a respiração aeróbica. Outra importante fonte de moléculas oxidantes é a

atividade de algumas enzimas, incluindo NADPH oxidases (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*); são proteínas transmembranas que têm a função de transferir elétrons pelas membranas celulares; oceptor destes normalmente é o oxigênio, e em consequência desse processo, o radical $O_2^{\bullet}$ é gerado (BARBOSA et al., 2010).

As toxinas urêmicas também tem sido citadas como participantes do aumento no estresse oxidativo em indivíduos com DRC. O acúmulo de toxinas urêmicas observado nestes indivíduos promove um processo inflamatório, com estimulação de leucócitos polimorfonucleares e células $CD-8^+$ e subsequente produção de $O_2^{\bullet}$ via acetato de forbol miristato (PMA - *phorbol myristate acetate*) (LING; KUO, 2018). O acúmulo de ERO, principalmente de $O_2^{\bullet}$, induz a inativação e deficiência de óxido nítrico (NO). NO protege a função renal via aumento do fluxo sanguíneo, regulação da função do tubuloglomerular e por preservar a homeostase hidroeletrólítica. O $O_2^{\bullet}$ pode interagir com NO, gerando um forte oxidante, o $ONOO^-$, este capaz de oxidar proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos bem como diminui os efeitos de proteção de NO. Altos níveis de $O_2^{\bullet}$ no plasma e a deficiência de NO são ponderados como participantes do estresse oxidativo (LIAKOPOULOS et al., 2017; MODLINGER; WILCOX; ASLAM, 2004).

2.4 Estresse oxidativo na HD

A HD é definida como a difusão de moléculas do sangue através de uma membrana semipermeável ao longo de um gradiente de concentração eletroquímico. O objetivo primário da HD é restabelecer o ambiente dos fluidos intra e extracelulares típicos de uma condição de funcionamento normal da função renal (HIMMELFARB; IKIZLER, 2010). A velocidade de difusão está diretamente relacionada à concentração e ao peso molecular do soluto a ser dialisado; pequenas moléculas, incluindo a ureia, difundem-se rapidamente, enquanto que moléculas grandes (β_2 -microglobulina, albumina) bem como solutos associados a proteínas (como por exemplo o p-cresol) difundem-se mais lentamente (HIMMELFARB; IKIZLER, 2010).

Para iniciar a terapia dialítica, é necessário um acesso vascular funcional, como a fístula arteriovenosa (FAV), ou um cateter com dois sítios de punção, uma por onde o sangue é impulsionado até o dialisador e outra pela qual o sangue filtrado retornará ao indivíduo. Através de uma bomba, o sangue é impulsionado até um sistema formado

pelo líquido de diálise e um filtro com membrana semipermeável, na qual o sangue e o líquido se misturam permitindo, trocas de água e solutos por difusão. A solução de diálise ou líquido de diálise (dialisato) é composta por uma solução de eletrólitos e água importantes para a homeostase. O filtro dialisador separa dois compartimentos: um para o sangue e o outro para o dialisato, cada um com um ponto de entrada e saída com circulação dispondo-se contracorrente. A membrana dialisadora é composta por placas ou finos tubos capilares. O sangue entra por um compartimento, distribui-se por dentro desses capilares, até sair em outro compartimento, o dialisato circula na porção externa (BIANCHI, 2003).

Em revisão de Morena e colaboradores (2000) são descritos os diversos fatores relacionados à HD que podem ter participação no estabelecimento do estresse oxidativo, onde os autores distribuem tais fatores em duas categorias, aqueles que estimulam o aumento na produção de ERO, e aqueles que levam à redução nas defesas antioxidantes. Dentre os fatores que participam do estímulo à produção de ERO durante a HD, destacam-se: i) fatores relacionados à uremia, e neste caso merece destaque a superprodução de ERO por leucócitos polimorfonucleares (LPMN), em especial $O_2^{\bullet-}$, HOCl e $ONOO^-$ (WARD; MCLEISH, 1994); ii) fatores induzidos pela HD, como por exemplo: ativação dos LPMN devido à passagem forçada do sangue pela diálise, tipo da membrana selecionada para a realização da diálise (membranas de celulose do tipo cuprofano ativam LPMN de maneira mais exacerbada em relação às membranas sintéticas de polissulfano), presença de endotoxinas (lipopolissacarídeo, LPS) no dialisado também levando à ativação de LPMN (CRISTOL et al., 1994; WARD; MCLEISH, 2003). Já entre os fatores que causam prejuízos nas defesas antioxidantes pela HD podem ser citados: i) fatores relacionados à uremia, com destaque para o aumento nos níveis de inibidores da enzima NO sintase, em especial a dimetil arginina assimétrica (ADMA), aumentando assim o risco de eventos cardiovasculares devido aos baixos níveis de NO (BAYLIS, 2006); ii) remoção dialítica de compostos antioxidantes, principalmente aqueles hidrossolúveis e de baixo peso molecular, como por exemplo as vitaminas C e E, ácido úrico, selênio (importante para a atividade da GSH-Px) dentre outros (KOENIG et al., 1997; MORENA et al., 2002).

Portanto, crescem as evidências da associação entre o aumento na geração de ERO, os prejuízos nas defesas antioxidantes endógenas e a baixa biodisponibilidade de

NO para o desenvolvimento da disfunção endotelial em pacientes com DRC (MALYSZKO, 2010; SATOH, 2012), predispondo estes indivíduos às complicações em longo prazo da DRC, especialmente àquelas relacionadas à aterosclerose e outros eventos cardiovasculares (GO et al., 2004; SCHIFFRIN; LIPMAN; MANN, 2007).

Em face de todas estas condições observadas na HD, tem sido postulado que o estresse oxidativo é exacerbado em indivíduos com DRC após a sessão de HD (CHEN; CHANG; LIOU, 1998; GLORIEUX et al., 2012). Kundoor e colaboradores (2017) observaram um aumento significativo de espécies oxidantes e diminuição nos níveis de antioxidantes em pacientes em tratamento dialítico, após uma sessão de HD. Ujhelyi e colaboradores (2006) observaram que a diminuição na capacidade antioxidante do plasma de pacientes após a HD pode ser devido à remoção de alguns solutos urêmicos, aumentando o risco de oxidação da LDL e de danos às células endoteliais, ambas as alterações determinantes para o risco de doenças cardiovasculares em indivíduos com DRC. Sautin e Johnson (2008), Miyamoto e colaboradores (2010) e Assis e colaboradores (2015) analisaram, utilizando sistemas-modelo *in vitro*, o potencial antioxidante de alguns solutos urêmicos, simulando nestes sistemas as concentrações plasmáticas fisiológicas e urêmicas destes solutos, e relataram a eliminação/inibição de ERO, tais como $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ e $ROO^{\bullet}$, devido às ações antioxidantes de alguns solutos urêmicos, como por exemplo o ácido úrico. Contrariamente, Soejima e colaboradores (2004) observaram diminuição nos níveis de albumina em sua forma oxidada em pacientes após a realização de HD. Terawaki e colaboradores (2010) encontraram exatamente o oposto, isto é, aumento nos níveis da fração oxidada da albumina em pacientes após a HD.

Estes dados não implicam na defesa de solutos urêmicos como antioxidantes e que, portanto, a HD seja prejudicial aos indivíduos; uma vez que um dos principais objetivos da HD é a remoção das “toxinas” urêmicas, denota-se que o procedimento não induz malignidades. No entanto, a compreensão do status antioxidante em indivíduos com DRC, especialmente após o ingresso nas sessões de HD, é extremamente importante para a projeção da necessidade de intervenções antioxidantes, bem como para monitoramento da efetividade desta possível intervenção. Portanto, a terapia hemodialítica oferece oportunidades para o desenvolvimento da medicina personalizada.

Em relação ao uso de componentes dos sistemas antioxidantes como biomarcadores de estresse oxidativo em amostras de soro/plasma ou células sanguíneas, evidências indicam que tanto antioxidantes intracelulares quanto extracelulares são severamente reduzidos em pacientes com DRC submetidos à HD (HIMMELFARB, 2009). No entanto, quando as atividades das enzimas antioxidantes são monitoradas no plasma ou soro de indivíduos submetidos à HD, os resultados são altamente variáveis, desde ausência de alteração até redução na atividade de SOD, CAT, GSH-Px e PON 1. No entanto, vale lembrar que a maioria destas enzimas antioxidantes estão presentes predominantemente no meio intracelular, bem como a GSH, cuja concentração plasmática é baixa, de apenas 2 μ M (WARD; MCLEISH, 2003). A grande maioria dos grupos sulfidríla encontrados no plasma encontram-se na albumina, em sua forma não oxidada, sendo esta proteína o alvo mais importante de formação de grupos carbonílicos no plasma (HIMMELFARB; MCMONAGLE, 2001), sugerindo ser a albumina uma defesa importante contra o estresse oxidativo em indivíduos sob HD. Além da albumina, no sangue também circulam importantes antioxidantes, tais como as vitaminas C e E, β -caroteno, ácido úrico, entre outros (VASCONCELOS et al., 2007).

Contudo, a existência de diferentes abordagens e diversos ensaios analíticos para a determinação do status oxidante/antioxidante em indivíduos com DRC submetidos à HD certamente explica as divergências observadas nos resultados em diversos estudos. Dentre os marcadores utilizados para a determinação do status oxidante/antioxidante, podemos citar os biomarcadores de lesão oxidativa, os biomarcadores de atividade/proteção antioxidante, e o potencial antioxidante das amostras biológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações no potencial antioxidante e nos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo no soro de indivíduos sem e com doença renal crônica, sendo estes últimos avaliados em duas condições distintas, antes e após uma sessão de hemodiálise.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar, no soro de indivíduos sem e com doença renal crônica, sendo estes últimos avaliados em duas condições distintas, antes e após uma sessão de hemodiálise:

- biomarcadores bioquímicos séricos: creatinina, ureia, ácido úrico, potássio, proteína total, albumina, glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL e colesterol-VLDL;
- biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo: níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas carboniladas (PCO) e produtos finais de glicação avançada (AGEs fluorescentes);
- atividades das enzimas antioxidantes: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e paraoxonase 1 (PON 1);
- capacidade antioxidante total: ensaio de clareamento (*bleaching*) da crocina e ensaio de captura do cátion radical ABTS^{•+};
- concentração de grupos tióis totais.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Indivíduos e Grupos de Estudo

Para este estudo foram analisadas amostras de soro de 40 indivíduos de ambos os sexos (22 homens e 18 mulheres) portadores de doença renal crônica e submetidos à hemodiálise, com idade entre 18 e 60 anos e que realizam hemodiálise três vezes por semana, em sessões com duração de no mínimo 3 horas, e em indivíduos que estejam em hemodiálise há pelo menos três meses. Os indivíduos foram submetidos à hemodiálise com solução de bicarbonato em um dialisador capilar com membrana de polissulfona de alto fluxo (Hemoflow F – Fresenius Medical Care AG & Co., Alemanha). Os indivíduos apresentavam fístulas arteriovenosas ou cateter como acesso vascular e as taxas de fluxo sanguíneo diferenciaram entre 350 e 500 mL/min e as taxas de fluxo de dialisato variaram entre 500 e 800 mL/min.

Para a composição do grupo controle foram analisadas amostras de soro de 40 indivíduos de ambos os sexos (19 homens e 21 mulheres), doadores de sangue saudáveis, não tabagistas, junto ao Hemonúcleo Regional de Araraquara, SP.

4.2 Critérios de Exclusão

Indivíduos cujas idades eram maiores que 60 e inferiores a 18 anos; indivíduos tabagistas; indivíduos portadores de infecções microbianas recentes ou crônicas e que estavam em terapia com antibióticos; portadores de doenças inflamatórias agudas e crônicas não renais, portadores de hepatites dos tipos A, B e/ou C, portadores de HIV; portadores de neoplasias benignas ou não; pacientes que realizam diálise peritoneal; pacientes que utilizam álcool e/ou drogas ilícitas; pacientes incidentes em hemodiálise (inferior a três meses) e pacientes cuja etiologia da doença renal for devido às seguintes condições: síndrome hemolítica urêmica, nefropatia tubulointersticial, rim policístico, cálculo e eclâmpsia.

4.3 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos relacionados com os indivíduos foco do estudo foram submetidos ao Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Plataforma Brasil do Ministério da Saúde, sendo aprovado sob

o número do Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE): 76859617.4.0000.5426, em 13 de novembro de 2017.

Todos os indivíduos possíveis para inclusão neste projeto foram esclarecidos sobre a pesquisa e os que aceitaram a participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (ANEXO I) e o Termo de Autorização de Doação de Material Biológico (ANEXO II).

As assinaturas destes documentos e os esclarecimentos dos objetivos da pesquisa e do conteúdo do TCLE foram etapas realizadas com o acompanhamento do Dr. José Luiz Saheb, médico técnico responsável do Centro Regional de Hemodiálise de Araraquara, SP.

4.4 Coleta e Preparo das Amostras

As amostras de sangue total foram coletadas em tubos tipo *vacutainer*, sem anticoagulante; para os indivíduos com DRC foram coletados um tubo antes da sessão de HD (pré-HD) e um tubo após o término da sessão de HD (pós-HD). No mesmo dia foram coletadas as amostras de sangue do grupo controle.

Os tubos contendo sangue total permaneceram em repouso, verticalmente, por 30 minutos, e em seguida foram centrifugados à 700 g por 10 minutos, para a obtenção do soro. O soro foi aliquoteado em microtubos da marca Eppendorf e armazenados à -80°C até realização das análises.

4.5 Biomarcadores Bioquímicos

Os níveis séricos de creatinina, ureia, ácido úrico, potássio, proteína total, albumina, glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol-HDL foram determinados com o uso de ensaios colorimétricos ou potenciométricos em slides contendo química seca (Analisador Vitros 250, Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson Company).

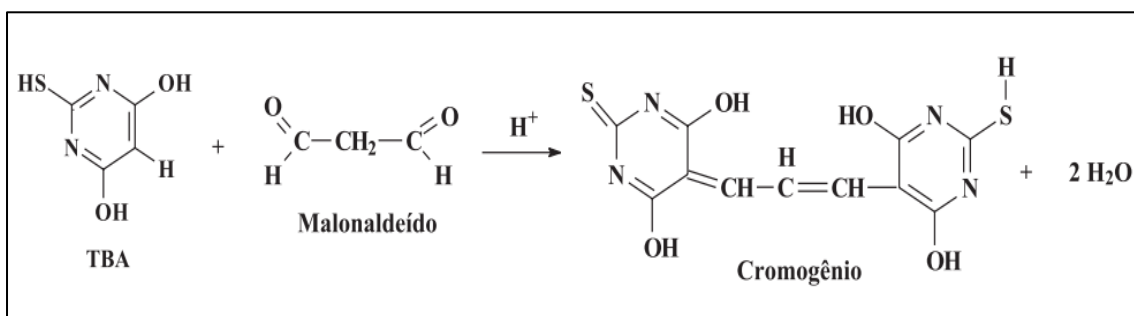
Os níveis de colesterol-LDL e colesterol-VLDL foram estimados de acordo com a fórmula de Friedewald. A equação de Friedewald (1972) estima os níveis séricos de colesterol-LDL a partir do colesterol total, colesterol-HDL e triglicerídeos. Os níveis de colesterol-VLDL são estimados a partir da concentração de triglicerídeos dividido por 5.

$$\text{Colesterol-LDL mg/dL} = \text{colesterol total} - \text{colesterol-HDL} - (\text{triglicerídeos}/5).$$

4.6 Avaliação da Peroxidação Lipídica

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram analisados de acordo com Kohn e Liversedge (1944). O método baseia-se na reação entre o TBA e um dos principais produtos secundários da peroxidação lipídica, o MDA, formando o complexo com cor vermelha (Figura 2). A determinação dos níveis de TBARS permite o monitoramento de alterações relacionadas à peroxidação lipídica. A concentração de TBARS foi determinada fluorimetricamente, em comprimentos de onda de excitação de 510 nm e emissão de 553 nm. Foi realizada uma curva analítica com 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de TBARS.

Figura 2: Reação entre o TBA e o MDA, formando o composto colorido monitorado fluorimetricamente em comprimentos de onda de excitação de 510 nm e de emissão de 553 nm.



Fonte: OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005.

As amostras de soro foram diluídas 4 vezes em cloreto de potássio (KCl 1,15%). Foi adicionado 1,5 M de NaOH em tubos de ensaio contendo as amostras, os padrões ou o branco, e incubados a 60°C por 30 minutos. Após banho de gelo por 5 minutos, foi adicionado ácido perclórico 10%, e os tubos centrifugados à 10.621 g durante 10 minutos a 4°C; os sobrenadantes foram usados para a quantificação de TBARS. Aos sobrenadantes foi adicionada solução de 10 mM de ácido tiobarbitúrico (TBA) (preparado em tampão fosfato monobásico de potássio, 75 mM, pH 2,5). As amostras foram então colocadas em banho fervente (100°C) por 15 minutos e em seguida mantidas em gelo por 5 minutos. A leitura da fluorescência foi realizada em microplaca no equipamento Biotek® *Precision XS Microplate Sample Processor*.

4.7 Estimativa dos Produtos Finais de Glicação Avançada

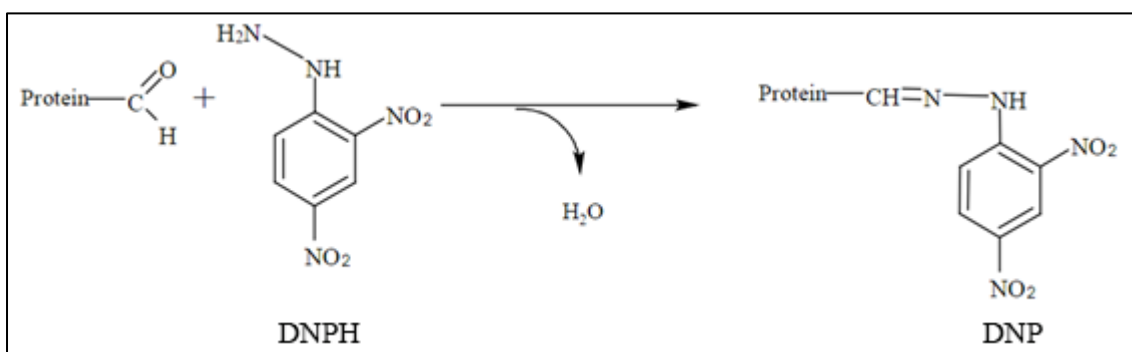
Os produtos finais de glicação avançada foram estimados via fluorescência, de acordo com Münch et al. (1997) e Zilin et al. (2001), com modificações, nos seguintes comprimentos de onda de excitação e emissão: AGEs fluorescentes (λ_{exc} 370 nm; λ_{em} 440 nm) e pentosidina (λ_{exc} 328 nm; λ_{em} 378 nm) (PENNACCHI et al., 2015).

Para a estimativa dos AGEs fluorescentes, nas amostras de soro foram adicionados 4,6 M de clorofórmio, 0,15 M de ácido tricloroacético e 1,5 M de hidróxido de sódio (NaOH). Após 10 segundos de homogeneização em vórtex, as amostras foram mantidas na geladeira (2°C a 8°C) por 30 minutos e posteriormente centrifugadas à 13.000 g durante 10 minutos a 10°C. Em seguida, uma alíquota do sobrenadante foi retirada para a estimativa de AGEs fluorescentes (λ_{exc} 370 nm; λ_{em} 440 nm) e de pentosidina (λ_{exc} 328 nm; λ_{em} 378 nm) (PENNACCHI et al., 2015). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência/mg de proteína (UA/mg de proteína). A leitura da fluorescência foi realizada em microplaca no equipamento Biotek® *Precision XS Microplate Sample Processor*.

4.8 Quantificação de Grupos Carbonilas em Proteínas

Os níveis de proteínas carboniladas (PCO) em soro foram determinadas de acordo com a metodologia de Levine et al. (1994) com algumas modificações. Os grupos carbonilas presentes nas proteínas reagem com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP), a qual é monitorada em 370 nm (Figura 3).

Figura 3: Reação entre o grupo carbonil da proteína e o DNPH, formando DNP.



Fonte: PURDEL; MARGINA; ILIE, 2014.

As amostras de soro foram diluídas 4 vezes em tampão fosfato 50 Mm (pH 6,7) contendo 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Para cada amostra de soro, foram preparados dois tubos (controle e teste), nestes foram adicionados o soro e ácido tricloroacético (TCA) 10%, em seguida foi realizada centrifugação a 10.000 g por 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, e aos tubos controle adicionou-se 2,5 M de ácido clorídrico (HCl) e, aos tubos testes adicionou-se 0,1% de DNPH solubilizado em 2,5 M de HCl. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos na ausência de luz, e agitados a cada 15 minutos. Em seguida foi adicionado TCA 10% em ambos os tubos e eles foram centrifugados a 10.000 g por 5 minutos a 4°C, posteriormente foram descartados os sobrenadantes. Os precipitados foram lavados duas vezes com solução acetato de etila:etanol (1:1) para remoção do DNPH livre. Aos tubos contendo os precipitados foi adicionado 6 M de ureia e eles foram centrifugados a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C.

A leitura da absorbância dos sobrenadantes foi realizada no equipamento espectrofotômetro da marca Jasco Corporation® V-630, no comprimento de onda de 370 nm e a concentração de proteínas carboniladas na amostra foi obtida utilizando-se o coeficiente de extinção molar da hidrazona ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Os valores de proteínas carboniladas foram corrigidos pela dosagem de proteína total sérica pelo método de Lowry (1951).

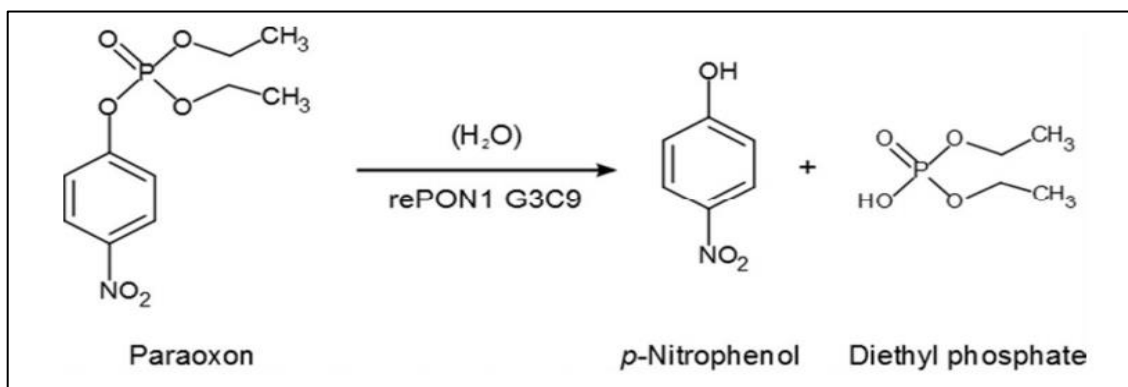
A dosagem de proteína total em soro foi determinada de acordo com a metodologia de Lowry (1951). O princípio do método baseia-se na redução do reagente Folin-Ciocalteau (uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico) o qual, ao reagir com proteínas, na presença de cobre (II) forma um cromóforo azul escuro, determinado espectrofotometricamente em 660 nm. Os resultados de proteínas totais foram expressos em mg/mL, utilizando uma curva analítica de albumina bovina sérica.

Nas amostras de soro foi adicionada uma solução contendo 2% de carbonato de sódio (Na_2CO_3) em 0,1 N de NaOH e 0,5% de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$) em 1% de tartarato de sódio. Em seguida as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente, e adicionado o reagente Folin-Ciocalteau, Após 30 minutos em repouso em temperatura ambiente e na ausência de luz, a leitura foi realizada em 660 nm.

4.9 Atividade da Paraoxonase 1 (PON 1)

A atividade da PON 1 no soro foi determinada de acordo com Costa et al. (1990), com algumas modificações (ASSIS et al., 2017). A atividade da PON 1 foi determinada pela hidrólise do paraoxon e liberação do *p*-nitrofenol (Figura 4).

Figura 4: Hidrólise do paraoxon com liberação de *p*-nitrofenol e dietil fosfato, catalisada pela PON 1.



Fonte: MONTEIRO et al., 2016.

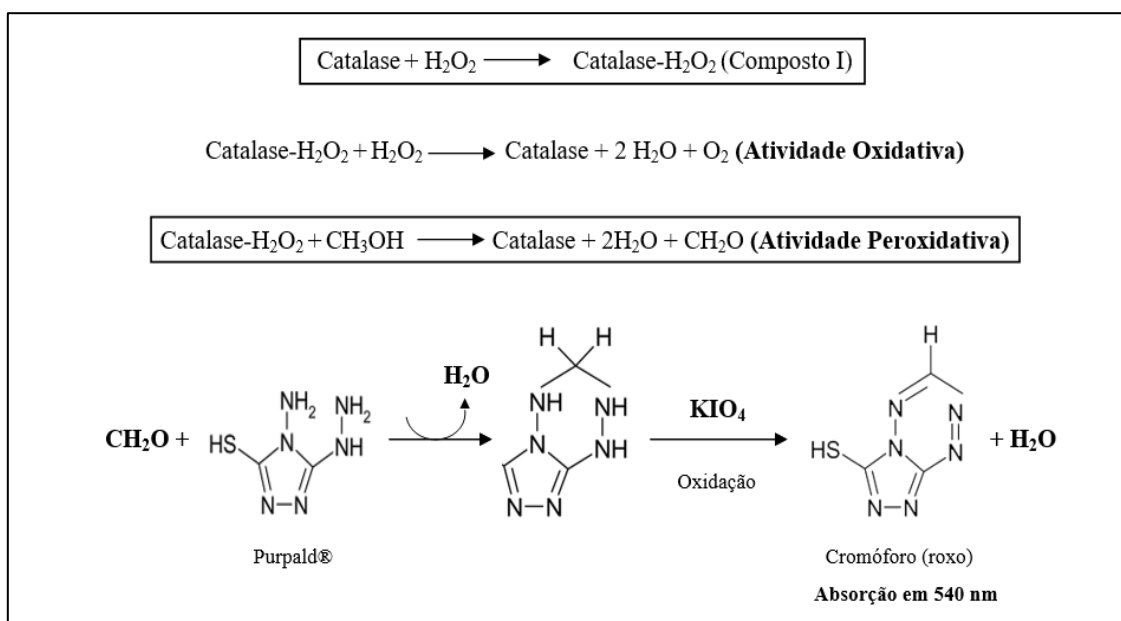
O meio reacional foi preparado da seguinte maneira: ao soro foi adicionado tampão Tris-HCl (15 mM, pH 8,5), contendo 0,15 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2), 0,3 M de cloreto de sódio (NaCl) e 1,2 mM de paraoxon. A solução estoque de paraoxon (120 mM) foi preparada em acetona e mantida no gelo; antes do uso, diluiu-se essa solução estoque 40 vezes em água e sua concentração foi monitorada em 274 nm, usando o coeficiente de extinção molar do paraoxon em água ($8900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O ensaio foi realizado à 37°C e iniciado pela adição de paraoxon; a atividade foi monitorada pela absorbância em 405 nm durante 5 minutos. Os resultados foram calculados utilizando o coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol ($18000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade da PON 1 foi expressa em unidades/litro (unidade = μmol paraoxon hidrolisado/min).

