

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIUSEPPE BIONDI BATISTA

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA BASEADA EM HPLC E
DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DO
POTENCIAL DE REDUÇÃO PLASMÁTICO DE PACIENTES COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

CURITIBA

2010

GIUSEPPE BIONDI BATISTA

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA BASEADA EM HPLC E
DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DO
POTENCIAL DE REDUÇÃO PLASMÁTICO DE PACIENTES COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós Graduação em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia
da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lia S. Nakao

Co-orientador: Prof^o Dr. Silvio Marques
Zanata

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Batista, Giuseppe Biondi

Padronização de metodologia baseada em HPLC e detecção eletroquímica para determinação do potencial de redução plasmático de pacientes com doença renal crônica. / Giuseppe Biondi Batista. – Curitiba, 2010.

60 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Lia Sumie Nakao

Co-orientador: Silvio Marques Zanata

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Rins - Doenças 2. Cromatografia líquida de alta eficiência I. Título II. Nakao, Lia Sumie III. Zanata, Silvio Marques IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 543.0894



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

TERMO DE APROVAÇÃO

“Padronização de metodologia baseada em HPLC e detecção eletroquímica para determinação do potencial de redução plasmático de doentes renais”

por

GIUSEPPE BIONDI BATISTA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada por:

Prof^a. Dr^a. Lia Sumie Nakao (presidente)

Prof^a. Dr^a. Karin Braun-Prado

Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho

Prof^a. Dr^a. Adriana Frohlich Mercadante
Membro Suplente

Curitiba, 13 de julho de 2010

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a minha família, meu pai, minha mãe e meu irmão, que me incentivaram a começar, me ajudaram a fazer e, principalmente, fizeram de tudo para eu terminar esse mestrado.

Também quero agradecer a Lia, pela orientação e paciência.

Essa dissertação não teria chegado ao fim sem meus amigos: Patrícia, Axel, Silvia, Karime, Paulo, Juliana, Celso, Mônica e principalmente Helena e Max. Quando tudo dava errado, eles estavam lá para me ajudar, ou atrapalhar - o que fosse mais necessário no momento.

Não posso deixar de agradecer ao Dr. Roberto Pecoits e todos os seus pacientes que gentilmente doaram seu sangue para o trabalho.

E a CAPES por ter me financiado durante esses dois anos.

Tenho que agradecer também a Ju, que foi a melhor coisa que o mestrado me trouxe.

E a Deus.

RESUMO

Há um esforço mundial no sentido de validar biomarcadores de estresse oxidativo e os potenciais de redução dos pares tióis/dissulfetos, principalmente o par cisteína/cistina, tem sido amplamente estudado com este fim. Por este motivo, padronizar um método para avaliar se o estado redox extracelular de fato pode ser empregado para quantificar clinicamente o estresse oxidativo poderia facilitar o entendimento do papel do estresse oxidativo em estudos clínicos. Com este objetivo, este estudo se propôs a padronizar um método baseado em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e detecção coulométrica e utilizá-lo para avaliar o estado redox plasmático do par cisteína/cistina durante a progressão da doença renal crônica, já que a doença renal crônica é uma patologia intimamente relacionada com o estresse oxidativo e necessita de um estudo mais abrangente e sistemático para se determinar quantitativamente o estresse oxidativo durante a sua progressão. Foram padronizados aspectos da cromatografia, detecção coulométrica, precipitação de proteínas, quantificação da cisteína e cistina, coleta e armazenamento do plasma. Foi utilizado plasma coletado de pacientes renais e doadores saudáveis, num total de 43 pessoas, para a análise do potencial de redução do par cisteína/cistina durante a progressão da doença renal. Os resultados demonstraram uma tendência de aumento do potencial de redução a partir do estágio 4 da doença renal e um aumento mais significativo no grupo de pacientes em estágio 5 em diálise, sugerindo um maior estresse oxidativo nesses estágios onde a uremia sabidamente se revela mais presente. Concluiu-se a partir desses dados que o método foi padronizado com sucesso, entretanto, será necessário um número maior de indivíduos estudados para resultados estatisticamente mais relevantes no que diz respeito ao estresse oxidativo na progressão renal.