4.10 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade peroxidativa da CAT no soro foi determinada de acordo com Johansson e Borg (1988), com modificações. Essa metodologia é baseada na reação da catalase com metanol e peróxido de hidrogênio em concentração otimizada. O formaldeído produzido nesta reação é medido espectrofotometricamente com o

cromógeno 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald), formando um cromóforo (roxo) que absorve luz em 540 nm (Figura 5). Os resultados foram expressos em atividade de catalase por $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$.

Figura 5: Atividade peroxidativa da CAT.



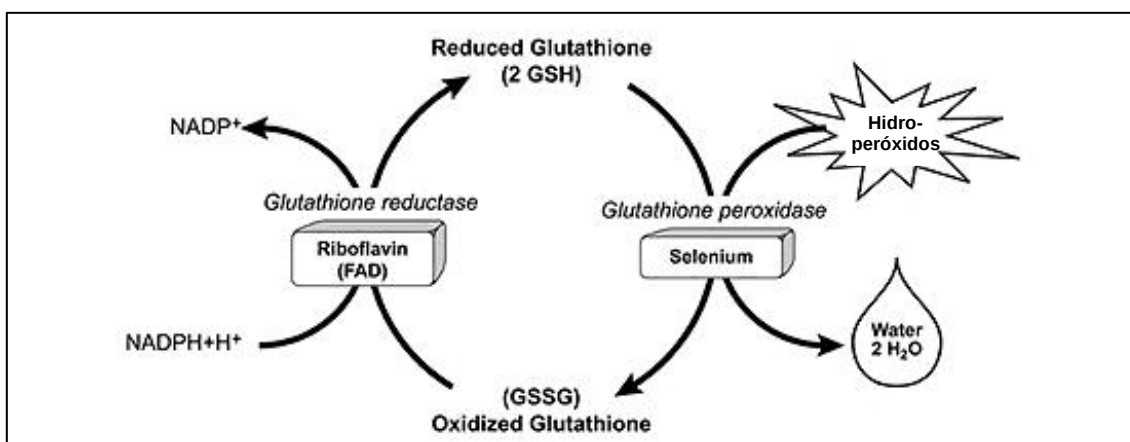
Fonte: Do autor, 2019.

As amostras de soro de indivíduos do grupo controle e do grupo com DRC foram diluídas 5 e 3 vezes, respectivamente, com tampão fosfato de potássio 25 mM pH 7,5 contendo 1 M de NaOH e 1 mM de EDTA. Para a curva padrão de formaldeído foram utilizadas as concentrações de 50 μM , 100 μM , 200 μM , 300 μM e 400 μM . Em tubos de ensaios contendo as amostras, padrões ou tubo branco foi adicionado tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 contendo 1 M de NaOH, metanol 100% e 50,04 mM de peróxido de hidrogênio para iniciar a reação. Após 20 minutos com agitação, foi adicionado 10 M de hidróxido de potássio (KOH) para encerrar a reação, e em seguida foi adicionado o cromógeno Purpald (33,4 Mm) em 500 mM de HCl e agitado durante 10 minutos. Foi adicionado 65,2 mM de periodato de potássio (KIO_4) em 500 mM de KOH, agitado por 5 minutos e a leitura foi realizada em microplacas no equipamento espectrofotômetro da marca Biotek® PowerWave XS em 540 nm.

4.11 Atividade da Glutathiona Peroxidase (GSH-Px)

A atividade da GSH-Px foi determinada de acordo com Ferreira et al. (1999). A GSH-Px catalisa a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) na presença de H_2O_2 produzindo a glutathiona oxidada (GSSG). Na presença de glutathiona redutase (GSH-Rd), a GSSG é reduzida à GSH com oxidação concomitante do NADPH à NADP^+ . A oxidação do NADPH é monitorada pela diminuição da absorbância em 340 nm (Figura 6). O monitoramento da absorbância foi realizado em microplacas no equipamento Biotek® *PowerWave XS*. O meio reacional contém tampão Tris/HCl (1M de EDTA; pH 8,0; 1,23 mmol/L), GSH-Rd (0,72 UI/mL), NADPH (0,14 mM), GSH (1,42 mM), *t*-butil hidroperóxido (100 μM) e 17 μL de soro com volume final de 300 μL . Os resultados foram expressos mmol de NADPH consumido/min/g de proteína.

Figura 6: Conversão de glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG) por ação da glutathiona peroxidase (GSH-Px), com conversão de hidroperóxido em água. Redução de GSSG em GSH por ação da glutathiona redutase (GSH-Rd) com oxidação de NADPH.



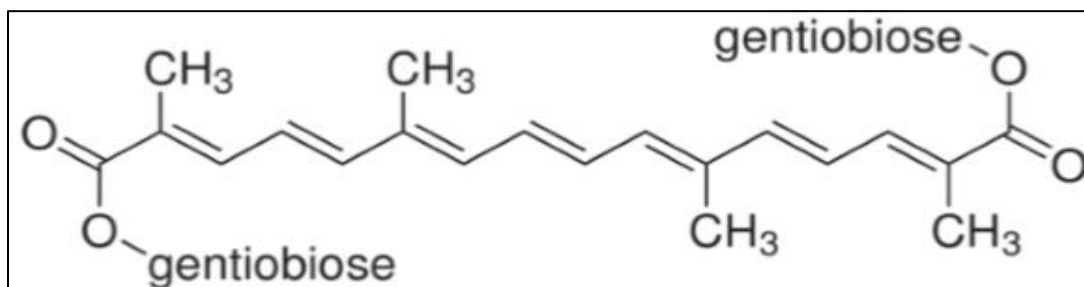
Fonte: ILKHANI; HOSSEINI; SAEDISOMEOLIA, 2016 (com modificações).

4.12 Ensaio de clareamento (*bleaching*) da crocina

O ensaio de clareamento (*bleaching*) da crocina é um método *in vitro* utilizado para determinar a capacidade antioxidante total do soro humano. Essa metodologia foi realizada de acordo com Tubaro et al. (1998) e Assis et al. (2015), uma vez que o

princípio do método se baseia na competição entre a crocina (Figura 7) e a amostra (soro contendo antioxidantes) em eliminar o $\text{ROO}^\bullet$.

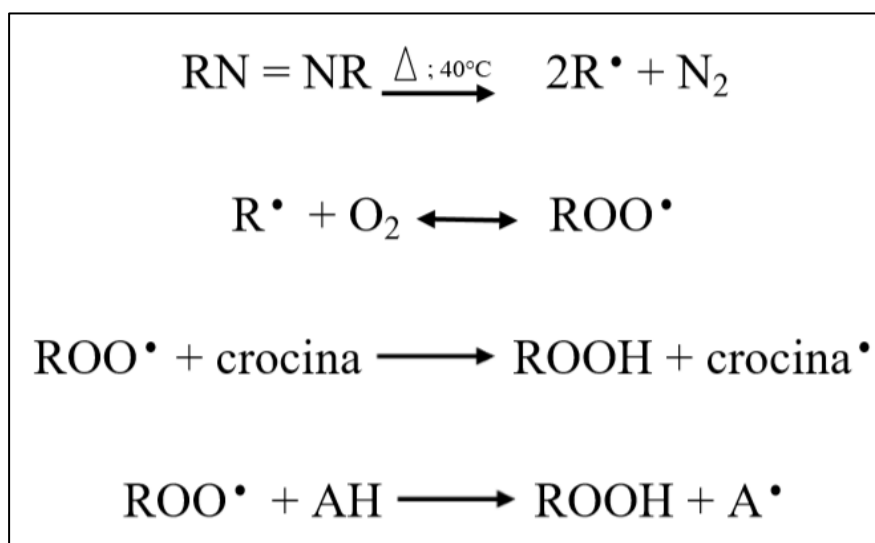
Figura 7: Estrutura química da crocina.



Fonte: NIE et al., 2019.

O monitoramento da diminuição da absorbância da crocina foi realizado em 443 nm durante 10 minutos. A reação é iniciada ao adicionar o azocomposto dicloridrato de 2,2'-azobis- (2metilpropanoamidina) (AAPH), que em 40°C, por termólise, gera um radical livre, em meio aerado. O O_2 presente no meio da reação reage com o radical e gera os radicais $\text{ROO}^\bullet$; o $\text{ROO}^\bullet$ retira um átomo de hidrogênio e gera um radical na estrutura da crocina, levando ao rompimento de suas duplas ligações, provocando seu clareamento, e diminuição de sua absorbância na região do visível. Na presença de molécula(s) antioxidante(s), essa diminuição da absorbância se torna menor e por isso registra-se um novo valor na variação da absorbância em função do tempo, ou seja, na velocidade do clareamento (*bleaching*) da crocina. Assim, os antioxidantes competem com a crocina pelos radicais $\text{ROO}^\bullet$; portanto a inibição de sua oxidação depende da capacidade das amostras na captura das espécies radicalares (Figura 8).

Figura 8: Reações envolvidas no ensaio de clareamento da crocina. A, representa um antioxidante.



Fonte: ASSIS et al., 2017 (Adaptado).

O ensaio foi realizado em volume total de 2 mL, em tampão fosfato de sódio 0,12 M, pH 7,0 com 25 µM de crocina (a partir de uma solução estoque em DMSO 6 mM) e diferentes volumes da amostra de soro. A reação teve início com adição de 50 µL (12,5 mM, concentração final) de AAPH (em solução estoque fresca 0,5 M em tampão fosfato de sódio 0,12 M, pH 7,0), monitorada à 443 nm, sob agitação e temperatura de 40°C, constantes.

A velocidade do clareamento da crocina é linear após 2 minutos da adição do AAPH, e foi monitorada durante 10 minutos em espectrofotômetro (Jasco Corporation ® V-630). Foi realizado para cada volume de amostra um ensaio sem crocina, considerando-o como branco da reação, a fim de evitar possíveis interferências na absorbância.

Por competição cinética, o clareamento da crocina pela geração do ROO[•] (v₀) diminui na presença de antioxidante(s). O antioxidante compete com a crocina pelo ROO[•] e uma nova velocidade de clareamento (v) corresponde a:

$$v = v_0 \times \frac{k_c [C]}{k_c [C] + k_a [A]}$$

Onde: $v_0 = k_1 \times [\text{ROO}^\bullet] \times [\text{C}]$; $k_c = k_1 \times [\text{ROO}^\bullet]$; $k_a = k_2 \times [\text{ROO}^\bullet]$;

$[\text{ROO}^\bullet]$ = concentração do radical peroxil; v_0 = velocidade da reação da crocina com $\text{ROO}^\bullet$; k_1 = constante de velocidade para a reação entre $\text{ROO}^\bullet$ e crocina; k_2 = constante de velocidade para a reação entre $\text{ROO}^\bullet$ e antioxidante; $[\text{C}]$ = concentração da crocina; $[\text{A}]$ = volume de amostra.

A velocidade de *bleaching* da crocina (v_0) diminui na presença de um antioxidante e um novo valor (v) é avaliado de acordo com a seguinte relação:

$$\frac{v_0}{v} = \frac{k_c [\text{C}] + k_a [\text{A}]}{k_c [\text{C}]} = 1 + \frac{k_a}{k_c} \times \frac{[\text{A}]}{[\text{C}]}$$

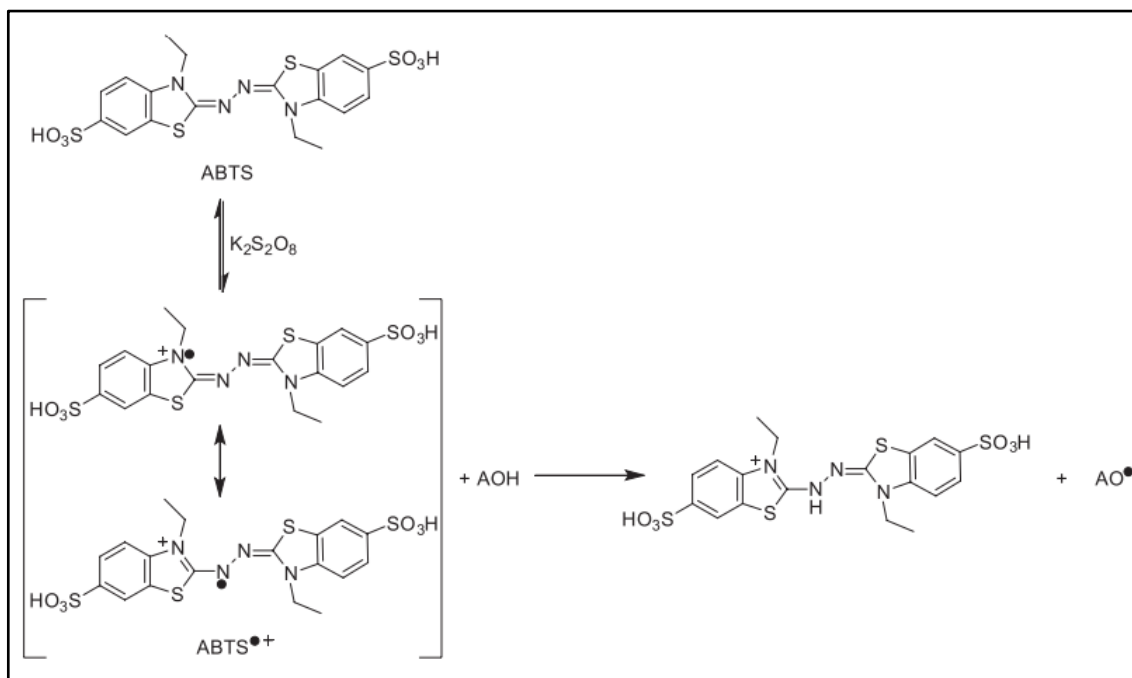
O valor de k_a/k_c , calculado a partir da inclinação de regressão linear do gráfico v_0/v versus $[\text{A}]/[\text{C}]$, indica a capacidade relativa de um antioxidante interagir com o $\text{ROO}^\bullet$.

4.13 Capacidade de captura do cátion radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$

A capacidade de captura do cátion radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ foi determinada de acordo com Re et al. (1999), com algumas modificações. O teste baseia-se na capacidade dos antioxidantes presentes na amostra capturarem o cátion radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$.

O $\text{ABTS}^{+\bullet}$ foi gerado pela oxidação do 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-fulfonato) (ABTS, 7 mmol/L) na presença de persulfato de potássio (140 mmol/L) (Figura 9), na ausência de luz e à temperatura ambiente, por aproximadamente 16 horas. Depois de formado, o radical foi diluído em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L (pH 7,4) até obter-se a absorbância com valor de aproximadamente $0,750 \pm 0,020$ a 734 nm. Utilizou-se o espectrofotômetro de placa (Biotek® PowerWave XS) para a realização das leituras das absorbâncias (734 nm), após incubação de 15 minutos na ausência de luz. O volume total da reação foi de 300 μL , sendo 100 μL fixo para o $\text{ABTS}^{+\bullet}$, 150 μL de tampão fosfato de sódio 10 mmol/L (pH 7,4) e 50 μL de soro diluído. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) das porcentagens de inibição (EC_{50}).

Figura 9: Oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), formando o $ABTS^{\bullet+}$ e sua reação com um antioxidante. AOH representa um antioxidante.

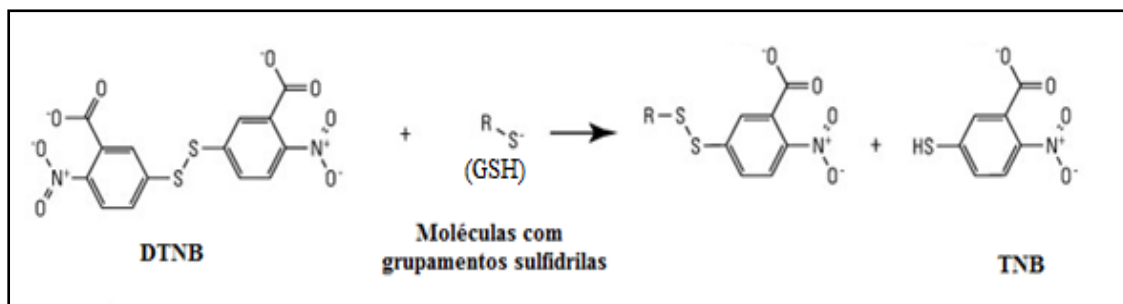


Fonte: OLIVEIRA et al., 2014.

4.14 Determinação da concentração de grupos tióis totais

A determinação da concentração de grupos tióis totais foi determinada de acordo com Sedlak & Lindsay (1968) com modificações. Este ensaio se baseia na redução do ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB; Reagente de Ellman) pelos grupamentos sulfidrilas, formando TNB, o qual é monitorado espectrofotometricamente à 412 nm (Figura 10).

Figura 10: Redução do DTNB por grupamentos sulfidrilas, formando TNB.



Fonte: ELLMAN, 1959.

As amostras de soro foram diluídas 4 vezes com solução tampão fosfato 50 mM (pH 8,0). Foi conduzida uma curva padrão de cisteína nas concentrações de 30 μM , 60 μM , 120 μM , 165 μM , 240 μM e 280 μM . Em tubos de ensaios contendo as amostras, padrões ou tubo branco, adicionou-se tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9) e após a adição de DTNB 0,01 M, foi realizado a leitura das absorbâncias. A leitura foi realizada em microplacas no espectrofotômetro (Biotek® *PowerWave XS*) em 412 nm. Os resultados foram expressos em grupos tióis totais ($\mu\text{mol/L}$).

4.15 Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados via avaliação da variância One way (ANOVA) seguida da análise de diferença pelo teste Student-Newman-Keuls. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$. As análises supracitadas, foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism® 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 Biomarcadores bioquímicos

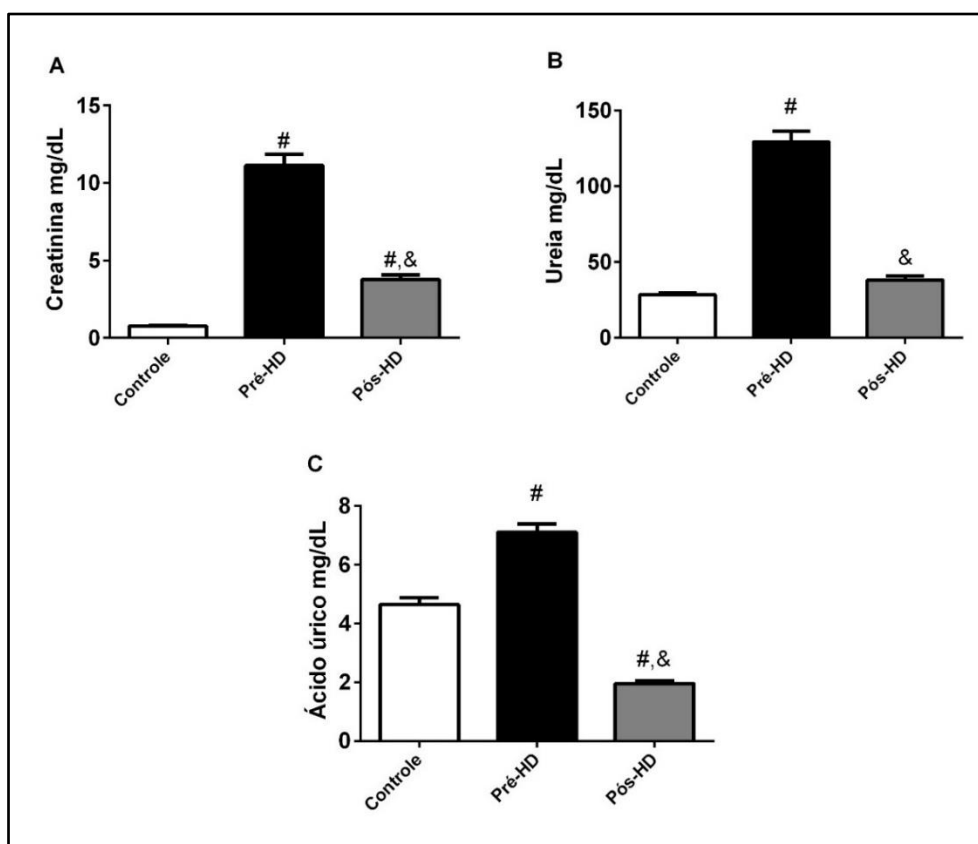
Na Figura 11 encontram-se os valores médios de creatinina, ureia e ácido úrico no soro de indivíduos do grupo controle e do grupo com DRC, antes (pré-HD) e após (pós-HD) uma sessão de HD.

As amostras de soro de indivíduos com DRC e na condição pré-HD apresentaram níveis elevados de creatinina ($10,51 \pm 0,79$; mg/dL) (FIGURA 11A), ureia ($129,3 \pm 7,16$; mg/dL) (FIGURA 11B) e ácido úrico ($7,10 \pm 0,28$; mg/dL) (FIGURA 11C), sendo estes aumentos de 13,8 vezes, 4,5 vezes e 53%, respectivamente, quando comparados aos valores encontrados no grupo controle (creatinina: $0,76 \pm 0,036$; ureia: $28,4 \pm 1,52$; ácido úrico: $4,64 \pm 0,23$; mg/dL).

Uma sessão de HD foi capaz de reduzir os níveis séricos de creatinina, ureia e ácido úrico em 65%, 70% e 72%, respectivamente (pós-HD; creatinina: $3,63 \pm 0,32$; ureia: $38,1 \pm 2,62$; ácido úrico: $1,95 \pm 0,09$; mg/dL).

Os marcadores séricos creatinina, ureia e ácido úrico possuem valores de referência diferentes para homem e mulher; por este motivo, na Tabela 3 estão apresentados os resultados referentes às médias dos níveis séricos de creatinina, ureia e ácido úrico de homens e mulheres, do grupo controle e dos indivíduos com DRC, antes e após a HD. No entanto, podemos observar que a distinção entre homens e mulheres não alterou o perfil de resposta, isto é, os indivíduos com DRC, na condição pré-HD apresentam níveis elevados de creatinina, ureia e ácido úrico no soro quando comparados com o grupo controle. Após uma sessão de HD, houve uma diminuição significativa destes marcadores no soro quando comparados com as amostras pré-HD.

Figura 11. Níveis séricos de creatinina (A), ureia (B) e ácido úrico (C) em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

Tabela 3. Níveis séricos de creatinina, ureia e ácido úrico em homens e mulheres do grupo controle e indivíduos com DRC, antes e após a HD.

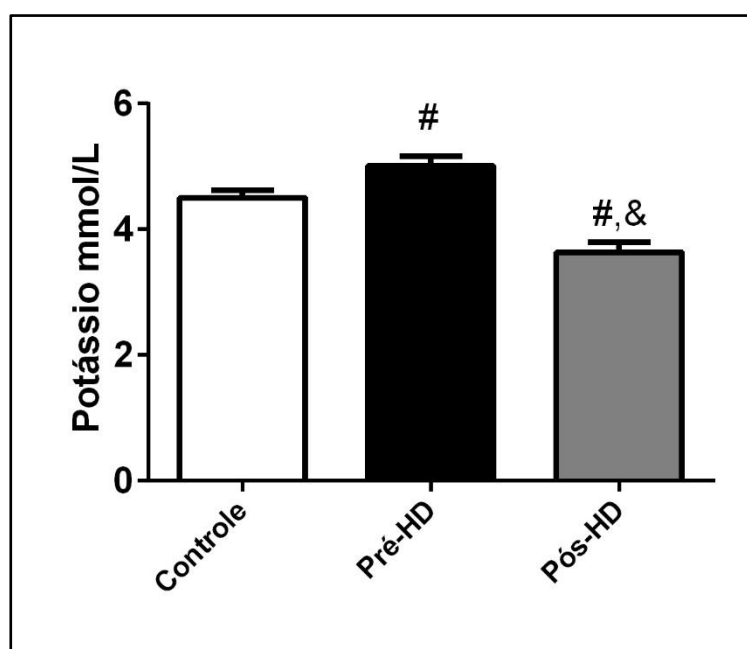
	Homem			Mulher		
	Controle (n = 19)	Pré-HD (n = 22)	Pós-HD (n = 22)	Controle (n = 21)	Pré-HD (n = 18)	Pós-HD (n = 18)
Creatinina	0,91 ± 0,042	11,54 ± 1,04 [#]	4,17 ± 0,37 ^{#,&}	0,68 ± 0,023	8,81 ± 1,10 [#]	2,59 ± 0,50 ^{#,&}
Ureia	32,8 ± 2,60	132,6 ± 9,44 [#]	42,4 ± 3,14 ^{&}	25,7 ± 1,15	125,3 ± 11,29 [#]	32,1 ± 4,02 ^{&}
Ácido úrico	5,43 ± 0,39	7,28 ± 0,33 [#]	2,09 ± 0,11 ^{#,&}	4,16 ± 0,23	6,89 ± 0,47 [#]	1,76 ± 0,14 ^{#,&}

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com p<0,05.

[#], diferenças com o grupo controle; [&], diferenças com o grupo pré-HD.

Os níveis séricos de potássio estão apresentados na Figura 12. Antes da sessão de HD, os indivíduos com DRC apresentavam um aumento de 11% nos níveis séricos de potássio ($5,01 \pm 0,15$; mmol/L) em comparação ao grupo controle ($4,50 \pm 0,13$; mmol/L). Após a sessão de HD, houve uma redução de 27% nos níveis séricos de potássio ($3,64 \pm 0,15$; mmol/L).

Figura 12. Níveis séricos de potássio em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

Na Figura 13 encontram-se os valores relacionados às concentrações séricas de glicose de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC, possuindo ou não diabetes mellitus como comorbidade. No entanto, vale destacar que os indivíduos com DRC não estavam em jejum no momento da coleta das amostras.

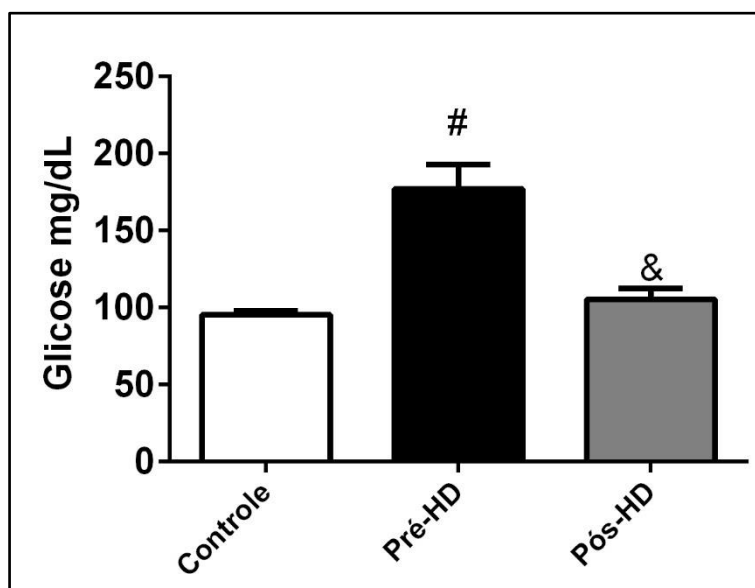
Pode-se observar que indivíduos do grupo controle apresentam valores de glicemia de $95,1 \pm 2,93$ (mg/dL), enquanto que os indivíduos com DRC, antes da HD,

apresentam valores de glicemia de $176,8 \pm 15,98$ (mg/dL). Ao final da sessão de HD, houve uma redução de 40% nos níveis séricos de glicose ($105,4 \pm 6,80$; mg/dL), quando em comparação aos valores pré-HD.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de glicemia em mg/dL, tanto dos indivíduos do grupo controle quanto dos indivíduos com DRC, sem e com diabetes mellitus (DM), avaliados antes e após a sessão de HD.

Analizando os valores de glicemia somente dos indivíduos com DRC, e separando os valores dos indivíduos que possuem DM daqueles que não possuem DM, nota-se que indivíduos com DRC e sem DM e antes da sessão de HD apresentam glicemia de $136,1 \pm 20,74$ (mg/dL), sem a realização do jejum; já indivíduos com DRC e com DM e antes da sessão de HD apresentam glicemia de $214,7 \pm 20,04$ (mg/dL), também sem jejum. Percebe-se assim um aumento de 43% nos níveis de glicose em indivíduos com DRC e sem DM, em relação ao grupo controle, e um aumento de 2,3 vezes nos níveis de glicose nos indivíduos com DRC e com DM, em comparação ao grupo controle. Em ambos os casos, ou seja, DRC sem DM e DRC com DM, a sessão de HD reduziu os níveis séricos de glicose em cerca de 29% e 47%, respectivamente, nas amostras pós-HD (DRC sem DM: $96,7 \pm 6,14$; DRC com DM: $113,5 \pm 11,69$; mg/dL).

Figura 13. Níveis séricos de glicose em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

Tabela 4. Níveis séricos de glicose em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC, sem e com diabetes mellitus, antes e após a HD.

Glicose sérica (mg/dL)				
Controle (com jejum)	DRC sem DM (sem jejum)		DRC com DM (sem jejum)	
	Pré-HD	Pós-HD	Pré-HD	Pós-HD
95,1 $\pm$ 2,93	136,1 $\pm$ 20,74 #	96,7 $\pm$ 6,14 &	214,7 $\pm$ 20,04 #	113,5 $\pm$ 11,69 &

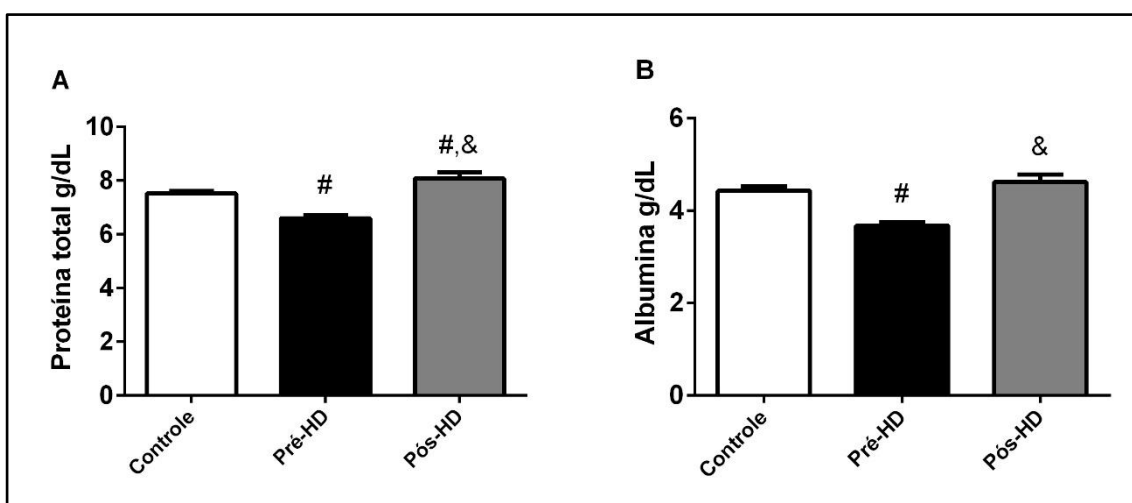
Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Controle $n = 40$, DRC sem DM $n = 18$ e DRC com DM $n = 22$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

Na Figura 14 encontram-se os níveis séricos de proteína total (FIGURA 14A) e de albumina (FIGURA 14B) de indivíduos do grupo controle e de indivíduos com DRC, antes e após a sessão de HD.

Os indivíduos do grupo controle apresentam níveis séricos de proteína total de $7,52 \pm 0,08$ (g/dL) e de albumina de $4,44 \pm 0,10$ (g/dL), enquanto que os indivíduos com DRC antes da sessão de HD apresentam valores séricos menores de ambos os biomarcadores ($6,59 \pm 0,11$ e $3,67 \pm 0,08$; g/dL, respectivamente). É possível observar que, ao término da sessão de HD, tanto os níveis séricos de proteína total ($8,08 \pm 0,23$, g/dL) quanto os níveis de albumina ($4,62 \pm 0,16$, g/dL) encontram-se aumentados, em cerca de 23% e 26% respectivamente.

Figura 14. Níveis séricos de proteína total (A) e de albumina (B) em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

Na Figura 15 estão apresentados os valores séricos de triglicerídeos (Figura 15A), colesterol total (Figura 15B), colesterol-HDL (Figura 15C), colesterol-LDL (Figura 15D) e colesterol-VLDL (Figura 15E) em soro de indivíduos do grupo controle e de indivíduos com DRC antes e após a sessão de HD.

Na Figura 15A estão apresentados os níveis séricos de triglicerídeos em soro de indivíduos pertencentes ao grupo controle ($137,3 \pm 9,56$; mg/dL) e em soro de indivíduos com DRC, nas condições pré-HD ($175,55 \pm 19,78$; mg/dL) e pós-HD ($162,87 \pm 20,60$; mg/dL). Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis séricos de triglicerídeos entre os diferentes grupos estudados.

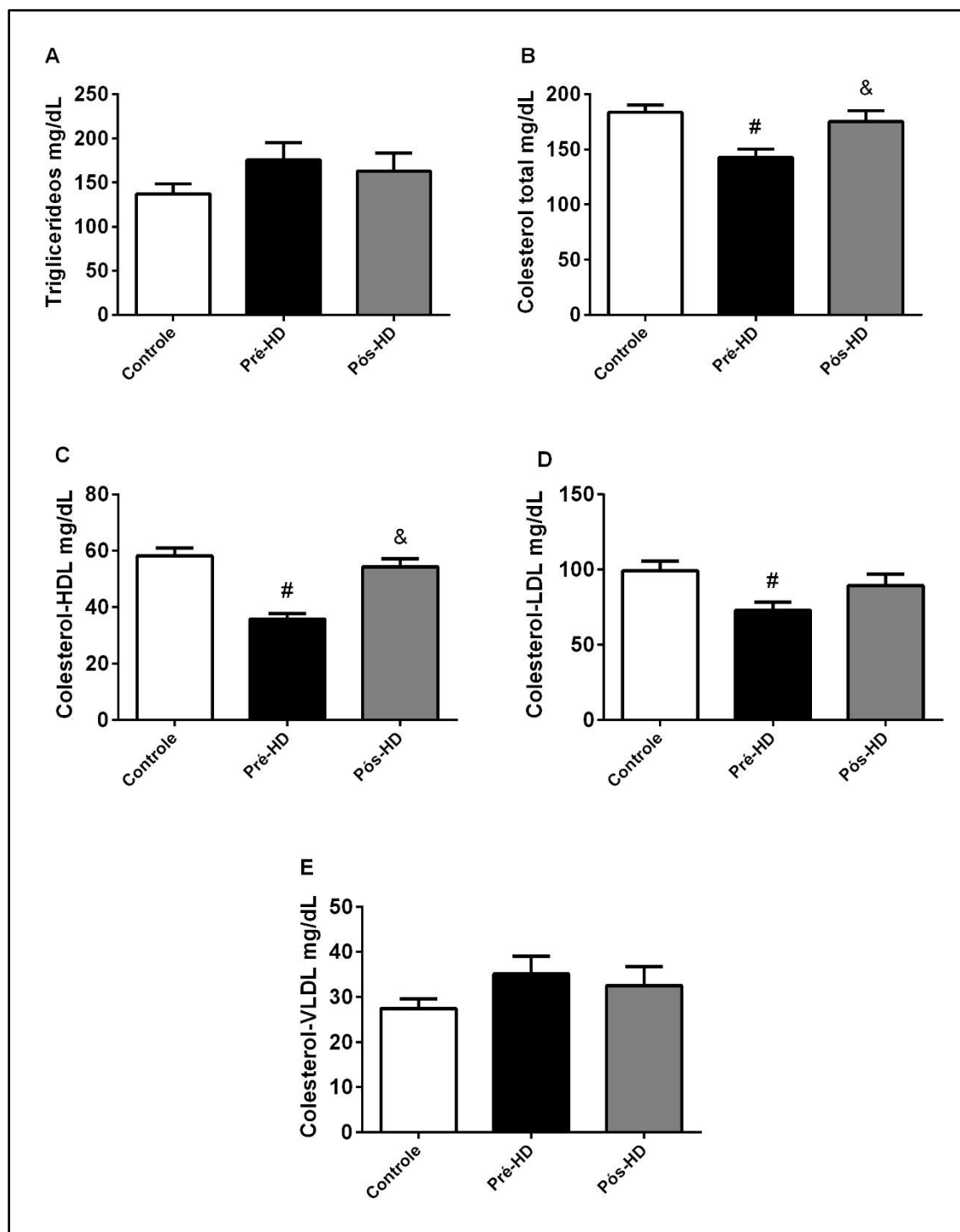
Indivíduos do grupo controle apresentam níveis séricos de colesterol total de $183,5 \pm 6,71$ mg/dL. Analisando o soro de indivíduos com DRC, as amostras pré-HD mostram níveis séricos de colesterol total de $142,83 \pm 7,59$ mg/dL, (diminuição de 22% em relação ao grupo controle). Ao final da sessão de HD, observa-se um aumento em 23% nos níveis séricos de colesterol ($175,27 \pm 10,02$ mg/dL) em relação ao pré-HD (Figura 15B).

Tal como pode ser observado na Figura 15C, as amostras do grupo controle apresentam níveis séricos de colesterol-HDL de $58,1 \pm 2,81$ mg/dL, enquanto que as amostras dos indivíduos pré-HD apresentam valores de colesterol-HDL de $35,8 \pm 1,90$; mg/dL, portanto nota-se que indivíduos com DRC, na condição pré-HD, têm níveis de colesterol-HDL significativamente mais baixos (38%) quando comparados com o grupo controle. No entanto, após a sessão de HD, houve um aumento de 52% nos níveis de colesterol-HDL ($54,4 \pm 2,82$; mg/dL), em comparação aos valores pré-HD.

Na Figura 15D, as amostras de soro de indivíduos do grupo controle mostram níveis de colesterol-LDL de $99,2 \pm 6,48$ mg/dL; já as amostras de soro de indivíduos com DRC na condição pré-HD apresentam uma diminuição de 26% nos níveis de colesterol-LDL ($72,78 \pm 5,68$ mg/dL) em relação ao controle, e pode ser observado um aumento de 23% nos níveis de colesterol-LDL em indivíduos com DRC ao término da sessão de HD ($89,37 \pm 7,71$; mg/dL).

Amostras de soro de indivíduos do grupo controle apresentam valores de colesterol-VLDL de $27,46 \pm 2,21$ mg/dL, enquanto que indivíduos com DRC na condição pré-HD apresentam níveis séricos de colesterol-VLDL de $35,1 \pm 3,96$ mg/dL e na condição pós-HD níveis séricos de colesterol-VLDL de $32,57 \pm 4,12$ mg/dL. Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis séricos de triglicerídeos entre os diferentes grupos estudados (Figura 15E).

Figura 15. Níveis séricos de triglicerídeos (A), colesterol (B), colesterol-HDL (C), colesterol-LDL (D) e colesterol-VLDL (E) em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

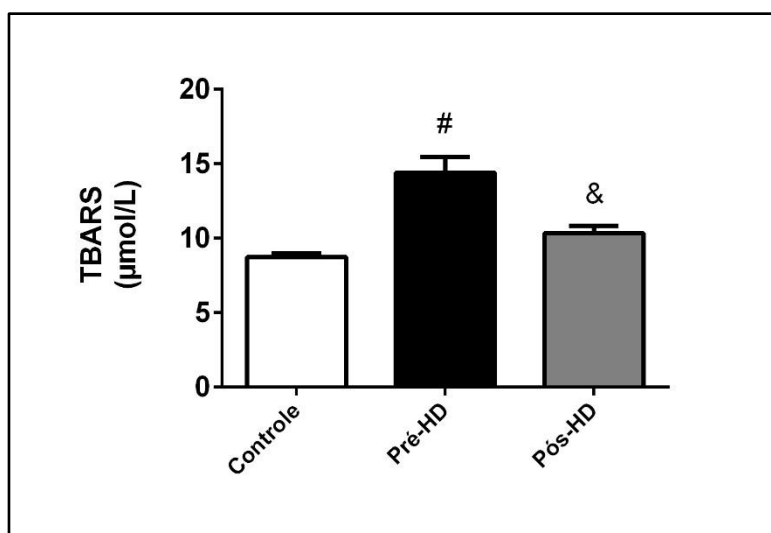
5.2 Biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo

5.2.1 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Na Figura 16 encontram-se os resultados referentes aos níveis de TBARS no soro de indivíduos dos grupos controle e grupo com DRC, antes e após a sessão de HD.

As amostras de soro de indivíduos com DRC na condição pré-HD apresentam um aumento de 65% nos níveis de TBARS ($14,38 \pm 3,57$; $\mu\text{mol/L}$) quando comparados ao grupo controle, sem DRC ($8,72 \pm 0,93$; $\mu\text{mol/L}$). Na comparação dos valores de TBARS em soros de indivíduos com DRC antes e após a sessão de HD, observa-se que houve uma redução de 28% nos valores de TBARS no soro de indivíduos com DRC após a HD ($10,32 \pm 1,76$; $\mu\text{mol/L}$).

Figura 16. Níveis séricos de TBARS ($\mu\text{mol/L}$) em indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

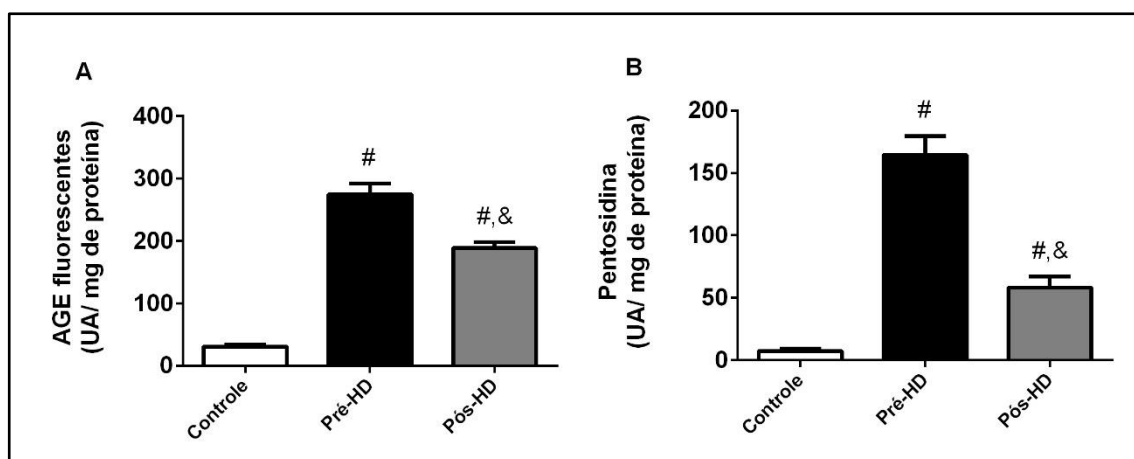
5.2.2 Níveis estimados de produtos finais de glicação avançada

Na Figura 17 encontram-se os resultados referentes aos valores, em unidades arbitrárias de fluorescência corrigidas por mg de proteína (UA/mg de proteína), de

AGEs fluorescentes (Figura 17A) e de pentosidina (Figura 17B) em amostras de soro de indivíduos do grupo controle indivíduos e com DRC antes e após a sessão de HD.

Os valores de AGEs fluorescentes e de pentosidina encontram-se significativamente elevados no soro de indivíduos com DRC: os valores de AGEs fluorescentes e de pentosidina encontram-se elevados cerca de 9 vezes e 22 vezes respectivamente, em soro de indivíduos com DRC na condição pré-HD ($274,9 \pm 16,96$ e $164,4 \pm 15,39$; UA/mg de proteína, respectivamente), em comparação aos valores observados no grupo controle ($30,8 \pm 2,96$ e $7,3 \pm 1,73$; UA/mg de proteína, respectivamente). Na comparação das condições pré-HD e pós-HD, houve uma redução de 31% nos valores de AGE fluorescentes e de 65% nos valores pentosidina, em soro de indivíduos após a sessão de HD ($188,5 \pm 9,22$ e $58,2 \pm 8,64$; UA/mg de proteína, respectivamente).

Figura 17. Níveis estimados de AGE fluorescentes (A) e de pentosidina (B) no soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.



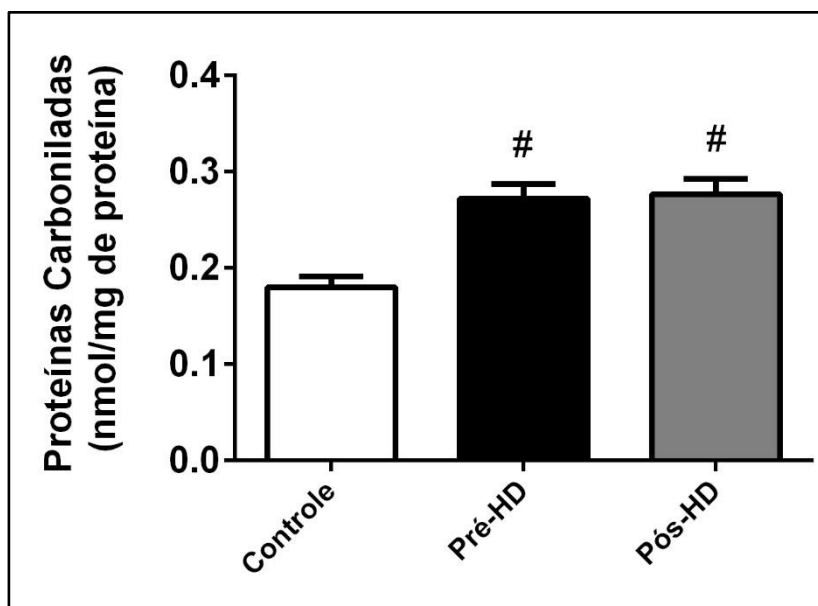
Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

5.2.3 Níveis de proteínas carboniladas

Os níveis de proteínas carboniladas em amostras de soro de indivíduos controle e indivíduos com DRC antes e após a sessão de HD se encontram na Figura 18.

Nota-se um aumento de 51% nos níveis de proteínas carboniladas nas amostras de soro de indivíduos com DRC antes da sessão de HD ($0,272 \pm 0,015$; nmol/mg de proteína) em relação aos valores em indivíduos do grupo controle ($0,180 \pm 0,012$; nmol/mg de proteína). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de proteínas carboniladas quando comparadas as amostras pós-HD ($0,277 \pm 0,016$; nmol/mg de proteína) e amostras pré-HD.

Figura 18. Níveis de proteínas carboniladas (nmol/mg de proteína) no soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

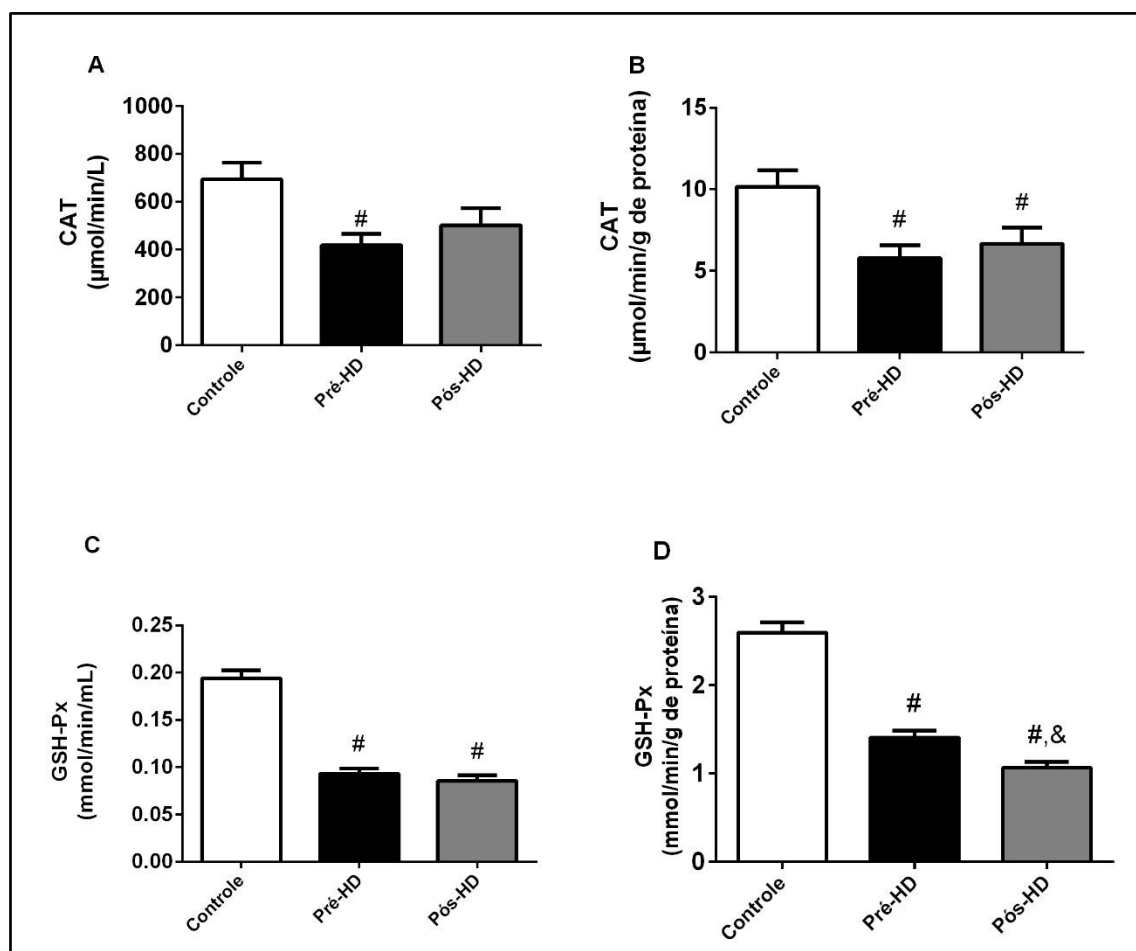
5.3 Atividades das enzimas antioxidantes

As atividades das enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px soro de indivíduos do grupo controle e de indivíduos com DRC, antes e após a sessão de HD, estão apresentadas na Figura 19. Os resultados estão expressos em unidades enzimáticas (Figuras 19 A e C), bem como unidades enzimáticas corrigidas por proteína total (Figuras 19 B e D).

Os resultados podem ser expressos tanto como unidades enzimáticas (atividade da enzima que catalisa a conversão de 1 μmol de substrato em produto por minuto) ou como unidades enzimáticas em razão da massa de proteínas. A correção por grama de proteína total no soro se torna mais adequada, uma vez que há variação na volemia dos indivíduos nas condições antes e após a sessão de HD, condição esta que pode ter impactado na concentração de proteínas séricas, em um mesmo indivíduo.

Nas amostras de soro de indivíduos na condição pré-HD, tanto a atividade de CAT ($5,79 \pm 0,79$; $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) quanto a atividade de GSH-Px ($1,41 \pm 0,08$; $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) estão diminuídas, em 43% e 46%, respectivamente, em relação aos valores encontrados no soro de indivíduos do grupo controle, tanto para CAT ($10,16 \pm 1,02$; $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) quanto para GSH-Px ($2,60 \pm 0,12$; $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína). Não foram observadas diferenças nas atividades de CAT em soro de indivíduos na condição pós-HD, quando comparados aos resultados obtidos na condição pré-HD. Porém, quando se analisa a atividade de GSH-Px, nota-se uma diminuição de 24% na atividade desta enzima em soro de indivíduos pós-HD ($1,07 \pm 0,06$; $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína), em comparação aos resultados obtidos na condição pré-HD.

Figura 19. Atividades da enzima CAT em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ (A) e $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína (B) e da GSH-Px em $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$ (C) e $\text{nmol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína (D) no soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.

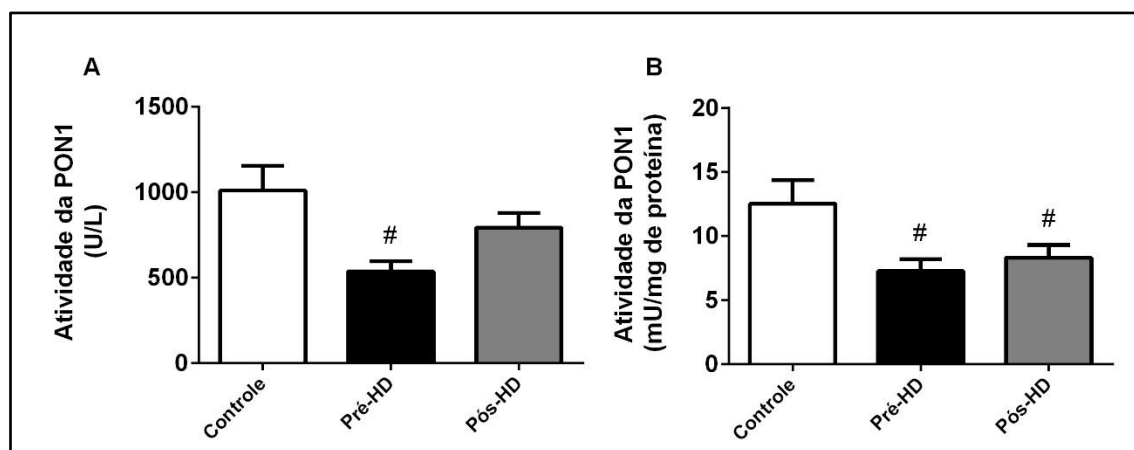


Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

Na Figura 20 estão apresentadas as atividades da enzima PON 1 em amostras de soro de indivíduos dos grupos controle e de indivíduos com DRC antes e após a sessão de HD. Os resultados estão expressos em atividade da PON 1 em U/L (A) e mU/mg de proteína (B).