Palavras-chave: estresse oxidativo, cisteína, cistina, plasma humano.

ABSTRACT

There is a worldwide effort to validate biomarkers of oxidative stress and the reduction potentials of couples thiols/disulfides, particularly cysteine/cystine, which has been widely studied for this purpose. Therefore, to standardize a method to assess whether the extracellular redox state in fact can be used clinically to quantify oxidative stress could facilitate the understanding of the role of oxidative stress in clinical studies. With this objective, this study was to standardize a method based on high performance liquid chromatography (HPLC) and coulometric detection and use it to evaluate the plasma redox state of the pair cysteine/cystine during the progression of chronic kidney disease, since chronic kidney disease is a disease closely related to oxidative stress and needs a more comprehensive and systematic study to quantitatively determine the oxidative stress during its progression. Were standardized aspects of chromatography, coulometric detection, protein precipitation, and quantification of cysteine and cystine, collection and storage of plasma. The plasma used was collected from healthy donors and renal patients, a total of 43 people, for the analysis of the plasma reduction potential of cysteine/cystine during the progression of renal disease. The results showed an increasing trend in reduction potential from the fourth stage of renal disease and a greater increase in patients in stage 5 on dialysis, suggesting an increased oxidative stress in those stages where uremia is most present. It was concluded from these data that the method was standardized with success, however, will require a larger number of subjects studied for more statistically relevant results regarding the oxidative stress in renal progression.

Key words: oxidative stress, cysteine, cystine, human plasma.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RIM	15
FIGURA 2 -	CROMATOGRAMAS DE PADRÕES DE 60 μ M de CISTEÍNA E CISTINA (B) E PLASMA HUMANO (A)	37
FIGURA 3 -	VOLTAMOGRAMAS DE CISTEÍNA E CISTINA	38
FIGURA 4 -	CURVAS DE CONCENTRAÇÃO	40
FIGURA 5 -	FATOR DE CORREÇÃO	41
FIGURA 6 -	POTENCIAL DE REDUÇÃO PLASMÁTICO DOS GRUPOS PESQUISADOS	46
FIGURA 7 -	DIAGRAMA SIMPLIFICADO DO METABOLISMO DE AMINOTIÓIS	48
FIGURA 8 -	CORRELAÇÃO ENTRE A TFG E O POTENCIAL REDOX DE TODOS OS INDIVÍDUOS PESQUISADOS (A) E GRÁFICO DA CORRELAÇÃO EXCLUINDO OS INDIVÍDUOS DIABÉTICOS (B)	49
FIGURA 9 -	CONTEÚDO CARBONÍLICO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	DADOS DAS POPULAÇÕES	43
TABELA 2 -	NÍVEIS DE CREATININA E URÉIA PLASMÁTICOS DOS INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS SELECIONADOS	44
TABELA 3 -	SUBDIVISÃO DA POPULAÇÃO DE PACIENTES	45
TABELA 4 -	CONCENTRAÇÕES DE CISTEÍNA E CISTINA E POTENCIAIS DE REDUÇÃO DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS	47

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	DOENÇAS QUE PODEM CAUSAR DRC	20
QUADRO 2 -	ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL	20
QUADRO 3 -	SINAIS E SINTOMAS DA UREMIA	22
QUADRO 4 -	ALGUNS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	27
QUADRO 5 -	PARÂMETROS IDEAIS ENCONTRADOS	36