As amostras de soro de indivíduos com DRC na condição pré-HD ($7,27 \pm 0,93$; mU/mg de proteína) apresentaram uma diminuição de 42% na atividade da PON 1, em comparação aos valores encontrados em soro de indivíduos do grupo controle ($12,52 \pm 1,85$; mU/mg de proteína). Na comparação entre as condições pré-HD *versus* pós-HD, não foram observadas diferenças estatísticas em relação à atividade de PON 1, porém parece haver uma tendência de aumento na atividade da PON 1 no soro de indivíduos com DRC após a sessão de HD ($8,33 \pm 0,96$; mU/mg de proteína).

Figura 20. Atividade da PON 1 em U/L (A) e mU/mg de proteína (B) no soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

5.4 Ensaio de clareamento (*bleaching*) da crocina

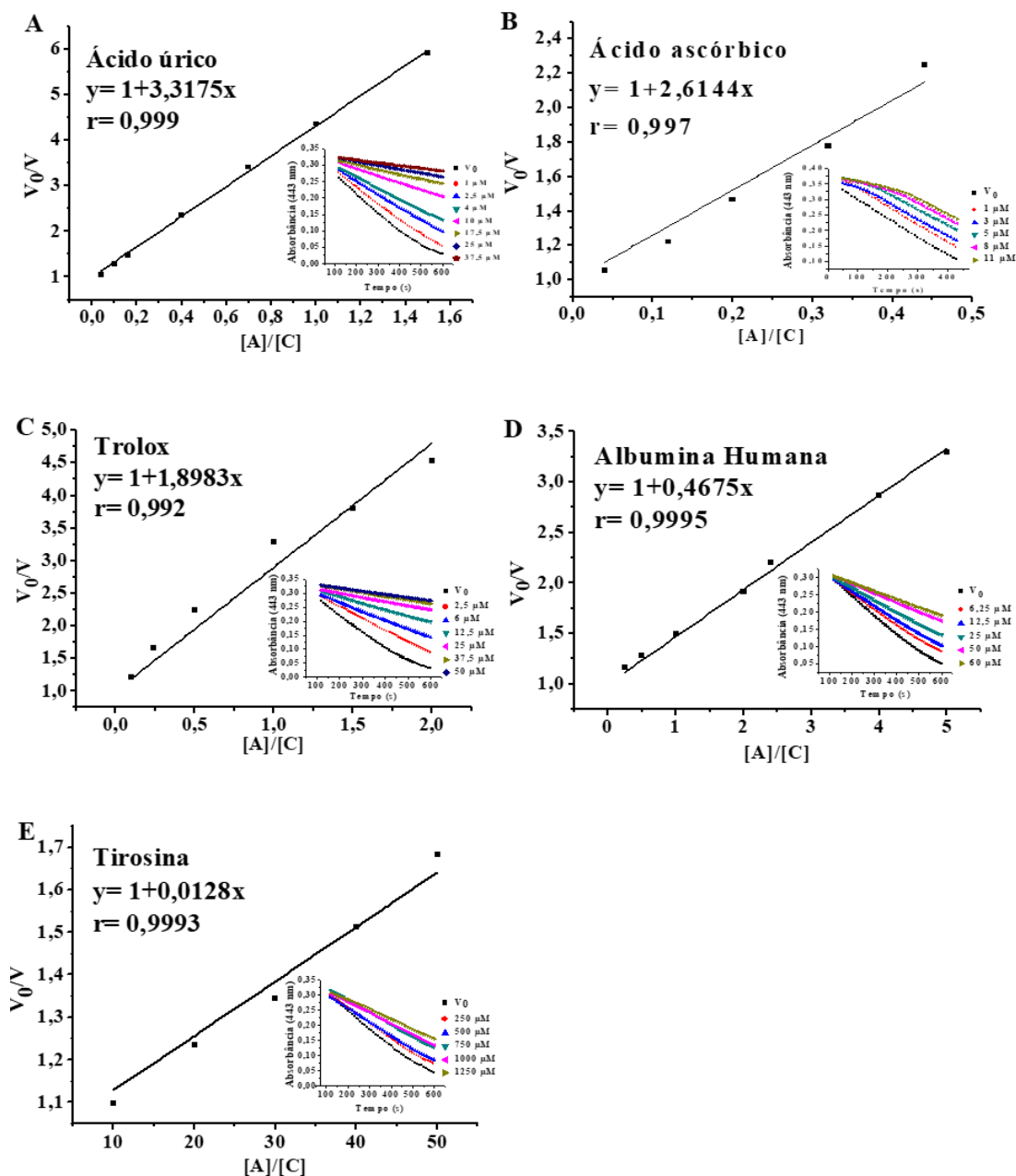
As capacidades de inibição do clareamento da crocina pelos compostos ácido úrico, ácido ascórbico, trolox, albumina humana e tirosina estão apresentadas nas Figuras 21 A, B, C, D e E respectivamente. Essa capacidade foi analisada pela equação cinética de competição:

$$v_0/v = 1 + \text{coeficiente angular} \cdot [A]/[C],$$

v_0 , velocidade na ausência de composto; v , velocidade na presença de composto; $[A]$ concentração do respectivo composto $[C]$, concentração de crocina (25 $\mu\text{mol/L}$); o coeficiente angular da equação dessa reta indica a capacidade relativa do composto sob análise de interagir com os peroxi-radicaís.

Na aplicação dessa análise, observou-se que a inclinação da regressão linear na presença do ácido úrico (Figura 21A) apresentou uma maior redução da velocidade do *bleaching* da crocina, em comparação ao perfil de resposta na presença de ácido ascórbico, trolox, albumina humana e tirosina, ou seja, o ácido úrico apresenta maior capacidade antioxidante.

Figura 21. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina, com ácido úrico (A), ácido ascórbico (B), trolox (C), albumina humana (D) e tirosina (E).



v_0 , velocidade na ausência do composto; v , velocidade na presença do composto; $[A]$ concentração do composto e $[C]$, concentração de crocina (25 $\mu\text{mol/L}$). O gráfico inserido representa a diminuição da absorvância em 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) do composto ($\mu\text{mol/L}$), durante 660 segundos.

Pode-se ainda avaliar a capacidade antioxidante pela porcentagem de inibição do clareamento da crocina pelo ácido úrico, ácido ascórbico, trolox, albumina humana ou tirosina. Assim, pode ser determinado o valor de EC₅₀, ou seja, concentração efetiva que inibiu 50% do clareamento da crocina (Tabela 5). Nessa análise, observa-se também que o ácido úrico é mais eficiente na sua capacidade em proteger a oxidação da crocina, quando comparado com ácido ascórbico, trolox, albumina humana e tirosina. Os valores de EC₅₀ encontrados para os compostos supracitados apresentam como ordem de eficiência valores decrescentes, quanto menor o valor de EC₅₀, maior é a eficácia de sua ação antioxidante, enquanto que para a inclinação da regressão linear pela análise da cinética de competição, quanto maior o valor da inclinação, maior é a eficácia para a capacidade antioxidante (Tabela 5).

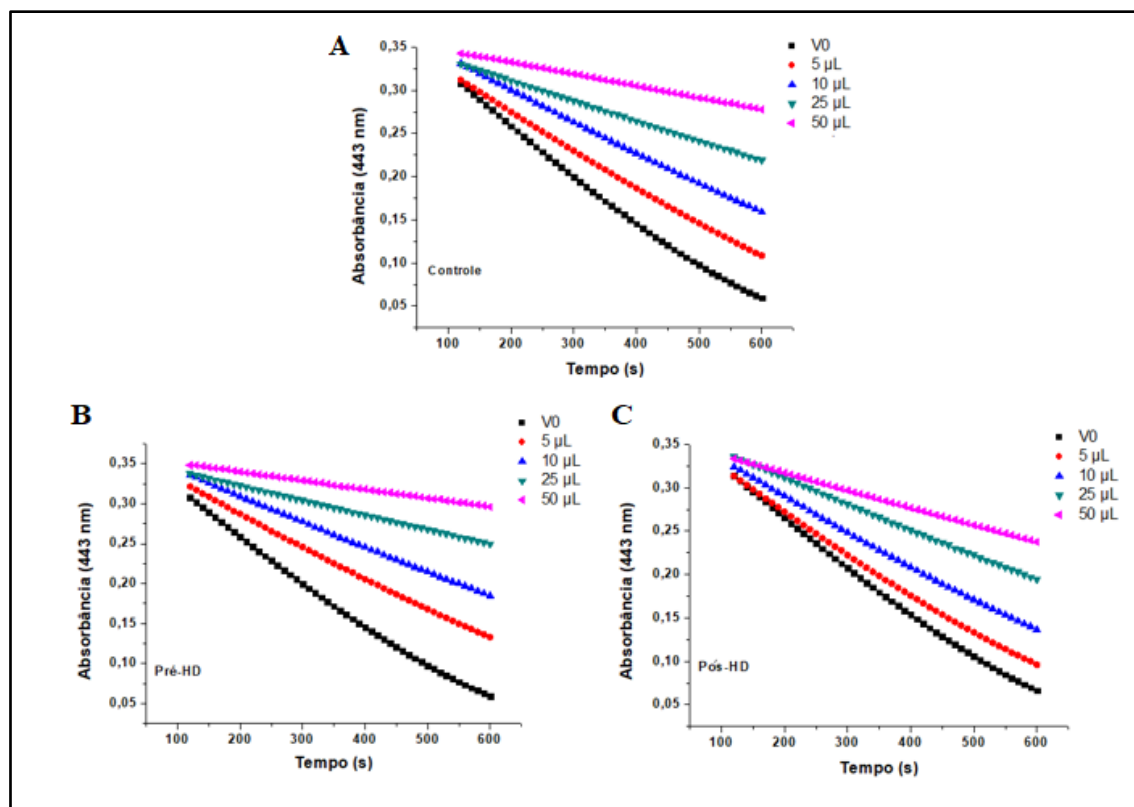
Tabela 5. Comparação entre o EC₅₀ (μM) e a inclinação da regressão linear do urato, ácido ascórbico, trolox, albumina humana e tirosina.

Compostos	EC₅₀ (μM)*	Inclinação da regressão linear**
Ácido úrico	8,20	3,3739
Ácido ascórbico	9,34	2,6144
Trolox	10,97	1,8983
Albumina humana	52,74	0,4675
Tirosina	*** <i>Nihil</i>	0,0128

*Valores de EC₅₀, em ordem decrescente de eficiência, obtidos através da equação: %In = $(1 - (\Delta v / \Delta v_0)) \times 100$; **Valores da inclinação da regressão linear, em ordem decrescente de eficiência; *** Não foi observado valor de EC₅₀ até 1250 μM.

A Figura 22 apresenta de forma representativa (um paciente de cada grupo) a queda na absorbância da crocina (em 443 nm) em função do tempo, na presença das amostras de soro de um indivíduo: indivíduo controle (Figura 22A), indivíduo com DRC antes (Figura 22B) e após (Figura 22C) a sessão de HD. Nesta análise, observa-se que foram utilizados diferentes volumes de soro a fim de se obter diferentes porcentagens de inibição do clareamento da crocina e assim, determinar o volume efetivo que inibe 50% do clareamento da crocina, ou seja, o “EV₅₀” de cada amostra.

Figura 22. Ensaio de clareamento da crocina com diferentes volumes de soro, de indivíduo do grupo controle (A) e de indivíduo com DRC, pré-HD (B) e pós-HD (C).



Diminuição da absorbância em 443 nm da crocina em função do tempo, na ausência (v_0) e presença de diferentes volumes de soro (5, 10, 25 e 50 μL) de indivíduos do grupo controle e de indivíduos com DRC antes e após a sessão de HD, durante 660 segundos.

Para analisar o efeito das amostras pela cinética de competição e considerando a mistura complexa de compostos antioxidantes encontrada no soro humano, nessa etapa optamos pela utilização do volume de amostras de soro como parâmetro de comparação.

Na Tabela 6, estão apresentadas as médias dos valores de “ EV_{50} ” (μL) de soro, ou seja, o volume das amostras de soro do grupo controle e dos indivíduos com DRC, antes e após a HD, que inibiram o clareamento da crocina em 50%. Observa-se que as amostras pré-HD apresentaram menor “ EV_{50} ”, assim mostraram uma capacidade antioxidante maior, em comparação ao grupo controle e ao grupo pós-HD, uma vez que, com menor volume de soro, atingiu-se o “ EV_{50} ” para o ensaio da crocina.

Tabela 6. Valores médios de “EV₅₀” em volume (μL) de soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.

Amostras	“EV₅₀” (μL)*	Inclinação da regressão linear
Controle	29,05 ± 1,48	0,3389
Pré-HD	15,76 ± 1,38 [#]	0,5222
Pós-HD	38,07 ± 1,92 ^{#, &}	0,2243

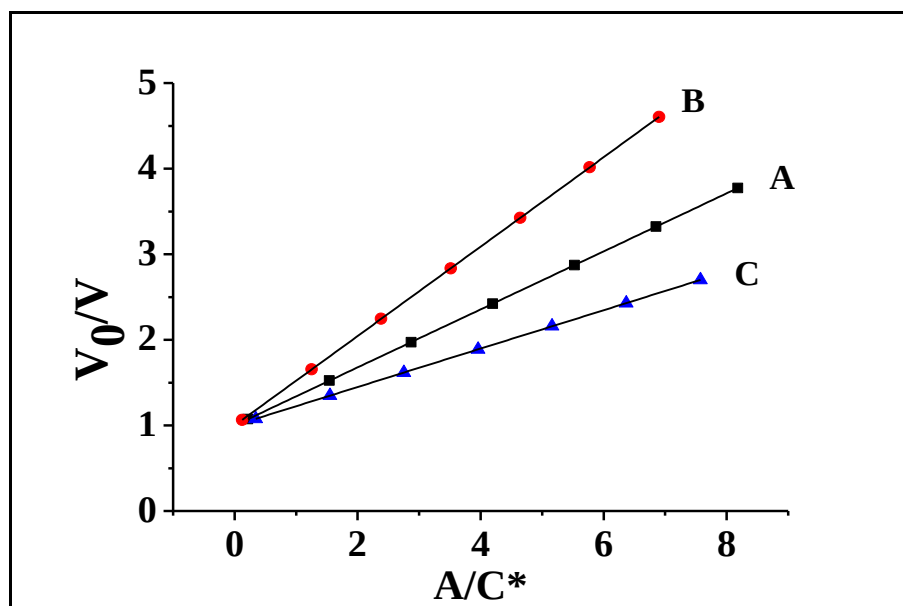
Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), n = 80.

*Valores de “EV₅₀”, em ordem decrescente de eficiência, obtidos através da equação: %I = (1 - ($\Delta v / \Delta v_0$)) x 100. As diferenças entre os grupos foram consideradas com p<0,05. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

Na Figura 23 está apresentada a relação entre a razão das velocidades *versus* a razão da fração de volumes de soro e da crocina, entre os grupos estudados. Essas curvas foram construídas com intervalo de valores das razões de velocidades (v_0/v) e a tangente média de cada grupo (Tabela 6). Os valores da razão entre as concentrações de antioxidantes presentes no soro pela concentração de crocina, foram substituídos pelas respectivas frações de volumes do soro e a fração de volume da crocina, representados nessa figura por A/C, permitindo a análise de competição cinética. Esse procedimento também foi aplicado para o trolox (para o qual conhecemos a sua concentração, bem como, a fração de volume utilizada no ensaio) e observamos o mesmo comportamento quando se utiliza a análise por concentração.

Nessa análise verifica-se um comportamento linear dentro de cada grupo de indivíduos (grupo controle e grupo DRC antes e após a sessão de HD). Uma vez que essas retas foram construídas a partir das médias dos valores de coeficientes angulares apresentados na Tabela 6, evidentemente também se observa que os indivíduos pré-HD apresentaram cinéticas coerentes com a inclinação, portanto, demonstrando maior capacidade antioxidante no soro, quando comparado com os indivíduos do grupo controle e indivíduos pós-HD.

Figura 23. Curvas representativas construídas com intervalo de valores das razões de velocidades (v_0/v) e a tangente média de cada grupo, obtendo assim as respectivas frações de volumes de soro. Os valores das frações de volumes de soro utilizados foram divididos pela fração de volume da crocina para obter um parâmetro substituto para o A/C. Indivíduos do grupo controle (A), e de indivíduos com DRC, antes (B) e após (C) a sessão de HD.



[A] fração de volume de soro e [C], fração de crocina. v_0 , ausência de soro e v , presença de soro, nos ensaios de clareamento da crocina. *A/C representa nessa figura a razão entre as frações de volume de soro e a fração de volume da crocina.

5.5 Ensaio de captura do cátion radical ABTS^{•+}

Para a expressão dos resultados dos compostos (padrões) utilizados neste ensaio, foi calculado o EC₅₀, isto é, a concentração efetiva do composto capaz de capturar 50% dos radicais ABTS^{•+} presentes na reação. Assim, quanto menor o EC₅₀, menor a concentração do composto necessária para neutralizar 50% do radical ABTS^{•+}, portanto, apresenta maior capacidade antioxidante.

Na Figura 24 e na Tabela 7 estão apresentados, em ordem crescente, os valores de EC₅₀ (μM) da tirosina, trolox, ácido úrico, ácido ascórbico, albumina humana e cisteína. Os gráficos inseridos representam a média das absorbâncias (em 734 nm) do ABTS^{•+} na presença de diferentes concentrações dos compostos supracitados.

Dentre os compostos utilizados, a tirosina mostrou-se mais eficiente na captura do radical ABTS^{•+}, apresentando EC₅₀ de 2,69 μM, seguido do trolox (15,03 μM), ácido úrico (15,78 μM), ácido ascórbico (17,74 μM), albumina humana (19,32 μM) e cisteína (32,12 μM).

Figura 24. Inibição (captura) do cátion radical ABTS^{++} pela tirosina (A), trolox (B), ácido úrico (C), ácido ascórbico (D), albumina humana (E) e cisteína (F).

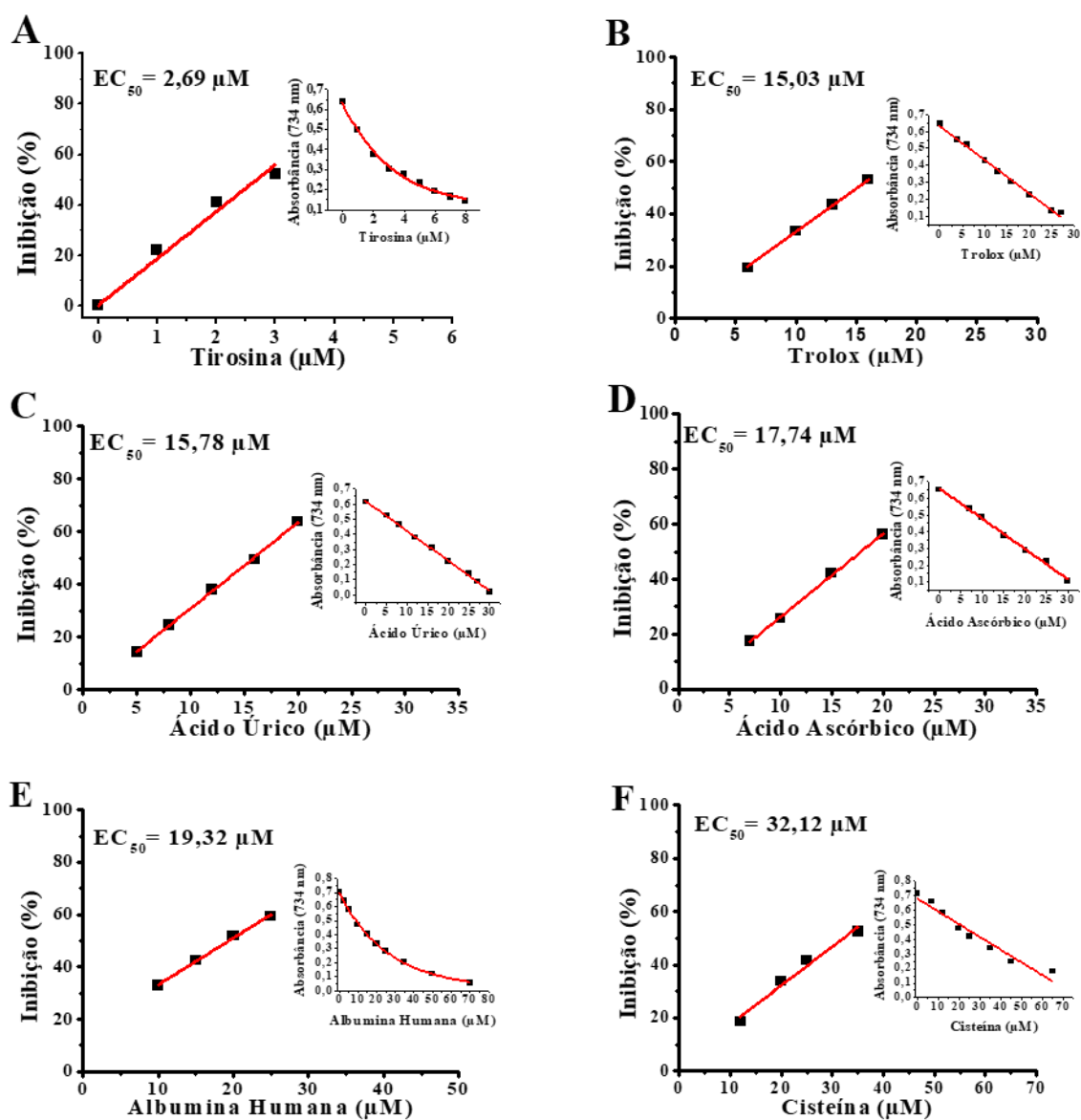


Tabela 7. Capacidade de captura do cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ expresso em concentração efetiva EC_{50} (μM).

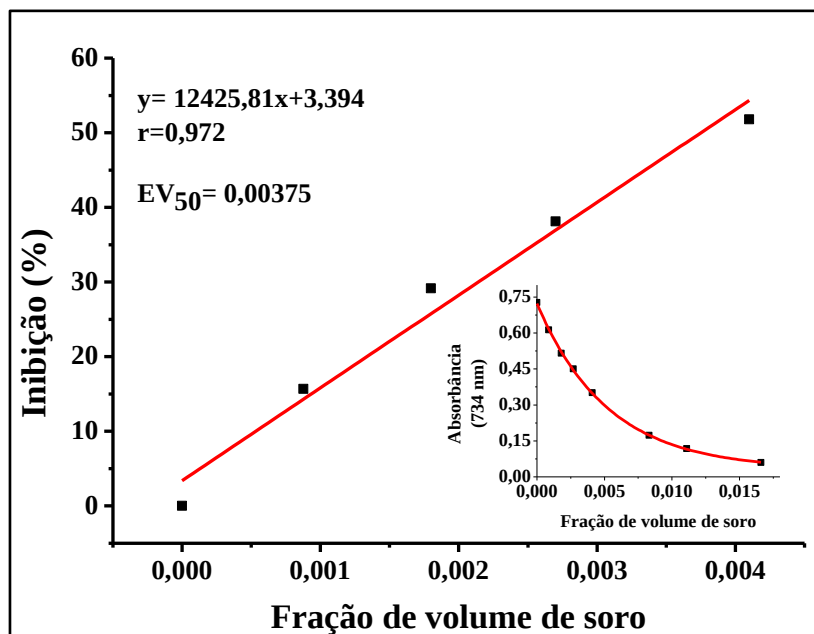
Compostos	EC_{50} (μM)*
Tirosina	2,69
Trolox	15,03
Ácido úrico	15,78
Ácido ascórbico	17,74
Albumina humana	19,32
Cisteína	32,12

*Valores de EC_{50} , em ordem decrescente de eficiência, obtidos através da equação: $\% \text{In} = (1 - (\Delta a / \Delta t)) \times 100$.

Na Figura 25, está apresentada, de forma representativa, a porcentagem de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pela fração de volume (diferentes diluições da amostra na reação) de soro de um indivíduo. Para verificar o “ EV_{50} ”, ou seja, o volume de amostra necessário para inibir 50% do $\text{ABTS}^{\bullet+}$, foi analisada a região linear da curva do gráfico inserido.

O gráfico inserido (Figura 25) representa a média das absorbâncias (em 734 nm) do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ em diferentes frações do volume de soro. Nota-se que quanto mais diluído o soro, maior é a absorbância do radical e, portanto, menor capacidade da amostra (soro) em capturar o $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

Figura 25. Representação de inibição (captura) do cátion radical ABTS^{++} com diferentes diluições do soro de um indivíduo.



Uma forma de expressar os resultados da capacidade antioxidante de uma amostra é pela comparação com compostos padrões. O trolox é comumente utilizado como composto padrão, e esses resultados são expressos em capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC – *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), ou seja, a concentração equivalente ao trolox (μmol) necessária para fornecer a mesma capacidade antioxidante em um determinado volume de amostra.

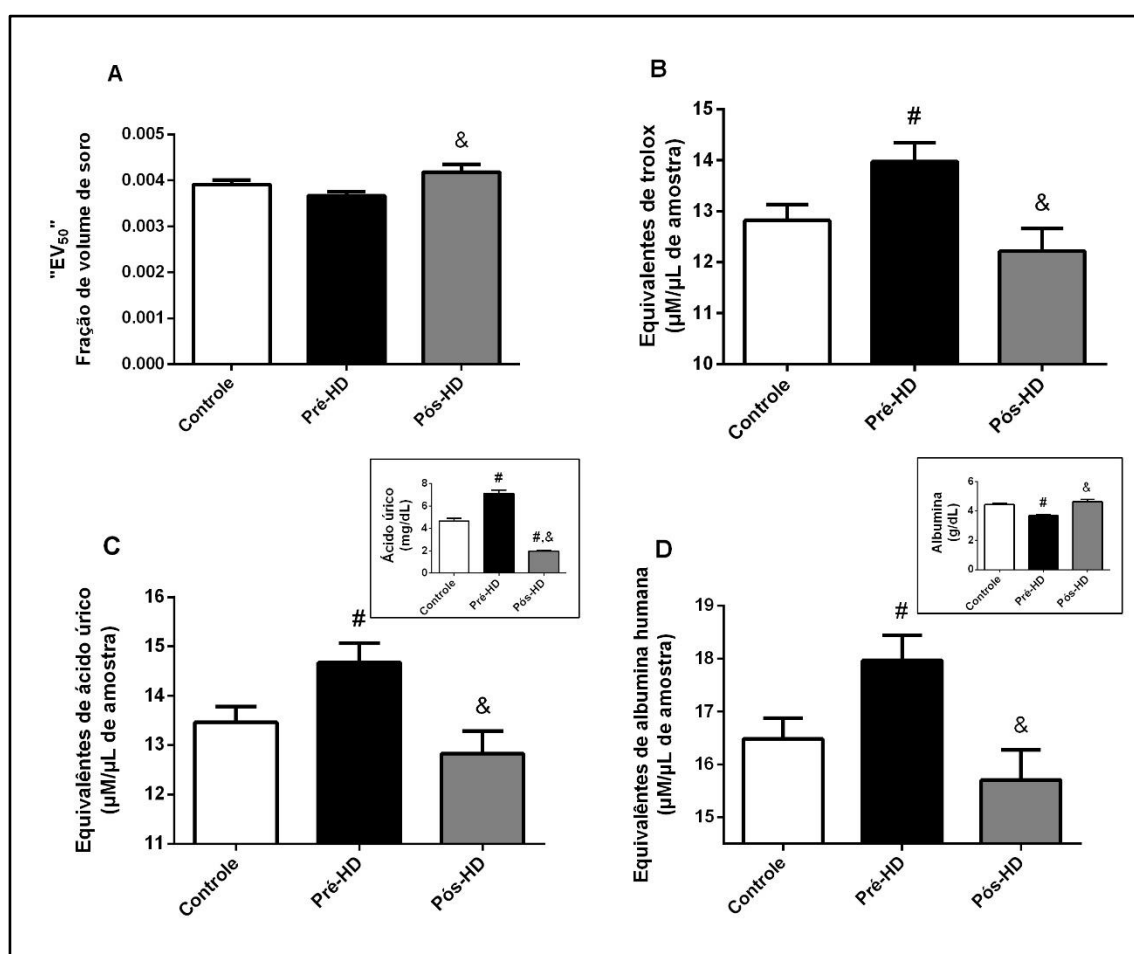
Visto que o soro humano contém muitas moléculas antioxidantes endógenas, pode-se também expressar os resultados em equivalente dessas biomoléculas, tais como o ácido úrico ou a albumina humana.

Na Figura 26A está apresentado o “ EV_{50} ” da fração de volume de soro dos indivíduos do grupo controle e dos indivíduos com DRC, antes e após uma sessão de HD. Não foram observadas diferenças significativas entre as amostras de indivíduos do grupo controle e de indivíduos pré-HD ($0,00391 \pm 0,00010$; $0,00367 \pm 0,00010$, respectivamente), no entanto, após a sessão de HD ($0,00418 \pm 0,00017$) houve um aumento de 14% no “ EV_{50} ”, quando comparado com as amostras pré-HD.

Observa-se na Figura 26 (B, C e D) e Tabela 8 que as amostras de soro de indivíduos com DRC pré-HD apresentaram maior equivalência ao trolox, ácido úrico e

albumina humana em comparação com o soro dos indivíduos do grupo controle. Após a sessão de HD houve uma diminuição na equivalência ao trolox, ácido úrico e albumina humana em comparação com as amostras de soro de indivíduos pré-HD.

Figura 26. Representação do “EV₅₀” (A), equivalentes de trolox ($\mu\text{M}/\mu\text{L}$ de amostra) (B), equivalentes de ácido úrico ($\mu\text{M}/\mu\text{L}$ de amostra) (C) e equivalentes de albumina humana ($\mu\text{M}/\mu\text{L}$ de amostra) (D) no ensaio de captura do ABTS⁺⁺ das amostras de soro dos indivíduos do grupo controle e dos indivíduos com DRC, antes e após a sessão de HD.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

Tabela 8. Equivalentes de trolox, ácido úrico e albumina humana no ensaio de captura do ABTS^{•+} das amostras de soro dos indivíduos do grupo controle e dos indivíduos com DRC, antes e após a sessão de HD.

	Equivalentes em $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ de amostra		
Amostras	Trolox	Ácido úrico	Albumina humana
Controle	12,82 $\pm$ 0,31	13,46 $\pm$ 0,32	16,48 $\pm$ 0,40
Pré-HD	13,98 $\pm$ 0,37 [#]	14,67 $\pm$ 0,39 [#]	17,97 $\pm$ 0,48 [#]
Pós-HD	12,22 $\pm$ 0,44 ^{&}	12,83 $\pm$ 0,46 ^{&}	15,71 $\pm$ 0,56 ^{&}

Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), n = 80. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $<0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

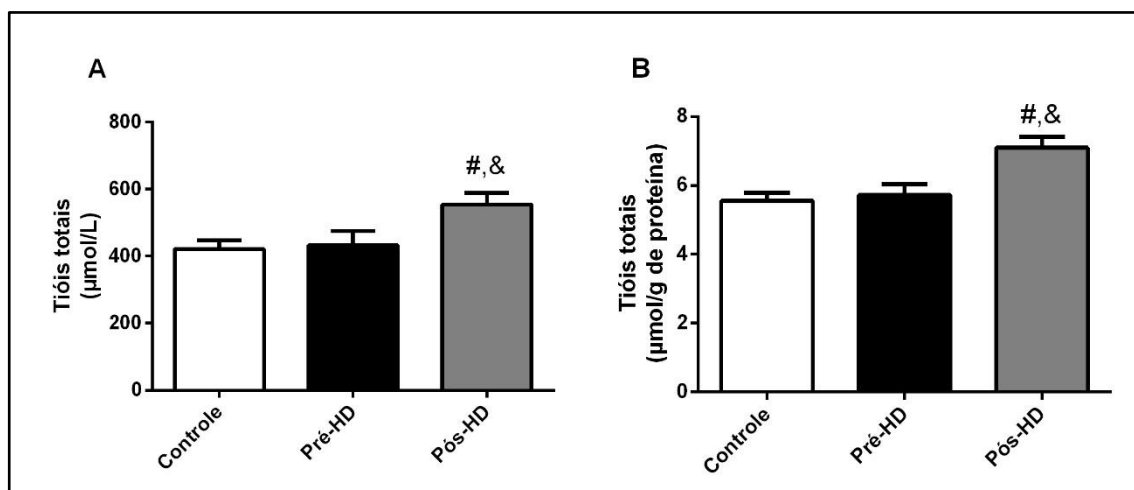
Ainda é possível notar na Figura 26 B, C e D que a equivalência ao trolox, ácido úrico e albumina humana apresentam o mesmo perfil de resposta, ou seja, as amostras de soro na condição pré-HD apresentam uma maior equivalência aos compostos, quando comparados ao grupo controle e as amostras de soro na condição pós-HD. O perfil de resposta entre a concentração sérica de ácido úrico e a equivalência ao ácido úrico são similares nos grupos estudados. Contudo, pode-se observar que as concentrações séricas de albumina e a equivalência à albumina humana não seguem este mesmo perfil; nota-se que houve um aumento significativo nos níveis de albumina nas amostras de soro de indivíduos pós-HD e uma diminuição na equivalência à albumina humana nas amostras de soro pós-HD.

5.6 Determinação da concentração de grupos tióis totais

Na Figura 27 estão apresentados os níveis séricos de tióis totais em amostras de indivíduos dos grupos controle e de indivíduos com DRC, antes e após a sessão de HD. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol/L}$ (A) e $\mu\text{mol/g}$ de proteína (B).

Os indivíduos do grupo controle apresentaram níveis séricos de tióis totais ($5,55 \pm 0,24 \mu\text{mol/g}$ de proteína) semelhantes aos valores observados em indivíduos com DRC na situação pré-HD ($5,72 \pm 0,32 \mu\text{mol/g}$ de proteína). Ao final da sessão de HD, foi observado um aumento de 24% nos níveis séricos de tióis totais em indivíduos pós-HD ($7,09 \pm 0,32 \mu\text{mol/g}$ de proteína) em comparação as amostras de soro pré-HD.

Figura 27. Níveis de tióis totais em $\mu\text{mol/L}$ (A) e $\mu\text{mol/g}$ de proteína (B) no soro de indivíduos do grupo controle e indivíduos com DRC antes e após a HD.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 80$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o grupo controle; &, diferenças com o grupo pré-HD.

6 DISCUSSÃO

A DRC encontra-se relacionada com a redução na capacidade de excreção de diversos solutos e metabólitos pelos rins, e estes acabam se acumulando no sangue. Várias alterações bioquímicas são observadas nos indivíduos com DRC; assim, aumentos nos níveis séricos de creatinina, ureia e ácido úrico, juntamente com o desequilíbrio de eletrólitos, são exemplos destas alterações (BAGALAD et al., 2017; MERZAH; HASSON, 2015). A diminuição da função renal resulta em aumento nos níveis séricos de creatinina, devido à incapacidade dos rins em filtrar este composto nitrogenado (MERZAH; HASSON, 2015). Tal como esperado, nossos resultados indicam que os indivíduos com DRC, antes da HD, apresentaram níveis elevados de creatinina no soro, bem como de ureia e ácido úrico, coerentes com uma situação de disfunção renal.

A retenção de resíduos orgânicos, também chamados de “toxinas urêmicas” ou “solutos de retenção urêmica”, se elevam gradualmente no sangue de acordo com a progressão da DRC, e estes interagem negativamente com todas as funções biológicas, e com isso ocorre o surgimento dos sintomas da síndrome urêmica (BARRETO et al., 2014). As toxinas urêmicas são classificadas de acordo com suas características físico-químicas e de acordo com a capacidade de remoção pela diálise em 3 grupos: *pequenos solutos solúveis em água* (<500 Da), *moléculas de tamanho médio* (≥ 500 Da) e *solutos ligados às proteínas* (maioria < 500 Da). Em relação aos *pequenos solutos solúveis em água* podemos citar: ureia, creatinina, ácido úrico, dimetil arginina assimétrica (ADMA), n-óxido de trimetilamina (TMAO) e dimetil arginina simétrica (SDMA). As *moléculas de tamanho médio* englobam: β_2 -microglobulina, endotelina, peptídeo natriurético atrial (ANP), lipídeos e lipoproteínas, interleucinas, imunoglobulinas de cadeia leve e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Já os *solutos ligados às proteínas* podem ser os seguintes: AGEs, homocisteína, indoxil sulfato e p-cresil sulfato (FUJII; GOTO; FUKAGAWA, 2018).

A ureia está entre os solutos de retenção urêmica de maior concentração no sangue, nos indivíduos urêmicos (GLORIEUX; TATTERSALL, 2015). De fato, nossos resultados mostram níveis de ureia cerca de 4,5 vezes maiores no soro de indivíduos com DRC antes da sessão de HD, em comparação aos valores em soro dos indivíduos do grupo controle. A taxa de remoção da ureia pela HD é elevada, pois ela se difunde

rapidamente tanto das hemácias (devido à alta permeabilidade da ureia através das membranas eritrocitárias) quanto do plasma (MEYER; HOSTETTER, 2014; SCHNEDITZ; PLATZER; DAUGIRDAS, 2009). Tanto a creatinina quanto a ureia tiveram os seus níveis séricos reduzidos após a sessão de HD. Vaziri e colaboradores (2017), ao analisarem os níveis de creatinina e ureia no soro de indivíduos com DRC antes e após a sessão de HD, também encontraram o mesmo perfil, ou seja, amostras de soro de indivíduos pré-HD apresentavam um aumento nos níveis séricos de creatinina e ureia em relação ao grupo controle, e uma sessão de HD foi capaz de reduzir significativamente seus níveis séricos.

O ácido úrico é excretado principalmente pelos rins. Como uma consequência de redução na taxa de filtração glomerular, podem ser observadas altas concentrações de ácido úrico no soro. Nossos resultados mostraram um aumento de 63% nos níveis séricos de ácido úrico em indivíduos com DRC na condição pré-HD, quando comparados aos valores encontrados em indivíduos do grupo controle. Porém, os valores encontrados de ácido úrico no soro dos indivíduos pré-HD ainda estão dentro dos intervalos de referência, de 2,5 a 6,2 mg/dL recomendado para as mulheres, e de 3,5 a 8,5 mg/dL recomendado para os homens.

Vários fatores estão relacionados com a hiperuricemia, incluindo ingestão de dietas ricas em purinas, ingestão de álcool, obesidade e síndrome metabólica em decorrência da resistência à insulina, efeitos da insulina na redução da excreção urinária de urato e fatores genéticos como a nefropatia hiperuricêmica familiar juvenil (caracterizada pela redução na excreção urinária de ácido úrico). Agentes que diminuem as concentrações séricas de uratos, tais como alopurinol e febuxostat, podem ser recomendados para o tratamento de condições relacionadas aos aumentos nos níveis circulantes de ácido úrico (JOHNSON et al., 2013). Assim como a creatinina e a ureia, o ácido úrico também é facilmente removido durante o tratamento dialítico. Tal como foi observado na Figura 3C, amostras de soro de indivíduos com DRC e na condição pós-HD apresentaram uma diminuição de 72% nos níveis de ácido úrico.

Outro biomarcador frequentemente analisado em indivíduos com DRC é o potássio, pois a hipercalemia (aumento nos níveis de potássio no sangue acima de 5,1 mmol/L) tem sido associada com o aumento das taxas de mortalidade destes indivíduos, devido aos seus efeitos pró-arritmogênicos (NAKHOUL et al., 2015).

Fatores relacionados à hipercalemia incluem doença renal, idade, acidose metabólica, fármacos como inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) e diuréticos poupadores de potássio (THOMSEN et al., 2018). Por outro lado, a hipocalemia (diminuição nos níveis de potássio no sangue abaixo de 3,5 mmol/L) pode ocorrer devido ao aumento na excreção ou ingestão inadequada de potássio, ou devido ao deslocamento de potássio para os compartimentos intracelulares. Indivíduos com hipocalemia geralmente são assintomáticos, mas podem apresentar fraqueza muscular, distúrbios no ritmo cardíaco e morte súbita cardíaca (CHOI; HA, 2013).

Nossos resultados indicam que os níveis séricos de potássio estão aumentados nos indivíduos com DRC na condição pré-HD, em comparação com os valores encontrados no grupo controle. No entanto, os níveis séricos de potássio ainda estão dentro do intervalo de referência, de 3,5 a 5,1 mmol/L. Após a sessão de HD, houve uma redução de 27% nos níveis séricos de potássio nos indivíduos com DRC.

No presente estudo, dos 40 indivíduos analisados e que possuem DRC e estão sob tratamento dialítico, 22 possuem DM (tipo 1 ou tipo 2) como comorbidade. O DM é uma das principais causas que leva à DRET. Aproximadamente 40% dos indivíduos com DM tipo 1 ou tipo 2 desenvolvem DRC (PERKOVIC et al., 2016). A principal característica do DM é a manutenção da hiperglicemia por longos períodos, devido aos prejuízos na produção pancreática de insulina e/ou nas ações da insulina nos tecidos alvo, e está associada ao desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares, redução da qualidade de vida e contribui com altas taxas de mortalidade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

A coleta das amostras de sangue dos indivíduos com DRC foi realizada sem a necessidade de jejum, a fim de evitar complicações decorrentes da falta de ingestão de alimentos após o início da sessão de HD (incluindo hipoglicemia). Assim, observamos altos níveis de glicose no soro dos indivíduos que não apresentam DM como comorbidade, pelo fato deles se alimentarem antes e durante o procedimento dialítico. Ambos os indivíduos com DRC, com ou sem DM, apresentaram uma redução nos níveis de glicose após uma sessão de HD.

Estudos têm avaliado a ocorrência de episódios de hipoglicemia em indivíduos com DRC durante a HD devido à ausência de glicose na solução de diálise (dialisato) e os impactos da remoção deste monossacarídeo pela HD. No entanto, o uso de dialisato

com glicose reduz significativamente o surgimento de hipoglicemia intradialítica. Burmeister e colaboradores (2012) estudaram indivíduos com DRC distribuídos em 3 grupos, de acordo com o tipo de dialisato utilizado durante a HD: (i) dialisato sem glicose; (ii) dialisato contendo 55 mg/dL de glicose; (iii) dialisato contendo 90 mg/dL de glicose. Os indivíduos os quais durante a HD foram utilizados o dialisato sem glicose ou dialisato com 55 mg/dL de glicose tiveram episódios de hipoglicemia. No entanto, os indivíduos os quais durante a HD utilizou-se o dialisato contendo 90 mg/dL de glicose, estes não apresentaram aumento na glicemia, bem como houve redução na incidência de hipoglicemia durante a HD. Indivíduos com baixos níveis séricos de glicose e que não se alimentam durante a HD, ou que estão fazendo uso de agentes antidiabéticos (em especial a insulina) devem realizar a HD com dialisato contendo glicose, pois caso contrário podem apresentar episódios de hipoglicemia devido à remoção dialítica do monossacarídeo (JACKSON et al., 2000).

A dosagem de proteína total no soro contribui com informações importantes sobre o estado geral de um indivíduo; no caso de DRC, pode ser utilizada como exame complementar no diagnóstico da insuficiência renal e nefrose (BERTHOLF, 2014). Já o fracionamento de proteínas totais também apresenta dados clinicamente úteis. Os valores normais de proteína total no soro encontram-se entre 6,3 a 8,2 g/dL, e os níveis de albumina encontram-se entre 3,5 a 5,0 g/dL. A albumina constitui mais da metade da quantidade de proteína total no soro, e possui várias funções no organismo: regula a passagem de água e solutos através dos capilares sanguíneos, realiza o transporte de hormônios, vitaminas, bilirrubina e fármacos. Aumentos nos níveis séricos de albumina podem ocorrer devido à desidratação aguda, enquanto que sua diminuição pode ser causada por doença hepática em estágio terminal, má absorção intestinal, desnutrição proteica e síndrome nefrótica (WALKER; HALL; HURST, 1990).

Apesar de os valores séricos de proteína total e de albumina em amostras de soro de indivíduos com DRC antes da HD estarem menores do que os valores observados em soro de indivíduos controle, tais valores ainda permaneceram dentro dos intervalos de referência. Esta discreta diminuição nos valores de proteína total e de albumina em soro de indivíduos pré-HD pode ser devido à retenção de água e consequentemente hemodiluição de componentes, como consequência da retenção de líquidos comumente observada em indivíduos com DRC.

Em concordância com nossos resultados, Kubrusly e colaboradores (2012) observaram um aumento nas concentrações séricas de albumina em amostras de soro de indivíduos com DRC pós-HD, correlacionando este aumento com a remoção de líquidos pela sessão de HD. Os autores avaliaram 20 pacientes pré-HD que apresentavam hipoalbuminemia; após a sessão de HD, houve uma correção do estado de hidratação em 11 pacientes, impactando nos níveis séricos de albumina, que foram aumentados.

Na análise do perfil lipídico, os níveis de triglicerídeos em soro de indivíduos com DRC na condição pré-HD apresentaram uma tendência a aumento, em relação aos valores observados no grupo controle, porém sem diferenças estatísticas. Também não foram observadas diferenças nos níveis de triglicerídeos no soro de indivíduos com DRC na condição pré-HD *versus* pós-HD. A hipertrigliceridemia é o principal componente da dislipidemia observada nos indivíduos com DRC em diálise. Os triglicerídeos são principalmente encontrados no soro nas lipoproteínas quilomícron e VLDL; estas lipoproteínas possuem a função primária de transportar os triglicerídeos para vários órgãos, permitindo que sejam oxidados (ácidos graxos) para a geração de energia e/ou para que sejam armazenados. As lipoproteínas ricas em triglicerídeos se acumulam em indivíduos urêmicos devido a um aumento na produção destas lipoproteínas, bem como ocorre uma diminuição no seu catabolismo em razão da redução na atividade da lipase lipoproteica e da lipase hepática (realiza a hidrólise de fosfolípidos e de triglicerídeos presentes na LDL e na HDL) (CHEUNG, 2009). A heparinização frequente em indivíduos hemodialisados e o hiperparatireoidismo secundário são postulados como participantes dos mecanismos que causam diminuição nas atividades destas lipases de lipoproteínas (KWAN et al., 2007).

Os níveis séricos de colesterol total e de colesterol-LDL estão diminuídos em indivíduos com DRC na condição pré-HD, quando comparados com os valores encontrados no grupo controle. Todavia, ambos os grupos apresentam valores de colesterol total e de colesterol-LDL dentro dos valores de referência, sendo colesterol total em nível desejável quando < 200 mg/dL, e colesterol-LDL considerado ótimo quando < 80 mg/dL. Após a sessão de HD, foi possível observar um aumento nas concentrações destes biomarcadores, porém estes novamente ainda permaneceram dentro dos valores de referência. Este aumento nos níveis séricos de colesterol total e de colesterol-LDL na condição pós-HD pode ser resultado das lipoproteínas não

ultrapassarem as membranas de diálise, em combinação com o efeito de hemoconcentração (devido à remoção de líquidos) que pode estar ocorrendo logo após a sessão de HD.

Em relação aos níveis de colesterol-HDL, as amostras de soro dos indivíduos com DRC na condição pré-HD apresentam concentrações de colesterol-HDL abaixo dos valores de referência (ideal ≥ 40 mg/dL). Tal como relatado nas dosagens de proteína total e albumina, bem como nas dosagens de colesterol total e na estimativa de colesterol-LDL, os níveis de colesterol-HDL no soro de indivíduos com DRC após uma sessão de HD também apresentaram um aumento significativo, tanto que os valores médios ficaram em níveis de 54,4 mg/dL, isto é, acima do valor de referência. Sugerimos que este aumento nos níveis de colesterol-HDL nas amostras de soro de indivíduos na condição pós-HD aconteceu devido à retenção dessa lipoproteína pelas membranas de diálise por causa do seu tamanho, em combinação com o efeito de hemoconcentração.

Indivíduos com DRC tendem a apresentar alterações na lipoproteína HDL, tanto na quantidade e qualidade como também no tamanho e na densidade destas lipoproteínas (BOER; BRUNZELL, 2014). Holzer e colaboradores (2011) também relatam perda da funcionalidade da HDL quanto aos seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes em pacientes submetidos ao tratamento dialítico, como consequência das alterações na composição proteica e lipídica da HDL. Marsche e colaboradores (2009) comentam que os produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) no plasma são capazes de interferirem na depuração da HDL, ao se ligarem ao receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI). SR-BI auxilia no processo de transporte reverso do colesterol e está presente na estrutura da lipoproteína HDL; ao serem modificadas estruturalmente por produtos de oxidação, SR-BI contribui para a inibição da captação de colesterol e triglicerídeos, aumentando o risco de DCV.

Em conformidade com os nossos resultados, Al-Rashid e colaboradores (2004) analisaram amostras de soro de indivíduos com DRC nas condições pré-HD e pós-HD, sem jejum, com ênfase na determinação dos níveis de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL e triglicerídeos. Os autores observaram um aumento significativo nos níveis de colesterol total, colesterol-LDL e colesterol-HDL nas amostras de indivíduos na condição pós-HD, e comentaram que este aumento talvez não seja devido somente à

hemoconcentração causada pela remoção de líquidos durante a HD, pois os níveis de glicose e urato estavam diminuídos (isto é, solutos pequenos e dialisáveis). Assim, os autores relatam que a retenção seletiva das lipoproteínas de alto peso molecular pelas membranas de diálise pode ter sido também importante para promover um aumento nos níveis de apolipoproteínas, devido à retenção de lipoproteínas.

A determinação de TBARS é muito utilizada para o monitoramento da peroxidação lipídica. A metodologia para a análise de TBARS permite a quantificação de diversos produtos de lipoperoxidação, incluindo a análise dos níveis totais de MDA, tanto o MDA livre quanto o MDA ligado aos grupos -SH e -NH₂ de proteínas, ácidos nucleicos e lipoproteínas (VECCHI et al., 2009).

Nossos resultados indicam um aumento significativo nos níveis de TBARS no soro de indivíduos com DRC na condição pré-HD, em comparação ao grupo controle. Tal resultado era esperado, uma vez que a DRC é sabidamente uma condição promotora de estresse oxidativo (MODARESI; NAFAR; SAHRAEI, 2015), sendo os níveis de TBARS indicativos de peroxidação lipídica.

Vários fatores podem contribuir para a promoção do estresse oxidativo e assim aumento da peroxidação lipídica na DRC, tais como: patologias associadas com a DRC (diabetes mellitus e hipertensão arterial), acúmulo de toxinas urêmicas (LIAKOPOULOS et al., 2017), excesso de ferro agindo como pró-oxidante (a suplementação de ferro é recomendada para estes indivíduos, devido a anemia como uma complicação comum à DRC) (PEDRUZZI et al., 2015) e também a própria HD como contribuinte para o estresse oxidativo.

Ao final de uma sessão de HD, observamos que os níveis séricos de TBARS em soro de indivíduos com DRC na condição pós-HD reduziram em cerca de 28%, em comparação com os níveis séricos na condição pré-HD. Confirmando os nossos resultados, Khaira e colaboradores (2011) também observaram um aumento significativo nos níveis de TBARS em amostras de soro de indivíduos na condição pré-HD, quando comparados com o grupo controle, e os mesmos detectaram uma diminuição nos níveis séricos de TBARS após a HD.

Nossos resultados também estão de acordo com Gerardi e colaboradores (2002); neste estudo, foi observado que indivíduos pré-HD possuem maiores níveis de MDA no sangue em relação ao grupo controle e que, após uma sessão de HD, seus níveis de

MDA no sangue diminuíram, sugerindo que estes produtos finais de peroxidação lipídica podem se difundir através dos filtros dialíticos e assim, serem removidos pelo processo de HD.