LISTA DE ABREVIATURAS

HPLC	-	High Performance Liquid Chromatography
CyS	-	Cisteína
CySS	-	Cistina
TFG	-	Taxa de Filtração Glomerular
MDRD	-	Modification of Diet in Renal Disease
DRC	-	Doença Renal Crônica
GSH	-	Glutathiona
GSSG	-	Glutathiona Dissulfeto
E_0	-	Potencial padrão de redução
E_h	-	Potencial de redução
DTPA	-	Diethylenetriamine-Pentaacetic Acid
DTNB	-	Ácido 5,5'- Ditio-Bis-(2-Nitrobenzóico)
BPDS	-	Bathophenanthroline Disulfonate Sodium Salt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS GERAIS	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	ESTRUTURA RENAL E FORMAÇÃO DA URINA	15
2.1.1	Medida da função renal	17
2.2	DOENÇA RENAL CRÔNICA	19
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO	23
2.3.1	Potencial de redução	24
2.3.2	O par redox cisteína/cistina	25
2.3.3	Metodologias utilizadas para análise de cisteína e cistina	26
2.3.4	Outros biomarcadores de estresse oxidativo	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	28
3.2	COLETA DE SANGUE	28
3.3	REAGENTES QUÍMICOS	29
3.4	SOLUÇÕES	29
3.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	30
3.6	DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DAS CONCENTRAÇÕES DOS PADRÕES DE CISTEÍNA E CISTINA	31
3.7	PREPARAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS	32
3.8	CÁLCULO DOS POTENCIAIS DE REDUÇÃO	32
3.9	DETECÇÃO DE CARBONILAS EM PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	33
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO	35
4.1.1	Cromatografia	35
4.1.2	Detecção coulométrica.....	37
4.1.3	Precipitação de proteína.....	39
4.1.1	Quantificação de cisteína e cistina.....	39
4.1.5	Coleta e armazenamento do plasma	41

4.2	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	42
4.3	ANÁLISE DO POTENCIAL DE REDUÇÃO PLASMÁTICO DE PACIENTES RENAIIS	45
4.4	ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DA DETECÇÃO DO CONTEÚDO CARBONÍLICO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	49
5	CONCLUSÃO	51
6	REFERENCIAS	52
	APÊNDICE	59

1 INTRODUÇÃO

A fisiopatologia da doença renal crônica (DRC) tem sido extensivamente investigada por ser uma doença freqüente, 16,8% da população dos EUA com mais de 20 anos se enquadra em algum estágio da doença (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2007), e com alta taxa de mortalidade em seu estágio final, sendo a doença cardiovascular prematura a complicação que mais causa morte (YAO *et al.*, 2004, DIAZ-BUXO E WOODS, 2006). O estresse oxidativo tem sido descrito como importante protagonista da doença renal crônica (CLERMONT *et al.*, 2000; LOCATELLI *et al.*, 2003; VAZIRI *et al.*, 2003), uma vez que diversos produtos de oxidação encontram-se elevados nos tecidos dos doentes, principalmente naqueles em hemodiálise (HIMMELFARB *et al.*, 2000; DESCHAMPS-LATSCHA *et al.*, 2001). Estudos mostraram que a oxidação de resíduos de cisteína na albumina (que pode ser considerada também um marcador de estresse oxidativo) e a carbonilação de proteínas plasmáticas aumenta progressivamente com o avanço da doença crônica (MATSUYAMA *et al.*, 2009). Recentemente foi demonstrado que a uremia provoca uma desregulação na homeostase de células endoteliais em cultura, ativando a produção de espécies reativas de oxigênio (WERNECK *et al.*, 2006). Contudo, existe uma lacuna a ser preenchida na determinação quantitativa do estresse oxidativo plasmático durante a progressão da doença renal crônica, sendo que um estudo abrangente, mais sistemático, poderia ser de importante contribuição.

Há um esforço mundial no sentido de validar biomarcadores de estresse oxidativo (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004) e os potenciais de redução dos pares tióis/dissulfetos, como glutathiona/glutathiona dissulfeto e cisteína/cistina. Por essas duplas serem um alvo central dos mecanismos de estresse oxidativo (JONES, 2006) e serem mantidas sob condições de não equilíbrio estável em sistemas biológicos (JONES, 2008), os valores dos seus potenciais de redução fornecem uma maneira conveniente de se quantificar o estresse oxidativo.

Neste panorama, padronizar um método para avaliar se o estado redox extracelular de fato pode ser empregado para quantificar clinicamente o estresse oxidativo poderia facilitar o entendimento do papel do estresse oxidativo em estudos

clínicos. Para isso, a progressão da doença renal crônica apresenta-se como um modelo muito interessante, por ser uma doença crônica, com reconhecido componente oxidativo (CLERMONT *et al.*, 2000; LOCATELLI *et al.*, 2003; VAZIRI *et al.*, 2003), por ser sistêmica e por ter respondido à terapia com N-acetilcisteína, um agente mucolítico precursor de L-cisteína e de glutatona reduzida que tem sido utilizado na investigação de muitos eventos patológicos (TEPEL *et al.*, 2003).