Vecchi e colaboradores (2009) reportaram um aumento nos níveis de MDA em soro de indivíduos com DRC e tratados com terapia de conservação da função renal, em comparação aos indivíduos saudáveis. Interessantemente, os autores observaram que indivíduos com DRC e submetidos à terapia dialítica, peritoneal ou HD, não apresentaram menores níveis de MDA, em relação aos indivíduos com DRC sem realização de diálise. De fato, os níveis de MDA livre (isto é, não associado à proteína) eram até maiores nos indivíduos em diálise, quando comparados aos valores nos indivíduos não realizando diálise. Os autores sugerem a ocorrência de peroxidação lipídica devido ao processo dialítico, e não devido à condição urêmica. Além disso, considerando os elevados níveis de MDA ligado em todos os grupos de indivíduos com DRC, os autores sugerem a incapacidade de remoção desta forma de MDA, seja devido à perda da função renal ou devido à incapacidade dos processos dialíticos em remover MDA ligado. Em conjunto, os achados de Vecchi e colaboradores explicam, pelo menos em parte, nossos resultados, indicando que a HD parece não ser totalmente eficaz na normalização dos níveis de MDA, devido aos produtos de lipoperoxidação ligados (em proteínas, ácidos nucleicos, lipoproteínas) serem difíceis de serem removidos pela HD.

A remoção de moléculas de tamanho médio pelo hemodialisador é menor em relação à remoção de moléculas pequenas; contudo, a hemodiafiltração ou o uso de dialisador de alto fluxo possui uma melhor depuração de moléculas de tamanho médio. Tal como o MDA, solutos ligados às proteínas são de difícil remoção pela HD, como por exemplo, o indoxil sulfato e o p-cresil sulfato, onde as taxas de redução de seus níveis séricos pela HD são de 32% e 29%, respectivamente (YAMAMOTO et al., 2016).

A glicação não-enzimática de proteínas podem causar alterações estruturais e prejuízos na função das proteínas. A formação de AGEs ocorre quando grupos carbonil de monossacarídeos reagem com grupos amino das proteínas, formando bases de Schiff que são instáveis; estas sofrem rearranjos, resultando na formação de produtos de Amadori, os quais podem ser oxidados na presença de metais de transição, por exemplo, dando origem aos AGEs. Outro caminho através do qual pode ocorrer a geração de

AGEs é pela auto-oxidação de glicose, bem como também pelo estresse oxidativo (STINGHEN et al., 2016).

Um aumento significativo nos níveis séricos de AGEs e de pentosidina foram observados nas amostras de soro dos indivíduos pré-HD e pós-HD, em comparação com os valores encontrados em soro de indivíduos do grupo controle. Níveis séricos de AGEs encontram-se frequentemente aumentados em indivíduos com DRC, mesmo na ausência de hiperglicemia crônica, devido ao acúmulo destas moléculas resultante da inflamação, estresse oxidativo, dieta (STINGHEN et al., 2016) e especialmente devido à diminuição da taxa de filtração glomerular (OLENIUC et al., 2011).

De acordo com nossos achados, Miyata e colaboradores (1997) demonstraram que os níveis de AGEs e de pentosidina estão significativamente aumentados no soro de indivíduos com DRC nas condições pré-HD e pós-HD. Eles separaram a análise da pentosidina em dois resultados distintos: pentosidina ligada a albumina (portanto corrigida por mg/mL de albumina), e pentosidina livre. Em ambos os resultados, os níveis de pentosidina apresentaram-se elevados nas amostras de soro nas condições pré-HD e pós-HD, quando comparados com os resultados do grupo controle.

Os AGEs endógenos são formados por diferentes vias, porém parte dos AGEs presentes no organismo são de origem exógena, isto é, proveniente de alimentos, e que podem alcançar a circulação sanguínea e assim contribuir com os níveis séricos de AGEs. Com isto sugere-se que os valores de AGEs encontrados no soro de indivíduos do grupo controle, mas também em soro de indivíduos com DCR, seja uma combinação destas duas fontes (AGEs gerados endogenamente e AGEs dietéticos). Yacoub e colaboradores (2017) relataram que uma restrição na ingestão de alimentos que contenham quantidades significativas de AGEs pode ter papel importante na redução dos níveis séricos destas biomoléculas.

Contudo, parece haver uma redução nos níveis de ambos, AGEs fluorescentes e pentosidina, em soro de indivíduos com DRC após uma sessão de HD, indicando que o tratamento hemodialítico pode trazer melhorias ao organismo com a remoção destes produtos de glicação avançada. Uma sessão de HD é capaz de reduzir os níveis de AGEs no sangue em 20%, porém somente AGEs de baixo peso molecular (AGEs < 10 kDa) são removidos eficientemente pela HD (STINGHEN et al., 2016). Esta porcentagem de remoção pode ser elevada com o aumento na frequência ou na duração

da sessão de HD. Membranas com alta permeabilidade podem reduzir os níveis de AGEs em até 60%. Uma combinação entre hemodiafiltração e HD por mais de 6 meses em indivíduos urêmicos reduz significativamente as concentrações séricas de AGEs (STINGHEN et al., 2016).

Dentre os AGEs eliminados pela HD, bem como seus precursores, podemos citar alguns exemplos: N6-carboximetil lisina (CML), carboximetilarginina (CMA), metilglioxal, 1-deoxiglicosona, 3-deoxiglicosona (3-DG), pentosidina, bem como o glioxal, um dos principais precursores nos processos de glicação e participante na geração de AGEs; todas estas moléculas podem ser encontradas também em alimentos (HOHMANN et al., 2017).

Uma das técnicas mais utilizadas para a análise de dano oxidativo em proteínas dá-se pelo monitoramento da formação de derivados hidrazônicos da 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), após sua reação com grupos carbonil das proteínas, formando hidrazonas que podem ser monitoradas a 370 nm. A carbonilação de proteínas é um parâmetro relacionado ao dano oxidativo às proteínas resultante da oxidação de resíduos de aminoácidos lisina, arginina, prolina e treonina por espécies reativas. Em comparação com outros biomarcadores de oxidação, PCO apresenta a vantagem de ser estável (COLOMBO et al., 2018).

Oberg e colaboradores (2004) observaram um aumento nos níveis séricos de proteínas carboniladas em indivíduos com DRC nos estágios 3-5, ou seja, em uma condição anterior aos indivíduos iniciarem com o tratamento dialítico. Estudo comparando indivíduos pré-dialíticos urêmicos com indivíduos em tratamento dialítico, ou seja, em HD, foi observado que os indivíduos em HD apresentavam maiores níveis de proteína carbonilada no plasma, em relação aos indivíduos pré-dialíticos urêmicos, sugerindo que o aumento nos níveis de proteínas carboniladas nos indivíduos em tratamento dialítico pode ser devido a alguns fatores, tais como remoção incompleta de solutos urêmicos, bioincompatibilidade das membranas de diálise e a perda de antioxidantes de baixo peso molecular devido à remoção pela HD (DURSUN et al., 2005).

Tantos as amostras de soro de indivíduos pré-HD quanto de indivíduos pós-HD apresentam níveis elevados de proteínas carboniladas, em relação ao grupo controle. As proteínas podem ser oxidadas por diferentes vias. Um dos mecanismos é pela geração

de grupos carbonilas em proteínas pelos AGEs ou por ação dos produtos de peroxidação lipídica como 4-HNE e MDA (MADIAN; REGNIER, 2010). Como observado em nossos resultados, níveis de MDA e AGEs estão significativamente elevados em amostras de soro de indivíduos com DRC contribuindo para a oxidação de proteínas.

A carbonilação de proteínas afeta várias proteínas plasmáticas, sendo a albumina a mais vulnerável quanto à formação de grupos carbonila (COLOMBO et al., 2018). Sabe-se que a albumina é um importante antioxidante no plasma, e com isso apresenta uma proteção contra o estresse oxidativo em indivíduos com DRC (WARD; MCLEISH, 2003). Indivíduos com hipoalbuminemia mostram maior aumento de peroxidação lipídica nas membranas dos eritrócitos em comparação aos indivíduos com níveis normais de albumina (SOEJIMA et al., 1999).

De acordo com nossos resultados, nas amostras de soro de indivíduos na condição pré-HD *versus* pós-HD, não foram observadas diferenças nos níveis de PCO, assim como Caimi e colaboradores (2013), que também não encontraram diferenças quando realizada a mesma análise. Sugerimos que o não aumento nos níveis de PCO após a HD possa ser devido a alguns efeitos benéficos de compostos antioxidantes potencialmente presentes no soro durante o processo dialítico, incluindo o ácido úrico. O ácido úrico encontra-se frequentemente elevado no sangue de indivíduos com DRC. Sabe-se que o ácido úrico pode fornecer grande proteção na eliminação de espécies reativas no plasma, protegendo as proteínas da oxidação, bem como protegendo os lipídeos das membranas dos eritrócitos contra a oxidação (FABRINI et al., 2014; SO e THORENS, 2010; SAUTIN; JOHNSON, 2008). Por outro lado, Dursun e colaboradores (2005) observaram um aumento nos níveis de PCO após a HD, sugerindo que a perda de antioxidantes durante o tratamento hemodialítico, bem como a membrana de diálise sendo responsável pela ativação de leucócitos PMN, que em conjunto podem atuar como os principais determinantes da oxidação de proteínas na condição pós-HD. Por outro lado, mesmo sendo a HD eficaz na redução dos níveis séricos de TBARS e AGEs, não foram observadas reduções nos níveis de PCO. Podemos sugerir que este resultado se deva ao fato de as proteínas séricas não serem facilmente removidas pela sessão de HD, conforme foi observado nas dosagens de proteínas totais e de albumina no soro de indivíduos após a HD.

As atividades de CAT, GSH-Px e PON 1 no soro de indivíduos com DRC antes e após a sessão de HD, quando comparadas com o grupo controle, apresentaram-se significativamente mais baixas.

A atividade de CAT é 3.600 vezes maior nos eritrócitos do que no plasma e exerce um efeito protetor semelhante ao da GSH-Px ao catalisar a dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 . No entanto, os efeitos protetores da GSH-Px são melhores que aqueles de CAT e SOD. Diminuições na atividade da CAT podem ser uma consequência de ataques de espécies reativas como $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 na estrutura da enzima CAT, contribuindo para a perda da sua atividade e com isso resultando na propagação da lipoperoxidação (AZIZ et al., 2016).

Estudos anteriores (EL-FAR et al., 2005; ZACHARA et al., 2006) também demonstraram redução na atividade de GSH-Px em soro de indivíduos com DRC. A GSH-Px3 é uma enzima antioxidante dependente de selênio com potencial catalítico em reduzir os níveis de H_2O_2 , peróxidos lipídicos e hidroperóxidos orgânicos. É sintetizada pelos rins, principalmente por células epiteliais do túbulo proximal renal, secretada e distribuída na circulação sanguínea (PANG et al., 2018), e na circulação encontra-se associada à HDL (BRITES et al., 2017). Assim, podemos atribuir que a diminuição na atividade da GSH-Px no soro de indivíduos com DRC seja devido a uma diminuição na síntese da enzima por consequência da disfunção renal, ou devido à diminuição na ingestão de selênio (um cofator importante para sua atividade) ou também devido à diminuição nos níveis séricos de HDL-colesterol.

PON 1 é uma enzima sintetizada no fígado e que circula no sangue associada à HDL. A presença da PON 1 nesta lipoproteína confere efeitos antiaterogênicos, impedindo modificações oxidativas na lipoproteína LDL e, com isso, previne ou atenua o desenvolvimento de placas ateroscleróticas. Diminuição da PON 1 nos indivíduos em tratamento hemodialítico tem sido demonstrada por vários autores (JURETIC et al., 2001; GUGLIUCCI et al., 2012 e EFE et al., 2016) sugerindo que a redução na atividade da PON 1 possa ser devido aos solutos urêmicos que afetam negativamente a sua função antioxidante, assim como as reduções nos níveis séricos de HDL que também explicam a diminuição na atividade da PON 1, quando em comparação aos indivíduos saudáveis.

As moléculas antioxidantes estão presentes em abundância no plasma e participam da eliminação de radicais livres, consequentemente contribuem para a diminuição de danos oxidativos em lipídeos de membranas, lipoproteínas e outras macromoléculas. Dentre as moléculas antioxidantes não enzimáticas presentes no plasma, o ácido úrico, os grupos tióis proteicos e a bilirrubina constituem os principais antioxidantes endógenos (KAMPA et al., 2002). Várias metodologias têm sido amplamente utilizadas para a determinação da capacidade antioxidante total do soro, dentre estas, o monitoramento do clareamento (*bleaching*) da crocina e o ensaio de captura do cátion radical ABTS^{•+}.

As membranas celulares são os principais alvos de ataques das ERO, por serem abundantes em ácidos graxos poli-insaturados, os quais são facilmente oxidados; assim, o ensaio de clareamento da crocina é comumente utilizado como um sistema-modelo de lipoperoxidação. A lipoperoxidação se inicia quando HO[•] ataca as estruturas dos ácidos graxos poli-insaturados (abstrai um átomo de H⁺), formando um R[•] que, na presença de O₂, gera o ROO[•]. O ROO[•] abstrai um átomo de H⁺ de um outro lipídeo, levando a formação de ROOH e posteriormente os produtos secundários da lipoperoxidação (MDA e 4-HNE), iniciando novamente uma reação em cadeia (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; LUSSIGNOLI et al., 1999). No ensaio de clareamento da crocina, o ROO[•] gerado por termólise causa danos na estrutura da crocina e, consequentemente, diminuição de sua absorbância, a qual é monitorada em 443 nm. Na presença de um antioxidante, o radical é eliminado e assim, ocorre a inibição no clareamento da crocina (CHATTERJEE et al., 2005). Portanto, é mensurado o efeito das amostras em proteger a estrutura da crocina.

Assis e colaboradores (2015) avaliaram, em sistema-modelo *in vitro* de lipoperoxidação, a capacidade antioxidante de alguns solutos urêmicos sobre ERO que estão frequentemente presentes no soro de indivíduos com DRC. Dentre os solutos urêmicos avaliados, em ordem de eficiência, ácido úrico, *p*-cresol, fenol e L-tirosina apresentaram maior potencial antioxidante, apresentando redução na velocidade de *bleaching* da crocina. Outros solutos foram analisados, tais como ureia, creatinina, metilguanidina, L-arginina e ácido hipúrico, porém tais solutos indicaram ausência em efeitos antioxidantes com o uso deste sistema-modelo.

Nossos resultados mostraram que amostras de soro de indivíduos com DRC, na condição pré-HD, possuem maior potencial antioxidante, uma vez que foi utilizado um menor volume de soro para inibir 50% da oxidação da crocina pelo radical ROO[•]. Esse potencial antioxidante observado em soro de indivíduos pré-HD pode ser atribuído à presença de moléculas com potencial antioxidante, cujos níveis encontram-se elevados antes da sessão de HD, principalmente o ácido úrico.

Malliaraki e colaboradores (2003) também observaram que indivíduos com DRC na condição pré-HD apresentam uma maior capacidade antioxidante devido à alta presença de metabólitos endógenos (como por exemplo, o ácido úrico), quando comparados com os indivíduos do grupo controle.

Ao final da sessão de HD, observamos a remoção de quantidades significativas de ácido úrico, e conseqüentemente uma redução em ambos, nos níveis deste composto nitrogenado no soro e na capacidade antioxidante total. Apesar desta condição transitória de menor capacidade antioxidante em soro de indivíduos com DRC após o término da sessão de HD, outras moléculas podem exercer um efeito compensatório, embora com menor eficiência, a esta queda no potencial antioxidante sérico devido à remoção de ácido úrico, como por exemplo a albumina, que não é removida pela HD. A albumina possui capacidade antioxidante de forma direta e indireta. Indiretamente, a albumina atua como antioxidante ao transportar a bilirrubina, e assim pode agir impedindo a peroxidação lipídica (NEUZIL; STOCKER, 1993). A albumina pode diretamente agir como antioxidante na captura de radicais livres, pois contém um resíduo de cisteína (Cys-34) na forma reduzida (-SH), o qual é capaz de eliminar radicais hidroxil (ROCHE et al., 2008). Outro fator importante na atividade antioxidante da albumina é a presença do grupo -SH frente ao ONOO⁻ (ROCHE et al., 2008).

Pode-se ainda comparar os níveis séricos de TBARS (biomarcador de lipoperoxidação) e o sistema-modelo de lipoperoxidação (ensaio de clareamento da crocina) dos indivíduos com DRC. Nossos resultados mostraram que indivíduos com DRC na condição pré-HD apresentaram um aumento significativo nos níveis séricos de TBARS em relação ao grupo controle, e também apresentaram uma maior capacidade antioxidante no soro no ensaio da crocina. Podemos sugerir que o aumento encontrado nos níveis séricos de TBARS se deve, dentre outras origens, aos danos oxidativos provenientes das células e tecidos do organismo de maneira geral, enquanto que no

ensaio da crocina foi analisada a capacidade antioxidante do soro em proteger a crocina contra a oxidação pelo radical ROO•.

Outro ensaio comumente realizado para avaliar a capacidade antioxidante total em amostras de soro é o ensaio de captura do cátion radical ABTS^{•+}. O ABTS^{•+} é considerado um radical modelo; não representa uma fonte biológica de radical, no entanto, é muito utilizado para avaliar o potencial antioxidante frente os radicais livres, utilizando diferentes amostras, permitindo a determinação concomitante do potencial antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos. O ensaio de captura do cátion radical ABTS^{•+} é baseado na capacidade antioxidante das amostras em sequestrar o cátion radical ABTS^{•+}, podendo se observar descoloração, de verde intensa a cor verde clara ou incolor, monitorada à 734 nm (RUBIO et al., 2016).

O ácido úrico e o trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) são comumente usados como padrões de compostos antioxidantes devido às suas capacidades antioxidantes já reconhecidas. O ácido úrico apresenta grande capacidade em eliminar radicais centrados no carbono e ROO• em meio hidrofílico, como no plasma, porém perde a sua capacidade em meio lipofílico e com isso não interrompe a propagação que ocorre em membranas lipídicas (SAUTIN; JOHNSON, 2008). O trolox é um antioxidante análogo da vitamina E, apresenta vantagem de ser solúvel em água e que possui um grupo hidroxil fenólico que está envolvido na captura de radicais (ALBERTINI; ABUJA, 1999).

O plasma humano é altamente resistente à oxidação, devido à presença de antioxidantes, tais como ácido úrico, ácido ascórbico, vitamina E e proteínas (WAYNER et al., 1987). As proteínas apresentam capacidade antioxidante no plasma humano principalmente devido à presença de grupos sulfidrilas (-SH), onde o átomo de enxofre pode facilmente se adaptar com a perda de um elétron (FLORA, 2009). No entanto, outros aminoácidos também contribuem para a proteção contra os danos oxidativos. A tirosina é um dos aminoácidos que mais apresenta atividade antioxidante; assim como a vitamina E, que contém grupo hidroxil fenólico que doa íons de hidrogênio e assim é capaz de reagir com o oxigênio ou nitrogênio em uma reação de terminação, impedindo a geração de novos radicais (MEUCCI; MELE, 1997; PEREIRA et al., 2009). Outro aminoácido com capacidade antioxidante é a cisteína, que está presente na albumina plasmática e constitui o maior *pool* de grupos tióis na circulação

sanguínea. Em indivíduos saudáveis, aproximadamente 80% da cisteína (Cys-34) na albumina contém grupamento sulfidril livre, capaz de eliminar radicais hidroxil (ROCHE et al., 2008). Já o ácido ascórbico (vitamina C), um potente antioxidante redutor e eliminador de ERO, pode atuar dentro e fora das células pela sua solubilidade em água, protegendo as membranas lipídicas e as proteínas contra danos oxidativos. O ácido ascórbico atua doando elétrons para radicais livres, recuperando sua estabilidade (PEHLIVAN, 2017).

Nossos resultados mostraram que, dentre os grupos estudados (controle, pré-HD e pós-HD), o soro de indivíduos pré-HD possui a maior capacidade antioxidante total, tanto para o ensaio de clareamento da crocina quanto para o ensaio de captura do ABTS^{•+}. Pelo método da captura do ABTS^{•+}, Ruskovska e colaboradores (2014) avaliaram a capacidade antioxidante total no soro de indivíduos submetidos ao tratamento hemodialítico e reportaram que os indivíduos antes da HD apresentaram maior capacidade antioxidante quando comparado com o grupo controle, e que após a sessão de HD, houve uma diminuição da capacidade antioxidante, quando comparado com o grupo pré-HD, sugerindo que a abundância de pequenas moléculas com atividade antioxidante nas amostras pré-HD contribuem para a capacidade antioxidante.

Em relação aos resultados do ensaio do ABTS^{•+}, expresso em equivalência a um composto padrão, tanto exógeno quanto endógeno, nota-se na Figura inserida 26D que, apesar da concentração de albumina no soro de indivíduos com DRC ter aumentado no plasma ao final da sessão de HD, os resultados em equivalentes à albumina humana apresentaram uma diminuição após a sessão de HD, a qual pode ser devido à diminuição na capacidade antioxidante da albumina, bem como em suas funções, acometidas por modificações estruturais na proteína promovidas pela oxidação (COLOMBO et al., 2012).

Outro elemento importante no sistema de defesa antioxidante são os grupos tióis isto é, compostos orgânicos que contêm o grupamento sulfidril, -SH. A maioria dos tióis no plasma são encontrados principalmente na albumina e em menor parte em tióis de baixo peso molecular, tais como cisteína livre, glutathione e homocisteína. Os grupos tióis podem ser oxidados por moléculas oxidantes levando a formação de ligações de dissulfeto reversíveis. As estruturas de ligação do tipo dissulfeto podem ser reduzidas novamente (quando há uma diminuição no estresse oxidativo) a grupos tióis, mantendo-

se um equilíbrio (AYAR et al., 2018; SÖNMEZ et al., 2018). O grupo tiol age via vários mecanismos: *i*) como componente geral do tampão redox tiol/dissulfeto; *ii*) quelantes de metais; *iii*) inibidores de radicais e *iv*) substratos para reações redox (GSH) (DENEKE, 2000).

Nossos resultados mostram que amostras de soro de indivíduos com DRC pós-HD apresentam um aumento de tióis totais, em comparação com as amostras pré-HD. Ayar e colaboradores (2018) também avaliaram os níveis séricos de tióis totais em indivíduos submetidos à hemodiálise, e observaram um aumento de tióis totais no soro ao final da sessão de HD. Sugerimos que este aumento possa ser devido à hemoconcentração de proteínas, principalmente da albumina, nas amostras de soro pós-HD, uma vez que o tiol na albumina representa a maior fração de tiol plasmático (COLOMBO et al., 2015).

7 CONCLUSÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, observamos um aumento significativo nos biomarcadores relacionados à função renal / compostos nitrogenados não proteicos em soro de indivíduos com DRC na condição pré-HD (creatinina, ureia, ácido úrico). Níveis séricos de potássio e glicose também se encontram elevados nestes indivíduos, porém ainda dentro dos valores de referência. Após uma sessão de HD, houve uma redução significativa nos níveis de creatinina, ureia, ácido úrico, potássio e glicose, indicando os efeitos benéficos da HD na remoção de solutos do sangue. As dosagens de proteínas totais, albumina, colesterol total, colesterol-HDL, bem como a estimativa de colesterol-LDL, indicam que estes biomarcadores se encontram diminuídos no soro de indivíduos com DRC na condição pré-HD. Ao final da HD, observamos um aumento nos níveis séricos destes biomarcadores, sugerindo uma hemoconcentração devido a remoção de líquidos pelo processo dialítico. Os níveis estimados de colesterol-VLDL apresentam-se acima dos valores de referência nos indivíduos com DRC, antes e após a sessão de HD.

Em relação aos biomarcadores de danos oxidativos, amostras de soro de indivíduos com DRC, nas condições pré-HD e pós-HD, em relação ao grupo controle, apresentam aumentos nos níveis de TBARS, AGEs fluorescentes (incluindo a

pentosidina) e PCO. Uma sessão de HD foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TBARS e AGEs fluorescentes (incluindo a pentosidina).

As atividades das enzimas antioxidantes CAT, GSH-Px e PON 1 estão diminuídas nos soros de indivíduos com DRC, antes e após a sessão de HD, em comparação com o grupo controle. Em relação à capacidade antioxidante sérica, avaliada pelo ensaio de clareamento da crocina e pelo ensaio de captura do cátion radical ABTS^{•+}, nota-se que amostras de soro de indivíduos com DRC na condição pré-HD apresentaram maior capacidade antioxidante em relação às amostras do grupo controle e em relação à condição pós-HD, possivelmente como uma consequência do acúmulo sérico de solutos antioxidantes devido à disfunção renal. Na análise dos grupos tióis totais no soro, foi observado um aumento após a sessão de HD, quando comparado com as amostras pré-HD, o que pode ter relação com a hemoconcentração de proteínas, principalmente albumina, que constitui a maior fração de grupos tióis no plasma.

De fato, os indivíduos com DRC tem um aumento no estresse oxidativo, o qual está relacionado com vários fatores associados às complicações do estado urêmico, incluindo inflamação crônica, comorbidades relacionadas à DRC, uso de alguns medicamentos com ação pró-oxidante, todos estes fatores potencializados pela baixa atividade dos sistemas antioxidantes endógenos. Assim, verificamos que uma sessão de HD não intensificou o estresse oxidativo e parece trazer benefícios que vão além da remoção dos solutos urêmicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI, R.; ABUJA, P. Prooxidant and Antioxidant Properties of Trolox C, Analogue of Vitamin E, in Oxidation of Low-Density Lipoprotein. **Free Rad Res**, v. 30, p. 181-188, 1999.

AL-RASHIDI, M.; HUSSAIN, A. A.; NAMPOORY, M.R.N.; AL-ALI, J.H.; AKANJI, A. O. Post-dialysis retention of blood lipoproteins and apolipoproteins in patients with end-stage renal disease on maintenance haemodialysis in Kuwait. **Clinica Chimica Acta**, v. 344, p. 149-154, 2004.

ASSIRI, A.M.A.; KAMEL, H.F.M.; ALREFAI, A.A. Critical Appraisal of Advanced Glycation End Products (AGEs) and Circulating Soluble Receptors for Advanced Glycation End Products (sRAGE) as a Predictive Biomarkers for Cardiovascular Disease in Hemodialysis Patients. **Med Sci (Basel)**, v. 6, n.2, E38, 2018.

ASSIS, R.P.; CASTRO, J.F.; GUTIERRES, V.O.; ARCARO, C.A.; BROTTTO, R.S.; OLIVEIRA, O.M.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.L. Effects of uremic solutes on reactive oxygen species in vitro model systems as a possibility of support the renal function management. **BMC Nephrol**, v. 16, Article 50, 13 p. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12882-015-0029-1>.

ASSIS R.P.; ARCARO, C.A.; GUTIERRES, V.O.; OLIVEIRA, J.O.; COSTA, P.I.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.L. Combined Effects of Curcumin and Lycopene or Bixin in Yoghurt on Inhibition of LDL Oxidation and Increases in HDL and Paraonase Levels in Streptozotocin-Diabetic Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, E332, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18040332>.

AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, Article ID 360438, 31 p., 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>.

AYAR, G.; SAHIN, S.; YAZICI, M.U.; NESELIOGLU, S.; EREL, O.; BAYRAKCI, U.S. Effects of Hemodialysis on Thiol-Disulphide Homeostasis in Critically Ill Pediatric Patients with Acute Kidney Injury. **Biomed Res Int**, v. 2018, Article ID 1898671, 6 p., 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1898671>.

AZIZ, M.A.; MAJEED, G.H.; DIAB, K.S.; AL-TAMINI, R.J. The association of oxidant–antioxidant status in patients with chronic renal failure. **Renal Failure**, v. 38, p. 20-26, 2016.

BAGALAD, B.S.; MOHANJUMAR, K.P.; MADHUSHANKARI, G.S.; DONGUE, M.; KUBERAPPA, P.H. Diagnostic accuracy of salivary creatinine, urea, and potassium levels to assess dialysis need in renal failure patients. **Dent Res J**, v.14, p. 13-18, 2017.

BAILEY, J.L.; MITCH, W.E. Metabolic acidosis as a uremic toxin. **Semin Nephrol**, v. 16, n. 3, p. 160-166, 1996.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, J.B.N.; MOURA, E.C.S.C.; LIRA, C.L.O.B.; MARINHO, P.E.M. Quality of life and duration of hemodialysis in patients with chronic kidney disease (CKD): a cross-sectional study. **Fisioter Mov**, v. 30, p. 781-788, 2017.

BARRETO, F.C.; STINGHEN, A.E.M.; OLIVEIRA, R.B.; FRANCO, A.T.B., MORENO; A.N.; BARRETO, D.V.; PECOITS-FILHO, R.; DRÜEKE, T.B.; MASSY, Z.A. Em busca de uma melhor compreensão da doença renal crônica: uma atualização em toxinas urêmicas. **J Bras Nefrol**, v. 36, p. 221-235, 2014. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20140033>

BASTOS, Marcus Gomes. **Biomarcadores na Nefrologia**: Biomarcadores de Função Renal na DRC. São Paulo: Editor Hugo Abensur, 2008. *E-book*. Disponível em: <https://arquivos.sbn.org.br/pdf/biomarcadores.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2018.

BASTOS, M.G.; KIRSZTAJN, G.M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **J Bras Nefrol**, v. 33, p. 93-108, 2011.

BAYLIS, C. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. **Nat Clin Pract Nephrol**, v. 2, n. 4, p. 209-220, 2006. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fncpneph0143>.

BAYNES, J.W.; DOMINICZAK, M.H. **Bioquímica Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 664 p.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8).

BEERS, R.F.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J Biol Chem**, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952.

BELTOWSKI, J.; WOJCICKA, G.; JAMROZ, A. Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. **Pol J Pharmacol**, v. 54, n. 6, p. 661-671, 2002.

BERTHOLF, R.L. Proteins and albumin. **Laboratory Medicine**, v. 45 n. 1, p. 25-41, 2014. <https://doi.org/10.1309/LMKRNRGW5J03APZQ>.

BHARGAVA, P.; SCHNELLMANN, R.G. Mitochondrial energetics in the kidney. **Nat Rev Nephrol**, v. 13, p. 629-646, 2017. <http://doi.org/10.1038/nrneph.2017.107>.

BIANCHI, Patrícia Dall'Agnol. **Avaliação da função pulmonar e estresse oxidativo em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise**. Orientador: Adriane Belló-Klein. 2003. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia). Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

BOAZ, M.; MATAS, Z.; BIRO, A.; KATZIR, Z.; GREEN, M.; FAINARU, M.; SMETANA, S. Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. **Kidney Int**, v. 56, n. 3, p. 1078-1083, 1999.

BOER, I.H.; BRUNZELL, J.D. HDL in CKD: How Good Is the “Good Cholesterol?”. **J Am Soc Nephrol**, v. 25, n. 5, p. 871-874, 2014. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014010062>.

BOVEE, K.C. Renal Function and Laboratory Evaluation. **Toxicol Pathol**, v. 14, n. 1, p. 26-36, 1986.

BUCALA, R.; MAKITA, Z.; VEGA, G.; GRUNDY, S.; KOSCHINSKY, T.; CERAMI, A.; VLASSARA, H. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n. 10, p. 9441-9445, 1994.

BUJISSE, B.; LEE, D.H.; STEFFEN, L.; ERICKSON, R.R.; LUEPKER, R.V.; JACOBS, D.R.; HOLTZMAN, J.L. Low Serum Glutathione Peroxidase Activity Is Associated with Increased Cardiovascular Mortality in Individuals with Low HDLc's. **PLoS One**, v. 7, Article ID e38901, 6 p., 2012. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038901>.

BULBUL, M.C.; DAGEL, T.; AFSAR, B.; ULUSU, N.N.; KUWABARA, M.; COVIC, A.; KANBAY, M. Disorders of Lipid Metabolism in Chronic Kidney Disease. **Blood Purif**, v. 46, n. 2, p. 144–152, 2018. <http://doi.org/10.1159/000488816>.

BREITSAMETER, G.; FIGUEIREDO, A.E.; KOCHHANN, D.S. Cálculo de Kt/V em hemodiálise: comparação entre fórmulas. **J Bras Nefrol**, v. 34, p. 22-26, 2012.

BRITES, F.; MARTIN, M.; GUILLAS, I.; KONTUSH, A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. **BBA Clinical**, v. 8, p. 66-77, 2017. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2017.07.002>.

BURMEISTER, J.E.; CAMPOS, J.F.; MILTERSTEINER, D.R. Efeito de diferentes níveis de glicose no dialisato sobre o risco de hipoglicemia durante hemodiálise em pacientes diabéticos. **J Bras Nefrol**, v. 34, n. 4, p. 323-327, 2012. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20120020>.

CAI W.; HE, J.C.; ZHU, L.; CHEN, X.; STRIKER, G.E.; VLASSARA, H. AGE-receptor-1 counteracts cellular oxidant stress induced by AGEs via negative regulation of p66shc-dependent FKHRL1 phosphorylation. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 294, n. 1, p. 145-152, 2008.

CAIMI, G.; CAROLLO, C.; HOPPS, E.; MONTANA, M.; LO PRESTI, R. Protein oxidation in chronic kidney disease. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 54, n. 4, p. 409-413, 2013. <https://doi.org/10.3233/CH-131739>.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Chronic Kidney Disease in the United States, 2019**. Atlanta, GA. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2019. Disponível em: https://www.cdc.gov/kidneydisease/pdf/2019_National-Chronic-Kidney-Disease-Fact-Sheet.pdf. Acesso em: 26 set. 2019.

CHADBAN, S.J.; BRIGANTI, E.M.; KERR, P.G. Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 2, p. 131-138, 2003. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000070152.11927.4A>.

CHATTERJEE, S.; PODUVAL, T.B.; TILAK, J.C.; DEVASAGAYAM, T.P.A. A modified, economic, sensitive method for measuring total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus*). **Clinic Chimica Acta**, v. 352, p. 155-163, 2005.

CHEN, M.F.; CHANG, C.L.; LIOU, S.Y. Increase in resting levels of superoxide anion in the whole blood of uremic patients on chronic hemodialysis. **Blood Purif**, v. 16, n. 5, p. 290-300, 1998.

CHEUNG, A.K. Is Lipid Control Necessary in Hemodialysis Patients?. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 4, n. 1, p. S95-S101, 2009. <https://doi.org/10.2215/CJN.04780709>.

CHRISTIAKOV, D.A., MELNICHENKO, A.A., OREKHOV, A.N., BOBRY SHEV, Y.V. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. **Biochimie**, 132: 19-27, 2017.

CHOI, H.Y., HA, S.K. Potassium Balances in Maintenance Hemodialysis. **Electrolyte Blood Press**, 11: 9-16, 2013.

COLOMBO, G., CLERICI, M., GIUSTARINI, D., ROSSI, R., MILZANI, A., DALLE-DONNE, I. Redox albuminomics: oxidized albumin in human diseases. **Antioxid Redox Signal**, 1: 1515-27, 2012.

COLOMBO, G.; REGGIANI, F.; CUCCHIARI, D.; ASTORI, E.; GARAVAGLIA, M.L.; PORTINARO, N.M.; SAINO, N.; FINAZZI, S.; MILZANI, A.; BADALAMENTI, S.; DALLE-DONNE, I. Plasma Protein Carbonylation in Haemodialysed Patients: Focus on Diabetes and Gender. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, Article ID 4149681, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4149681>.

COLOMBO, G.; REGGIANI, F.; PODESTÀ, M.A.; GARAVAGLIA, M.L.; PORTINARO, N.M.; MILZANI, A.; BADALAMENTI, S.; DALLE-DONNE, I. Plasma protein thiolation index (PTI) as a biomarker of thiol-specific oxidative stress in

haemodialyzed patients. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 443-451, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.022>.

COSTA, L.G.; MCDONALD, B.E.; MURPHY, S.D.; OMENN, G.S.; RICHTER, R.J.; MOTULSKY, A.G.; FURLONG, C.E. Serum Paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxontocixity in rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 103, n. 1, p. 66–76, 1990.

CRISTOL, J.P.; CANAUD, B.; RABESANDRATANA, H.; GAILLARD, I.; SERRE, A.; MION, C. Enhancement of reactive oxygen species production and cell surface markers expression during hemodialysis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 9, n. 4, p. 389-394, 1994.

DAENEN, K.; ANDRIES, A.; MEKAHLI, D.; VAN SCHEPDAEL, A.; JOURET, F.; BAMMENS, B. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Pediatr Nephrol**, v. 34, n. 6, p. 975-991, 2019. <http://doi.org/10.1007/s00467-018-4005-4>.

DAVIES, K.J. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **IUBMB Life**, v. 50, p. 279-289, 2000.

DENEKE, S.M. Thiol-based antioxidants. **Curr Top Cell Regul**, v. 36, p. 151-180, 2000.

DURSUN, E., DURSUN, B., SÜLEYMANLAR, G., OZBEN, T. Carbonyl stress in chronic renal failure: the effect of haemodialysis. **Ann Clin Biochem**, v. 42, p. 64–66, 2005.

EFE, T.H.; ERTEM, A.G.; ALTUNOGLU, A.; KOSEAGLU, C.; ERAYMAN, A.; BILGIN, M.; KURMUS, Ö.; ASLAN, T.; BILGE, M. Serum Paraoxonase Levels are Correlated with Impaired Aortic Functions in Patients with Chronic Kidney Disease. **General Cardiology**, v. 32, n. 1, p. 75-80, 2016.

EL-FAR, M.A.; BAKR, M.A.; FARAHAT, S.E.; ABD EL-FATTAH, E.A. Glutathione peroxidase activity in patients with renal disorders. **Clin Exp Nephrol**, v. 9, n. 2, p. 127-131, 2005.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).

FABRINI, E.; SERAFINI, M.; BARIC, I.C.; HAZEN, S.L.; KLEIN, S. Effect of Plasma Uric Acid on Antioxidant Capacity, Oxidative Stress, and Insulin Sensitivity in Obese Subjects. **Diabetes**, v. 63, n. 3, p. 976-981, 2014. <https://dx.doi.org/10.2337%2Fdb13-1396>.

FERREIRA, A.L.A.; MACHADO, P.E.A.; MATSUBARA, L.S. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal iron hydroxide in vitro. **Braz. J Med Biol Res**, v. 32, n. 6, p. 689-694, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1999000600004>.

FIASCHI, E.; MIONI, G.; MASCHIO, G.; D'ANGELO, A.; OSSI, E. Calcium and phosphorus metabolism in chronic uremia. **Nephron**, v. 14, n. 2, p. 163-180, 1975.

FLORA, S.J.S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2, n. 4, p. 191–206, 2009. <https://dx.doi.org/10.4161%2Foxim.2.4.9112>.

FLORENS, N.; CALZADA, C.; LYASKO, E.; JUILLARD, L.; SOULAGE, C.O. Modified Lipids and Lipoproteins In Chronic Kidney Disease: A New Class of Uremic Toxins. **Toxins**, v. 8, n. 12, p. 376, 2016. <https://dx.doi.org/10.3390%2Ftoxins8120376>.

FOLEY, R.N.; PARFREY, P.S. Cardiovascular disease and mortality in ESRD. **J Nephrol**, v. 11, n. 5, p. 239-245, 1998.

FORTI, N., DIAMENT, J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 87, n. 5, p. 671-679, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2006001800019>.

FRANÇA, B.K.; ALVES, M.R.M.; SOUTO, F.M.S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R.F.; GUIMARÃES, A.; JUNIOR, AA. Peroxidação lipídica e obesidade: métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **J Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FUJII, H.; GOTO, S.; FUKAGAWA, M. Role of Uremic Toxins for Kidney, Cardiovascular, and Bone Dysfunction. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 5, p. 202, 2018. <https://doi.org/10.3390/toxins10050202>.

GAMBOA, J.L.; BILLINGS, F.T.; BOJANOWSKI, M.T.; GILLIAM, L.A.; YU, C.; ROSHANRAVAN, B.; ROBERTS, L.J.; HIMMELFARB, J.; IKIZLER, T.A.; BROWN, N.J. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. **Physiol Rep**, v. 4, n. 9, Article ID e12780, 2016. <https://dx.doi.org/10.14814%2Fphy2.12780>.

GERARDI, G.; USBERTI, M.; MARTINI, G.; ALBERTINI, A.; SUGHERINI, L.; POMPELLA, A.; LORENZO, D.D. Plasma Total Antioxidant Capacity in Hemodialyzed Patients and Its Relationships to other Biomarkers of Oxidative Stress and Lipid Peroxidation. **Clin Chem Lab Med**, v. 40, n. 2, p. 104-110, 2002.

GILBERT, J.; LOVIBOND, K.; MOONEY, A.; DUDLEY, J. Renal replacement therapy: summary of NICE guidance. **BMJ**, v. 363, Article ID k4303, 2018. <https://doi.org/10.1136/bmj.k4303>.

GLORIEUX, G.; NEIRYNCK, N.; VEYS, N.; VANHOLDER, R. Dialysis water and fluid purity: more than endotoxin. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, n. 11, p. 4010-4021, 2012. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs306>.

GLORIEUX, G.; TATTERSALL, J. Uraemic toxins and new methods to control their accumulation: game changers for the concept of dialysis adequacy. **Clin Kidney J**, v. 8, n. 4, p. 353-362, 2015. <https://dx.doi.org/10.1093%2Fckj%2Fsv034>.

GO, A.S.; CHERTOW, G.M.; FAN, D.; MCCULLOCH, C.E.; HSU, C.Y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. **N Engl J Med**, v. 351, n. 13, p. 1296-12305, 2004.

GOLIGORSKY, M.S.; MORGAN, M.A.; LYUBSKY, S.; GROSS, R.W.; ADAMS, D.T.; SPITZ, D.R. Establishment of a hydrogen peroxide resistant variant of renal tubular epithelial cells: role of calcium-independent phospholipase A2 in cell damage. **Arch Biochem Biophys**, v. 301, n. 1, p. 119-128, 1993.

GUALANO, B.; UGRINOWITSCH, C.; SEGURO, A.C.; JUNIOR, A.H.L. A Suplementação de Creatina Prejudica a Função Renal? **Rev Bras Med Esporte**, v. 14, n. 1, p. 68-73, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922008000100013>.

GUIMARÃES, J.; BASTOS, M.; MELO, M.; CARVALHEIRO, M. Nefropatia diabética Taxa de Filtração Glomerular Calculada e Estimada. **Acta Med Port**, v. 20, p. 145-150, 2007.

GUGLIUCCI, A.; KOTANI, K.; KIMURA, S. Paraoxonase 1 in Chronic Kidney Failure. **J Lipids**, v. 2012, Article ID 726048, 2012. <https://dx.doi.org/10.1155%2F2012%2F726048>.

GUGLIUCCI, A.; MEHLHAFF, K.; KINUGASA, E.; OGATA, H.; HERMO, R.; SCHULZE, J.; KIMURA, S. Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: Correlation with low molecular AGE adduct clearance. **Clinica Chimica Acta**, v. 377, p. 213-220, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. New York: Oxford. 2007. 888 p.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HAMMER, J.; OESTERREICHER, C.; HAMMER, K.; KOCH, U.; TRAINDL, O.; KOVARIK, J. Chronic gastrointestinal symptoms in hemodialysis patients. **Wien Klin Wochenschr**, v. 110, n. 8, p. 287-291, 1998.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complement Altern Med**, v. 8, n. 63, p. 1-10, 2008. <https://dx.doi.org/10.1186%2F1472-6882-8-63>

HIMMELFARB, J.; IKIZLER, T.A. Hemodialysis. **N Engl J Med**, v. 363, n. 19, p. 1833-1845, 2010. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0902710>.

HIMMELFARB, J.; MCMONAGLE, E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. **Kidney Int**, v. 60, n. 1, p. 358-363, 2001.

HIMMELFARB, J. Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy. **Semin Dial**, v. 22, n. 6, p. 636-643, 2009. <http://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2009.00659.x>.

HOHMANN, C.; LIEHR, K.; HENNING, C.; FIEDLER, R.; GIRNDT, M.; GEBERT, M.; HULKO, M.; STORR, M.; GLOMB, M. Detection of free advanced glycation end products In vivo during hemodialysis. **J Agric Food Chem**, v. 65, n. 4, p. 930-937, 2017. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05013>.

HOLZER, M.; BIRNER-GRUENBERGER, R.; STOJAKOVIC, T.; EL-GAMAL, D.; BINDER, V.; WADSACK, C.; HEINEMANN, A.; MARSCHE, G. Uremia Alters HDL Composition and Function. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 9, p. 1631-1641, 2011. <https://dx.doi.org/10.1681%2FASN.2010111144>.

ILKHANI, F.; HOSSEINI, B.; SAEDISOMEOLIA, A. Niacin and Oxidative Stress: A Mini-Review. **J Nutri Med Diet Care**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2016. <https://doi.org/10.23937/2572-3278.1510014>.

JOHSON, R.J.; FEEHALLY, J.; FLOEGE, J. **Nefrologia Clínica Abordagem Abrangente**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 1328 p.

JACKSON, M.A.; HOLANDA, M.R.; NICHOLAS, J.; LODWICK, R.; FORSTER, D.; MACDONALD, I.A. Hemodialysis-induced hypoglycemia in diabetic patients. **Clin Nephrol**, v. 54, n. 1, p. 30-40, 2000.

JOHANSSON, L.H.; BORG, L.A. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. **Anal Biochem**, v. 174, n.1 p. 331-336, 1988.

JOHNSON, R.J.; NAKAGAWA, T.; JALAL, D.; SÁNCHEZ-LOZADA, L.G.; KANG, D.H.; RITZ, E. Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which?. **Nephrol Dial Transplant**, v. 28, n. 9, p. 2221-2228, 2013. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft029>.

JURETIC, D.; TADIJANOVIC, M.; REKIC, B.; SIMEON-RUDOLF, V.; REINER, E.; BARICIC, M. Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. **Croat Med J**, v. 42, n. 2, p. 146-150, 2001.

KAKKAR, P., DAS, B., VISWANAYHAN, P.N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **J Biochem Biophys**, v. 21, n. 2, p. 130-132, 1984.

KAMPA, M.; NISTIKAKI, A.; TSAOUSIS, V.; MALIARAKI, N.; NOTAS, G.; CASTANAS, E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay.

BMC Clinical Pathology, v. 2, n. 1, p. 1-16, 2002. <https://dx.doi.org/10.1186%2F1472-6890-2-3>.

KARR, S. Epidemiology and Management of Hyperlipidemia, **Am J Manag Care**, v. 23, n. 9, p. 139-148, 2017.

KHAIRA, A.; MAHAJAN, S.; KUMAR, A.; SARAYA, A.; TIWARI, S.C.; PRAKASH, S.; GUPTA, A.; BHOWMIK, D.; AGARWAL, S.K. Endothelial Function and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease of Varying Severity and the Effect of Acute Hemodialysis. **Renal Failure**, v. 33, n. 4, p. 411-417, 2011. <http://doi.org/10.3109/0886022X.2011.568138>.

KIRSZTAJN, G.M. Avaliação do ritmo de filtração glomerular. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 4, p. 257-264, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000400007>.

KOENIG, J.S.; FISCHER, M.; BULANT, E.; TIRAN, B.; ELMADFA, I.; DRUML, W. Antioxidant status in patients on chronic hemodialysis therapy: Impact of parenteral selenium supplementation. **Wien Klin Wochenschr**, v. 109, n. 1, p. 13-19, 1997.

KOHN, H.I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 82, n. 3, p. 292-300, 1944.

KUBRUSLY, M.; OLIVEIRA, C.M.C.; SANTOS, D.C.O.; MOTA, R.S.; PEREIRA, M.L. Análise comparativa entre a albumina pré- e pós dialise como indicadores do risco nutricional e de morbimortalidade em hemodiálise. **J Bras Nefrol**, v. 34, n. 1, p. 27-35, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0101-28002012000100005>.

KUNDOOR, N.; MOHANTY, S.; NARSINI, R.K.; KUMAR, T.N. Pro oxidants and Antioxidants Levels in Chronic Renal Failure Patients Treated by Dialysis. **Asian J Pharm Res Health Care**, v. 9, n. 2, p. 71-74, 2017. <https://doi.org/10.18311/ajprhc/2017/14740>.

KUSHIYAMA, A.; NAKATSU, Y.; MATSUNAGA, Y.; YAMAMOTOYA, T.; MORI, K.; UEDA, K.; INOUE, Y.; SAKODA, H.; FUJISHIRO, M.; ONO, H.; ASANO, T. Role of Uric Acid Metabolism-Related Inflammation in the Pathogenesis of Metabolic Syndrome Components Such as Atherosclerosis and Nonalcoholic Steatohepatitis. **Mediators Inflamm**, v. 2016, Article ID 8603164, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8603164>.

KWAN, B.C.H.; KRONENBERG, F.; BEDDHU, S.; CHEUNG, A.K. Lipoprotein Metabolism and Lipid Management in Chronic Kidney Disease. **Jour Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 4, p. 1246-1261, 2007. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006091006>.

LEE, C.H.; TSAI, C.M. Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpaldassay:measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyctonate and heptose at the inner corebyperiodat oxidation. **Anal Biochem**, v. 267, n. 1, p. 161-168, 1999.

LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-357, 1994.

LIAKOPOULOS, V.; ROUMELIOTIS, S.; GORNY, X.; DOUNOUSHI, E.; MERTENS, P.R. Oxidative Stress in Hemodialysis Patients: A Review of the Literature. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, Article ID 3081856, 2017. <http://doi.org/10.1155/2017/3081856>.

LINDEN, E.; CAI, W.; HE, J.C.; XUE, C.; LI, Z.; WINSTON, J.; VLASSARA, H.; URIBARRI, J. Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 3, n.3, p. 691-698, 2008. <https://dx.doi.org/10.2215%2FCJN.04291007>.

LING, X.C.; KUO, K.L. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Renal Replacement Therapy**, v. 4, n. 53, 2018. <https://doi.org/10.1186/s41100-018-0195-2>.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUSSIGNOLI, S.; FRACCAROLI, M.; ANDRIOLI, G.; BROCCO, G.; BELLAVITE, P. A Microplate-Based Colorimetric Assay of the Total Peroxyl Radical Trapping Capability of Human Plasma. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 1, p. 38-44, 1999. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4010>.

MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Human paraoxonase-1 (PON1): gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. **Gene**, v. 567, n. 1, p. 12-21, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.088>.

MADIAN, A.G.; REGNIER, F.E. Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites. **J Proteome Res**, v. 9, n. 8, p. 3766-3780, 2010. <https://dx.doi.org/10.1021%2Fpr1002609>.

MAIR, R.D.; SIRICH, T.L.; MEYER, T.W. Uremic Toxin Clearance and Cardiovascular Toxicities. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 6, 2018. <https://dx.doi.org/10.3390%2Ftoxins10060226>.

MAIUOLO, J.; OPPEDISANO, F.; GRATTERI, S.; MUSCOLI, C.; MOLLACE, V. Regulation of uric acid metabolism and excretion. **International Journal of Cardiology**, v. 213, n. 15, p. 8-14, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.109>.

MALLIARAKI, N.; MPLIAMPLIAS, D.; KAMPA, M.; PERAKIS, K.; MARGIORIS, A.N.; CASTANAS, E. Total and corrected antioxidant capacity in hemodialyzed patients. **BMC Nephrol**, v. 4, 2003. <https://dx.doi.org/10.1186%2F1471-2369-4-4>.

MALLIPATTU, S.K.; URIBARRI, J. Advanced glycation end product accumulation: a new enemy to target in chronic kidney disease?. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 23, n. 6, p. 547-554, 2014. <http://doi.org/doi:%2010.1097/MNH.0000000000000062>.

MALYSZKO, J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. **Clin Chim Acta**, v. 411, p. 1412-1420, 2010. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2010.06.019>.

MARSCHE, G.; FRANK, S.; HRZENJAK, A.; HOLZER, M.; DIRNBERGER, S.; WADSACK, C.; SCHARNAGL, H.; STOJAKOVIC, T.; HEINEMANN, A.; OETTL, K. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. **Circ Res**, v. 104, n. 6, p. 750-757, 2009. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.193169>.

MASSY, Z.A.; STENVINKEL, P.; DRUEKE, T.B. The role of oxidative stress in chronic kidney disease. **Semin Dial**, v. 22, n. 4, p. 405-408, 2009. <http://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2009.00590.x>.

MERZAH, K.S.; HASSON, S.F. The Biochemical Changes in Patients with Chronic Renal Failure. **International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 75-79, 2015.

MEUCCI, E.; MELE, M.C. Amino acids and plasma antioxidant capacity. **Amino Acids**, v. 12, p. 373-377, 1997.

MEYER, T.W.; HOSTETTER, T.H. Approaches to Uremia. **J Am Soc Nephrol**, v. 25, n. 10, p. 2151-2158, 2014. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013121264>.

MEYER, T.W.; HOSTETTER, T.H. Uremia. **N Engl J Med**, v. 357, n. 13, p. 1316-1325, 2007. <https://doi.org/10.1056/NEJMra071313>.

MICHISHITA, R.; MATSUDA, T.; KAWAKAMI, S.; KIYONAGA, A.; TANAKA, H.; MORITO, N.; HIGAKI, Y. The Association Between Unhealthy Lifestyle Behaviors and the Prevalence of Chronic Kidney Disease. **J Epidemiol**, v. 26, n. 7, p. 378-385, 2016. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20150202>.

MIKOLASEVIC, I.; ŽUTELIJA, M.; MAVRINAC, V.; ORLIC, L. Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease: etiology and management. **Int J Nephrol Renovasc Dis**, v. 10, p. 35-45, 2017. <https://dx.doi.org/10.2147%2FIJNRD.S101808>.