1.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e testar uma metodologia analítica para a determinação dos compostos redox plasmáticos cisteína (CyS) e cistina (CySS) por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detecção coulométrica, e aplicá-la na determinação do potencial de redução do par CyS/CySS no plasma de pacientes em diferentes estágios da doença renal crônica.

Para isso, as metas foram:

- a) padronizar a metodologia para detecção simultânea do par cisteína (CyS) e cistina (CySS), em plasma humano, por HPLC com detecção eletroquímica;
- b) coletar amostras de sangue de doentes renais em diferentes estágios da doença e de voluntários sem doença renal crônica, pareadas quanto a sexo, idade e doenças de base;
- c) aplicar o método de detecção padronizado, empregando as amostras coletadas de pacientes renais e pessoas saudáveis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRUTURA RENAL E FORMAÇÃO DA URINA

Os rins humanos (Figura 1 A) são um par de órgãos, pesando em média 150 gramas cada, responsáveis por diversas funções vitais no organismo, tais como excreção de toxinas, regulação hidroeletrólítica, regulação ácido-básica e funções endócrinas (ANDREOLI *et al.*, 2005).

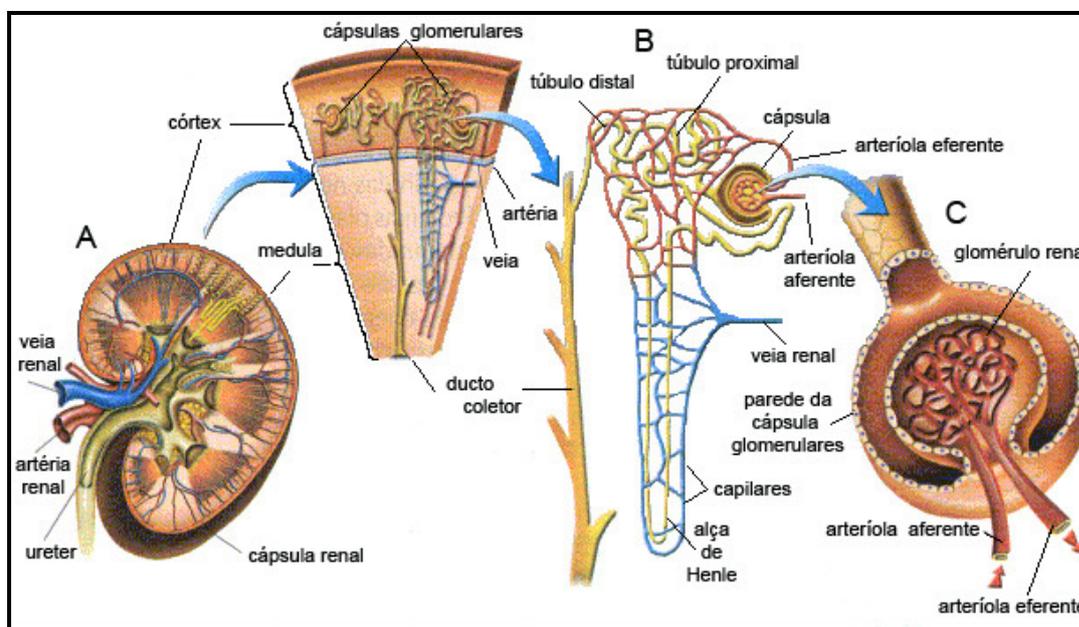


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RIM

NOTA: (A) Rim. (B) Néfron. (C) Glomérulo

FONTE: Adaptado de Cheida (2002)

Cada rim possui de 600000 a 1400000 néfrons, que são a unidade estrutural e funcional do rim (Figura 1 B). Cada néfron é formado pela associação do corpúsculo de Malpighi com o sistema tubular (BRENNER, 2008).

No corpúsculo de Malpighi chega a arteríola aferente, que consiste em uma ramificação da artéria renal. Esta dá origem a uma série de alças capilares que se enovelam para formar uma estrutura arredondada denominada glomérulo (figura 1C), no qual circula sangue arterial. Após se enovelarem estas alças confluem para formar a arteríola eferente. Os glomérulos são envolvidos por uma cápsula,

chamada cápsula de Bowman, cujo espaço recebe o filtrado glomerular. Tal filtrado é formado pela alta pressão hidrostática no interior das alças capilares enoveladas (ANDREOLI *et al.*, 2005).

Esse processo é chamado filtração glomerular e é o primeiro passo na formação da urina. A função renal é proporcional à formação deste filtrado e pode ser quantificada pela taxa de filtração glomerular (TFG). Em um adulto sadio a taxa de filtração glomerular é de aproximadamente 120 mL/min, o que equivale a quase 180 litros de plasma filtrados por dia, dos quais cerca de 99% são reabsorvidos no sistema tubular. A reabsorção tubular é responsável em grande parte pela manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico do organismo, pois permite a eliminação apenas da quantidade necessária de água, eletrólitos e outras substâncias. Após a filtração glomerular, todo o fluido filtrado é processado no sistema tubular, garantindo a conservação de nutrientes essenciais (glicose, aminoácidos, vitaminas), a eliminação de potenciais substâncias tóxicas (ácidos e bases orgânicas) e redução da quantidade de sais e água presentes na urina. A relação filtração-reabsorção é essencial para a manutenção de altas taxas de filtração glomerular, pois a reabsorção recupera solutos importantes para o organismo, além de água, que, de outro modo seriam perdidos na urina (ANDREOLI *et al.*, 2005; BRENNER, 2008).

A composição final da urina depende ainda da secreção tubular. Através desse fenômeno várias substâncias, principalmente K^+ , H^+ e ácido úrico, passam diretamente dos capilares para o lúmen tubular. Todo o funcionamento correto dos rins depende da interação desses processos de filtração, reabsorção e secreção (ANDREOLI *et al.*, 2005).

A tonicidade dos fluidos corporais é controlada predominantemente através da regulação renal da excreção da água. O rim também é responsável por várias funções homeostáticas, incluindo a regulação do volume de fluido extracelular, através do controle da excreção de NaCl, a regulação do balanço ácido-base sistêmico, a regulação do balanço de potássio, através do controle de excreção de K^+ , e a manutenção do balanço de nitrogênio, através da excreção de uréia e outros compostos nitrogenados (BRENNER, 2008).

2.1.1 Medida da função renal

A quantificação da taxa de filtração glomerular (TFG) é o melhor índice de medida da função renal de uma pessoa. O nível normal da TFG varia de acordo com a idade, o sexo e o tamanho do corpo. Mas por convenção se ajusta a TFG para uma superfície corporal padrão de 1,73 m² (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002). Pode-se estimar a TFG através de alguns métodos como a uréia plasmática, a creatinina plasmática ou o *clearance* de creatinina.

A uréia é produzida nos hepatócitos, a partir da amônia proveniente do metabolismo protéico (NELSON e COX, 2002) e é excretada quase que exclusivamente pelos rins. A concentração de uréia no sangue costuma ser usada em conjunto com a concentração de creatinina como medida da função renal. A uréia é excretada por filtração glomerular, no entanto uma quantidade significativa é reabsorvida ao longo do túbulo. Por essa razão, condições que aumentam a reabsorção tubular, como a hipovolemia, podem aumentar os níveis séricos de uréia. Conseqüentemente, os níveis de uréia plasmática podem variar em relação ao volume do líquido extracelular (ANDREOLI *et al.*, 2005).

A creatinina – um metabólito da creatina, uma molécula armazenadora de energia presente nos músculos – é outra substância cujos níveis plasmáticos podem oferecer indicadores da função renal. Sua produção diária no organismo é razoavelmente estável e, ao contrário da uréia, não é reabsorvida pelo sistema tubular. No entanto, os níveis plasmáticos variam de forma proporcional à massa muscular e, por isso, se utilizados isoladamente para determinar a medida de função renal, sem se levar em conta outros fatores, podem produzir resultados enganosos.

O método chamado *clearance* de creatinina utiliza o nível de creatinina no plasma para estimar a TFG. Contudo também emprega outros dados para obter um resultado mais confiável. No método clássico deve-se coletar toda a urina de 24 horas e determinar o volume e a concentração de creatinina, além da concentração plasmática de creatinina. Aplicando esses valores na fórmula:

$$TFG = \frac{C_u * V}{C_p}$$

Onde:

TFG = taxa de filtração glomerular (mL/min/1,73 m²);

C_u = concentração de creatinina na urina (mg/dL);

C_p = concentração de creatinina no plasma (mg/dL);

V = volume de urina dividido por 1440 (mL).