MIYAMOTO, Y.; IWAO, Y.; TASAKI, Y.; SATO, K.; ISHIMA, Y.; WATANABE, H.; KADOWAKI, D.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions. **FEBS Lett**, v. 584, n. 13, p. 2816-2820, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.046>.

MIYATA, T.; SUGIYAMA, S.; SAITO, A.; KUROKAWA, K. Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity ("carbonyl stress"). **Kidney Int Suppl**, v. 78, p. S25-S31, 2001.

MIYATA, T.; UEDA, Y.; YOSHIDA, A.; SUGIYAMA, S.; IIDA, Y.; JADOUL, M.; MAEDA, K.; KUROWAKA, K.; STRIHOU, C.V.Y. Clearance of pentosidine, an advanced glycation end product, by different modalities of renal replacement therapy. **Kidney International**, v. 51, n. 3, p. 880-887, 1997.

MODARESI, A.; NAFAR, M.; SAHRAEI, Z. Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. **Iran J Kidney Dis**, v. 9, n. 3, p. 165-179, 2015.

MODLINGER, P.S.; WILCOX, C.S.; ASLAM, S. Nitric Oxide, Oxidative Stress and Progression of Chronic Renal Failure. **Seminars in Nephrology**, v. 24, n. 4, p. 354-365, 2004.

MONTEIRO, T.; OLIVEIRA, F.; FINS, A.; DIAS, C.G.; SILVEIRA, C.M.; PEREIRA, A.S.; ALMEIDA, M.G. Assessment of human paraoxonase activity by electrochemistry: a simple and novel approach. **Anal. Methods**, v. 8, n. 46, p. 8141-8146, 2016. <http://doi.org/10.1039/C6AY01944G>.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009. <http://doi.org/10.1021/jf803537k>.

MORENA, M.; CRISTOL, J.P.; BOSC, J.Y.; TETTA, C.; FORRET, G.; LEGER, C.L.; DELCOURT, C.; PAPOZ, L.; DESCOMPS, B.; CANAUD, B. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17, n. 3, p. 422-427, 2002. <https://doi.org/10.1093/ndt/17.3.422>.

MORENA, M.; CRISTOL, J.P.; CANAUD, B. Why hemodialysis patients are in a prooxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance. **Blood Purif**, v. 18, n. 3, p. 191-199, 2000.

MÜNCH, G.; KEIS, R.; WESSELS, A.; RIEDERER, P.; BAHNER, U.; HEIDLAND, A.; NIWA, T.; LEMKE, H.D.; SCHINZEL, R. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, v. 35, n. 9, p. 669-677, 1997.

NAKHOUL, G.N.; HUANG, H.; ARRIGAIN, S.; JOLLY, S.E.; SCHOLD, J.D.; NALLY, J.V.R.; NAVANEETHAN, S.D. Serum Potassium, End-Stage Renal Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease. **Am J Nephrol**, v. 41, n. 6, p. 456-463, 2015. <http://doi.org/10.1159/000437151>.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. **About Chronic Kidney Disease: Symptoms and causes**. New York, NY. Disponível em: <http://www.kidney.org/kidneydisease/aboutckd>. Acesso: 05 maio 2017.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. NKF-DOQI Clinical practice guidelines and clinical practice recommendations, 2006 updates hemodialysis adequacy, peritoneal dialysis adequacy, vascular access. **Am J Kidney Dis**, v. 48, n. 1, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1250 p.

NEUZIL, J.; STOCKER, R. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. **FEBS Letters**, v. 331, n. 3, p. 281-284, 1993.

NIE, Z.; DENG, S.; ZHANG, L.; CHEN, S.; LU, Q.; PENG, H. Crocin protects against dexamethasone-induced osteoblast apoptosis by inhibiting the ROS/Ca²⁺ mediated mitochondrial pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 1, p. 401-408, 2019. <https://dx.doi.org/10.3892%2Fmmr.2019.10267>.

OBERG, B.P.; MCMENAMIN, E.; LUCAS, F.L.; MCMONAGLE, E.; MORROW, J.; IKIZLER, T.A.; HIMMELFARB, J. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 65, n. 3, p. 1009–1016, 2004.

OBRADOR, G.T.; PEREIRA, B.J. Systemic complications of chronic kidney disease. Pinpointing clinical manifestations and best management. **Postgrad Med**, v. 111, n. 2, p. 115-122, 2002.

OLENIUC, M.; SECARA, I.; ONOFRIESCU, M.; HOGAS, S.; VORONEANU, L.; SIRIOPOL, D.; COVIC, A. Consequences of Advanced Glycation End Products Accumulation in Chronic Kidney Disease and Clinical Usefulness of Their Assessment Using a Non-invasive Technique – Skin Autofluorescence. **Maedica (Buchar)**, v. 6, n. 4, p. 298-307, 2011.

OLIVEIRA, S.; SOUZA, G.A.; ECKERT, C.R.; SILVA, T.A.; SOBRAL, E.S.; FÁVERO, A.O.; FERREIRA, M.J.P.; ROMOFF, P.; BAADER, W. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, p. 497-503, 2014. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140076>.

OSAWA, C.C.; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Quim Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000400019>.

PANG, P.; ABBOTT, M.; ABDI, M.; FUCCI, Q.A.; CHAUHAN, N.; PROCTOR, M.M.B.; CHIN, M.; WANG, B.; YIN, W.; LU, T.S.; LIM, A.H.K.; HANDY, D.E.; LOSCALZO, J.; SIEDLECKI, A.M. Pre-clinical model of severe glutathione peroxidase-3 deficiency and chronic kidney disease results in coronary artery thrombosis and depressed left ventricular function. **Nephrol Dialysis Transplant**, v. 33, n. 6, p. 923-934, 2018. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx304>.

PASALIC, D.; MARINKOVIC, N.; TURKOVIC, L.F. Uric acid as one of the important factors in multifactorial disorders – facts and controversies. **Biochem Med (Zagreb)**, v. 22, n. 1, p. 63–75, 2012. <https://dx.doi.org/10.11613%2Fbm.2012.007>.

PEDRUZZI, L.M.; CARDOZO, L.F.M.F.; MEDEIROS, R.F.; STOCKLER-PINTO, M.B.; MAFRA, D. Association between serum ferritin and lipid peroxidation in hemodialysis patients. **J Bras Nefrol**, v. 37, n. 2, p. 171-176, 2015. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20150028>.

PEHLIVAN, F.E. Vitamin C: an antioxidant agent. **IntechOpen**, v. 2, p. 23-36, 2017. <http://doi.org/10.5772/intechopen.69660>.

PENNACCHI, P.C.; ALMEIDA, M.E.; GOMES, O.L.; FAIÃO-FLORES, F.; CREPALDI, M.C.A.; SANTOS, M.F.; BARROS, S.B.M.; MARIA-ENGLER, S.S. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. **Tissue Eng Part A**, v. 21, p. 2417-2425, 2015. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2015.0009>.

PERCY, C.J.; BROWN, L.; POWER, D.A.; JOHNSON, D.W.; GOBE, G.C. Obesity and hypertension have differing oxidant handling molecular pathways in age-related chronic kidney disease. **Mech Ageing Dev**, v. 130, n. 3, p. 129-138, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.10.003>.

PEREIRA, D.M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J.A.; ANDRADE, P.B. Phenolics: From Chemistry to Biology. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2202-2211, 2009. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fmolecules14062202>.

PERKOVIC, V.; AGARWAL, R.; FIORETTO, P.; HEMMELGARN, B.R.; LEVIN, A.; THOMAS, M.C.; WANNER, C.; KASISKE, B.L.; WHEELER, D.C.; GROOP, P.H. Management of patients with diabetes and CKD: conclusions from a “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference. **Kidney International**, v. 90, n. 6, p. 1175-1183, 2016. <http://doi.org/10.1016/j.kint.2016.09.010>.

PIENIAZEK, A.; GWOZDZINSKI, L.; ZBROG, Z.; GWOZDZINSKI, K. Alterations in conformational state of albumin in plasma in chronic hemodialyzed patients. **Plos One**, v. 13, n. 3, Article ID e0192268, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192268>.

PINHEIRO, G.R.C. Revendo a orientação dietética na gota. **Rev. Bras. Reumatol**, v. 48, n. 3, p. 157-161, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042008000300005>.

PORTO, J.R.; GOMES, K.B.; FERNANDES, A.P.; DOMINGUETI, C.P. Avaliação da função renal na doença renal crônica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 1, p. 26-35, 2017. <http://doi.org/10.21877/2448-3877.201500320>.

PRUNOTTO, M.; BUDD, D.C.; MEIER, M.; FORMENTINI, I.; HARTMANN, G.; POMPOSIELLO, S.; MOLL, S. From acute injury to chronic disease: pathophysiological hypothesis of an epithelial/mesenchymal crosstalk alteration in CKD. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, n. 3, p. 43-50, 2012. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs283>.

PURDEL, N.C.; MARGINA, D.; ILIE, M. Current Methods Used in the Protein Carbonyl Assay. **Annual Research & Review in Biology**, v. 4, n. 12, p. 2015-2026, 2014. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2014/8763>.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P.J. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 93, n. 4, p. 803–813, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.11.034>.

RAJU, D.S.; LALITHA, D.L.; KIRANMAYI, P. A Study of Lipid Profile and Lipid Peroxidation in Chronic Kidney Disease with Special Reference to Hemodialysis. **J Clinic Res Bioeth**, v. 4, n. 1, p. 100-113, 2013. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9627.1000143>.

RATLIFF, B.B.; ABDULMAHDI, W.; PAWAR, R.; WOLIN, M.S. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 25, n. 3, p. 119-146, 2016. <https://dx.doi.org/10.1089%2Fars.2016.6665>.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol Med**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REESE, G.N.; APPEL, S.H. Neurologic complications of renal failure. **Semin Nephrol**, v. 1, p. 137-142, 1981.

ROCHE, M.; RONDEAU, P.; SINGH, N.R.; TARNUS, E.; BOURDON, E. The antioxidant properties of serum albumin. **FEBS Letters**, v. 582, n. 13, p. 1783-1787, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.057>.

ROMAGNANI, P.; REMUZZI, G.; GLASSOCK, R.; LEVIN, A.; JAGER, K.J.; TONELLI, M.; MASSY, Z.; WANNER, C.; ANDERS, H.J. Chronic Kidney Disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, Article ID 17088, 2017. <http://doi.org/10.1038/nrdp.2017.88>.

ROMÃO JE. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **J Bras Nefrol**, v. 26: n. 1, p. 1-3, 2004.

RUBIO, C.P.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J.J. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. **BMC Vet Res**, v. 12, n. 1, Article ID 166, 2016. <http://doi.org/10.1186/s12917-016-0792-7>.

RUSH, J.W.; SANDIFORD, S.D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clin Biochem**, v. 36, n. 5, p. 345-351, 2003.

RUSKOVSKA, T.; JANSEN, E.H.J.M.; ANTAROROV, R. Evaluation of assays for measurement of serum (anti)oxidants in hemodialysis patients. **BioMed Research**

Intern, v. 2014, Article ID 843157, 2014.
<https://dx.doi.org/10.1155%2F2014%2F843157>.

SAM, R. Hemodialysis: Diffusion and Ultrafiltration. **Austin J Nephrol Hypertens**, v. 1, n. 2, Article ID 1010, 2014.

SATOH, M. Endothelial dysfunction as an underlying pathophysiological condition of chronic kidney disease. **Clin Exp Nephrol**, v. 16, n. 4, p. 518-521, 2012.
<http://doi.org/10.1007/s10157-012-0646-y>.

SAUTIN, Y.Y.; JOHNSON, R.J. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 27, n. 6, p. 608-619, 2008.
<https://doi.org/10.1080/15257770802138558>.

SCHIFFRIN, E.L.; LIPMAN, M.L.; MANN, J.F. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. **Circulation**, v. 116, n. 1, p. 85-97, 2007.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SCHNEDITZ, D.; PLATZER, D.; DAUGIRDAS, J.T. A diffusion-adjusted regional blood flow model to predict solute kinetics during haemodialysis. **Nephrol Dialysis Transpl**, v. 24, n. 7, p. 2218-2224, 2009. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp023>.

SHUNMOOGAM, N.; NAIDOO, P.; CHILTON, R. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. **Vascular Health and Risk Management**, v. 14, p. 137-143, 2018.
<https://dx.doi.org/10.2147%2FVHRM.S165173>.

SILVA, M.M.H.; BRUNE, M.F.S.S. Importância do cálculo da taxa de filtração glomerular na avaliação da função renal de adultos. **Rev Bras Farm**, v. 92, n. 3, p. 160-165, 2011.

SMALL, D.M.; COOMBES, J.S.; BENNETT, N.; JOHNSON, D.W.; GOBE, G.C. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. **Nephrology**, v. 17, n. 4, p. 311-321, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2012.01572.x>.

SÖNMEZ, M.G.; KOZANHAN, B.; DENİZ, C.D.; GÖĞER, Y.E.; KILINÇ, M.T.; NEŞELİOĞLU, S.; ERE, Ö. Is oxidative stress measured by thiol/disulphide homeostasis status associated with prostate adenocarcinoma? **Cent Eur J Immunol**, v. 43, n. 2, p. 174-179, 2018. <http://doi.org/10.5114/ceji.2017.72285>.

SPANIDIS, Y.; PRIFTIS, A.; STAGOS, D.; STRAVODIMOS, G.A.; LEONIDAS, D.D.; SPANDIDOS, D.A.; TSATSAKIS, A.M.; KOURETAS, D. Oxidation of human serum albumin exhibits inter-individual variability after an ultra-marathon mountain race. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 5, p. 2382-2390, 2017.
<http://doi.org/10.3892/etm.2017.4268>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. São Paulo: Editora Clannad, 2017. *E-book*. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2019.

SO, A.; THORENS, B. Uric acid transport and disease. **J Clin Invest**, v. 120, n. 6, p. 1791-1799, 2010. <https://doi.org/10.1172/JCI42344>.

SOEJIMA, A.; MATSUZAWA, N.; HAYASHI, T.; KIMURA, R.; OOTSUKA, T.; FUKUOKA, K.; YAMADA, A.; NAGASAWA, T.; ERA, S. Alteration of redox state of human serum albumin before and after hemodialysis. **Blood Purif**, v. 22, n. 6, p. 525-529, 2004.

SOEJIMA, A.; MATSUZAWA, N.; MIYAKE, N.; KARUBE, M.; FUKUOKA, K.; NAKABAYASHI, K.; KITAMOTO, K.; NAGASAWA, T. Hypoalbuminemia accelerates erythrocyte membrane lipid peroxidation in chronic hemodialysis patients. **Clin Nephrol**, v. 51, n. 2, p. 92-97, 1999.

STINGHEN, A.E.M.; MASSY, Z.A.; VLASSARA, H.; STRIKER, G.E.; BOULLIER, A. Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD. **J Am Soc Nephrol**, v. 27, n. 2, p. 354-370, 2016. <https://dx.doi.org/10.1681%2FASN.2014101047>.

SUNG, C.C.; HSU, Y.C.; CHEN, C.C.; LIN, Y.F.; WU, C.C. Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, Article ID 301982, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/301982>.

SUZUKI, Y.J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D.A. Protein Carbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 3, p. 323 - 325, 2010. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2887>.

TERAWAKI, H.; TAKADA, Y.; ERA, S.; FUNAKOSHI, Y.; NAKAYAMA, K.; NAKAYAMA, M.; OGURA, M.; ITO, S.; HOSOYA, T. The redox state of albumin and serious cardiovascular incidence in hemodialysis patients. **Ther Apher Dial**, v. 14, n. 5, p. 465-471, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1744-9987.2010.00841.x>.

TANNOCK, LISA. Dyslipidemia in Chronic Kidney Disease. South Dartmouth: Endotext [Internet], 2018. *E-book*. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305899/#_NBK305899_pubdet_. Acesso em: 05 mar. 2019.

THE KIDNEY DISEASE IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO). **Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease**. Kidney International Supplements, v. 3, n. 1, 2012.

THOMÉ, F.S.; SESSO, R.C.; LOPES, A.A.; LUGON, J.R.; MARTINS, C.T. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2017. **J Bras Nefrol**, v. 41, n. 2, p. 208-214, 2019. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-2018-0178>.

THOMSEN, R.W.; NICOLAISEN, S.K.; HASVOLD, P.; SANCHEZ, R.G.; PEDERSEN, L.; ADELBORG, K.; EGSTRUP, K.; EGFJORD, M.; SØRENSEN, H.T. Elevated potassium levels in patients with chronic kidney disease: occurrence, risk factors and clinical outcomes - a Danish population-based cohort study. **Nephrol Dialysis Transplant**, v. 33, n. 9, p. 1610-1620, 2018. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx312>.

THORNALLEY, P.J. Glycation free adduct accumulation in renal disease: the new AGE. **Pediatr Nephrol**, v. 20, n. 11, p. 1515-1522, 2005.

TUBARO, F.; GHISELLI, A.; RAPUZZI, P.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. **Free Rad Biol Med**, v. 24, p. 1228-1234, 1998.

TUCKER, P.S.; DALBO, V.J.; HAN, T.; KINGSLEY, M.I. Clinical and research markers of oxidative stress in chronic kidney disease. **Biomarkers**, v. 18, n. 2, p. 103-115, 2013. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2012.749302>.

UJHELYI, L.; BALLA, G.; JENEY, V.; VARGA, Z.; NAGY, E.; VERCELLOTTI, G.M.; AGARWAL, A.; EATON, J.W.; BALLA, J. Hemodialysis reduces inhibitory effect of plasma ultrafiltrate on LDL oxidation and subsequent endothelial reactions. **Kidney Int**, v. 69, n. 1, p. 144-151, 2006.

VANHOLDER, R.; GRYP, T.; GLORIEUX, G. Urea and chronic kidney disease: the comeback of the century? (in uraemia research). **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 33, n. 1, p. 4-12, 2018. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx039>.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, B.J.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>.

VAZIRI, N.D.; KHAZAELI, M.; NUNES, A.C.F.; HARLEY, K.T.; SAID, H.; ALIPOUR, O.; LAU, W.L.; PAHL, M. Effects of end-stage renal disease and dialysis modalities on blood ammonia level. **Hemodial Int**, v. 21, n. 3, p. 343-347, 2017. <https://dx.doi.org/10.1111%2Fhdi.12510>.

VECCHI, A.F.; BAMONTI, F.; NOVEMBRINO, C.; IPPOLITO, S.; GUERRA, L.; LONATI, S.; SALINI, S.; AMAN, C.S.; SCURATI-MANZONI, E.; CIGHETTI, G. Free and total plasma malondialdehyde in chronic renal insufficiency and in dialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 24, n. 8, p. 2524-2529, 2009. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp102>.

WALKER, H.K.; HALL, W.D.; HURST, J.W. **Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations**. 3.ed. Boston: Butterworths, 1990. 1118 p.

WARD, R.A., MCLEISH, K.R. Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors? **Artif Organs**, v. 27, n. 3, p. 230-236, 2003.

WARD, R.A.; OUSEPH, R.; MCLEISH, K.R. Effects of high-flux hemodialysis on oxidant stress. **Kidney International**, v. 63, n. 1, p. 353-359, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00741.x>.

WARD, R.A.; MCLEISH, K.R. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. **J Am Soc Nephrol**, v. 5, n. 9, p. 1697-1702, 1994.

WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; BARCLAY, L.R.C.; LOCKE, S.J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 924, n. 3, p. 408-419, 1987.

WEINER, D.I.; MITCH, W.E.; SANDS, J.M. Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 10, n. 8, p. 1444–1458, 2015. <http://doi.org/10.2215/CJN.10311013>.

WENG, S.L.; HUANG, K.Y.; KAUNANG, F.J.; HUANG, C.H.; KAO, H.J.; CHANG, T.H.; WANG, H.Y.; LU, J.J.; LEE, T.Y. Investigation and identification of protein carbonylation sites based on position specific amino acid composition and physicochemical features. **BioMed Central Bioinformatics**, v. 18, Article ID 66, 2017.

WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J Clin Invest**, v. 88, n. 6, p. 1785-1792, 1991. <https://dx.doi.org/10.1172%2FJCI115499>.

WRATTEN, M.L.; GALARIS, D.; TETTA, C.; SEVANIAN, A. Evolution of oxidative stress and inflammation during hemodialysis and their contribution to cardiovascular disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 4, n. 6, p. 935-944, 2002.

YACoub, R.; NUGENT, M.; CAI, W.; NADARNI, G.N.; CHAVES, L.D.; ABYAD, S.; HONAN, A.M.; THOMAS, S.A.; ZHENG, W.; VALIYAPARAMBIL, S.A.; BRYNIARSI, M.A.; SUN, Y.; BUC, M.; GENCO, R.J.; QUIGG, R.J.; HE, J.C.; URIBARRI, J. Advanced glycation end products dietary restriction effects on bacterial gut microbiota in peritoneal dialysis patients; a randomized open label controlled trial. **Plos One**, v. 12, n. 9, Article ID e0184789, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184789>.

YAMAMOTO, S.; KAZAMA, J.J.; WAKAMATSU, T.; TAKAHASHI, Y.; KANEKO, Y.; GOTO, S.; NARITA, I. Removal of uremic toxins by renal replacement therapies: a review of current progress and future perspectives. **Renal Replacement Therapy**, v. 2, Article ID 43, 2016.

ZACHARA, B.A.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICZ, W.; ZBRÓG, Z. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. **Acta Biochim Pol**, v. 53, n. 4, p. 663-677, 2006.

ZARGARI, M.; SEDIGHI, O. Influence of Hemodialysis on Lipid Peroxidation, Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Capacity in Chronic Renal Failure Patients. **Nephrourol Mon**, v. 7, n. 4, Article ID e28526, 2015. <http://dx.doi.org/10.5812/numonthly.28526>.

ZILIN, S.; NAIFENG, L.; BICHENG, L.; JIPING, W. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clin Chim Acta**, v. 313, p. 69-75, 2001.

ANEXO I
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1ª via participante

Dados de identificação

Nome do participante: _____
Idade: _____ RG: _____, Residente na _____
nº _____, Bairro: _____
Cidade: _____, Telefone: _____

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), do projeto de pesquisa **“Avaliação de biomarcadores séricos do estresse oxidativo e do potencial antioxidante em pacientes renais crônicos submetidos ao tratamento hemodialítico”**, que tem como pesquisador responsável Profa. Dra. Amanda Martins Baviera.

Leia cuidadosamente o que segue e me pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, e caso aceite participar do estudo, assine ao final deste documento, que consta em duas vias. Uma via pertence a você e a outra ao pesquisador responsável. Em caso de recusa você não sofrerá nenhuma penalidade.

Você está sendo esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por objetivo analisar nas amostras de sangue as mudanças nos níveis de radicais livres, isto é, substâncias que podem causar problemas à saúde, e mudanças nos níveis de compostos antioxidantes, ou seja, aqueles que ajudam na proteção contra os radicais livres, em indivíduos com doença renal crônica, antes e após uma sessão de hemodiálise, e em indivíduos sem doença renal crônica ou qualquer outra doença.
2. Você, participante, não receberá nenhum benefício direto, mas com a doação de amostra do seu sangue você estará colaborando com informações importantes relacionadas às alterações nos radicais livres e nos compostos antioxidantes que podem ocorrer durante a sessão de hemodiálise em indivíduos com a doença renal crônica. Estas informações podem ajudar futuramente no diagnóstico, prevenção e tratamento da doença renal crônica quando o indivíduo é submetido à hemodiálise.
3. Sua participação como voluntário, ou seja, a coleta de amostra, deverá ocorrer no período entre o 1º e 2º semestres de 2018 (12 meses).
4. Serão coletadas para a realização desta pesquisa amostras de sangue (8 mL de sangue, 4 mL antes da sessão de hemodiálise e 4 mL após a sessão) que serão utilizadas exclusivamente para esta pesquisa, não podendo ser reutilizadas em pesquisa posterior.

Araraquara, ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

5. Ao participar desta pesquisa, você, voluntário, estará exposto a um risco mínimo inerente aos procedimentos da coleta para doação de sangue ou procedimentos da sessão de hemodiálise, pois serão coletadas as amostras de sangue pela própria equipe de enfermagem do local, aproveitando a mesma punção venosa para a coleta das amostras biológicas já usadas na rotina.
6. As amostras serão obtidas nos seguintes locais: para os indivíduos sem doença renal crônica ou qualquer outra doença: Hemonúcleo Regional de Araraquara; e para os indivíduos com doença renal crônica em hemodiálise: Centro de Referência Regional de Hemodiálise, da cidade de Araraquara, SP.
7. Gostaríamos de pedir autorização para consultar suas informações nos prontuários médicos do Hemonúcleo Regional de Araraquara ou do Centro de Referência Regional de Hemodiálise de Araraquara.
8. Você, participante, não terá nenhum gasto financeiro ao participar deste estudo.
9. Seu nome será mantido em segredo, garantindo assim a sua privacidade e se desejar, você será informado sobre os resultados desta pesquisa.
10. Caso você, participante, sofra algum dano durante esta pesquisa, o pesquisador responsável cuidará da reparação.
11. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, você poderá entrar em contato com a equipe científica do projeto pelo telefone do Setor de Bioquímica do Centro de Referência Diagnóstica da Unidade Auxiliar, Núcleo de Atendimento à Comunidade, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Câmpus de Araraquara.
12. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897 ou entrar em contato com o pesquisador responsável: Professora Doutora Amanda Martins Baviera, pelo telefone (0XX16) 3301-5724 e por e-mail: baviera@fcfar.unesp.br.
13. Você, participante, poderá se recusar a participar da realização desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ou penalização (isto é, sem interrupção do seu tratamento, quando for o caso).

Declaro que concordo em participar da pesquisa

Araraquara, ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

ANEXO II**Termo de doação de material biológico**

Eu, _____,
RG _____, nacionalidade _____, maior
e responsável, estado civil _____, profissão _____,
residente _____
_____, cidade _____, estado _____, no pleno gozo de
minhas faculdades mentais e de minha livre e espontânea vontade
autorizo _____ a retirar amostra de meu sangue, a qual
será doada e utilizada na pesquisa do curso de mestrado em Ciências Farmacêuticas, da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, intitulado de: **“Avaliação de
biomarcadores séricos do estresse oxidativo e do potencial antioxidante em
pacientes renais crônicos submetidos ao tratamento hemodialítico”**, sob a
responsabilidade da Profa. Dra. Amanda Martins Baviera, Professora Responsável pelo
do Setor de Bioquímica do Centro de Referência Diagnóstica da Unidade Auxiliar,
Núcleo de Atendimento à Comunidade, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
UNESP, Câmpus de Araraquara e do aluno de mestrado Marcel Benedete Marques.

Araraquara, ____/____/____

Assinatura