Na ausência do exame de urina de 24 horas pode se estimar o TFG utilizando-se a massa corpórea (kg), a idade (anos) e a concentração de creatinina no plasma (mg/dL). Esse método é conhecido como Clearance Estimado e utiliza a fórmula de Cockcroft-Gault (COCKCROFT e GAULT, 1976):

$$TFG = \frac{(140 - idade) * massa corpórea}{72 * C_p}$$

Existem ainda outras equações que podem ser utilizadas para a estimativa da TFG, como a equação do estudo da modificação da dieta na doença renal (Modification of Diet in renal Disease Study – MDRD), que além desses fatores leva em conta o grupo étnico (LEVEY *et al.*, 1999), e as equações de Schwartz (SCHWARTZ *et al.*, 1976) e de Counahan-Barrat (COUNAHAN *et al.*, 1976), que utilizam a proporcionalidade entre a TFG, a altura e a concentração de creatinina no sangue. Atualmente a National Kidney Foundation recomenda a utilização da equação de Cockcroft-Gault ou da equação MDRD para a estimativa da TFG em adultos e as equações de Schwartz ou de Counahan-Barrat para a estimativa da TFG pessoas de até 18 anos. De acordo com uma revisão de 1998 (WALSER, 1998) 5 de 6 estudos concluíram que a estimativa da TFG baseada nessas equações apresentam erros iguais ou menores do que a baseada no exame de 24 de horas de urina. No entanto há algumas exceções, como pessoas que apresentam variações na dieta (vegetarianos, quem toma suplemento de creatina) ou variações na massa muscular (amputados, desnutridos). Nessas situações o exame de 24 de urina é o mais indicado (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002).

No entanto, alguns estudos indicam que a equação de Cockcroft-Gault pode superestimar a TFG, quando utilizada em pacientes com a TFG muito baixa, e também apresenta uma grande dispersão dos dados. Por outro lado, estudos também indicaram que a equação MDRD apresenta certa imprecisão e uma sistemática subestimação da TFG, principalmente quando os valores são maiores do que 90 mL/min/1,73 m² (MARCOS *et al.*, 2010; CIRILLO, 2010). Recentemente o grupo CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) desenvolveu uma nova equação para estimar a TFG, a partir de uma população de 8254 indivíduos. Essa equação utiliza as mesmas variáveis utilizadas pela equação MDRD, no entanto consegue estimativas de TFG mais acuradas e precisas (STEVENS *et al.*, 2010; POTELL *et al.*, 2010).

2.2 DOENÇA RENAL CRÔNICA

A doença renal crônica (DRC) consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins. A National Kidney Foundation (2002) define a doença renal crônica como lesão renal e/ou diminuição da TFG abaixo de 60 mL/min/1,73m² presentes por pelo menos 3 meses, sendo a lesão renal definida como anormalidades patológicas ou a presença de marcadores de lesão, incluindo anormalidades em teste de urina, sangue ou testes de imagem.

Existem inúmeras doenças que podem causar doença renal crônica, desde doenças sistêmicas até malformações congênitas (Quadro 1). Todas essas doenças, após um período variável, podem evoluir para um estado de doença renal em fase terminal, em que a função renal fica reduzida a menos de 15% da função normal.

No Brasil, segundo o Censo Brasileiro de Diálise, de 2008, a hipertensão arterial sistêmica é a maior causa de DRC em fase terminal, com 36% dos doentes (SESSO *et al.*, 2008), enquanto nos Estado Unidos a maior causa de DRC é a diabetes melito, causador de 44% dos casos de DRC terminal (UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM, 2009).

Doenças Sistêmicas
<ul style="list-style-type: none"> • Diabete melito • Hipertensão arterial sistêmica • Doenças autoimunes (lúpus eritromatoso sistêmico, vasculites) • Mieloma múltiplo • Amiloidose • Gota
Doenças Renais Primárias
<ul style="list-style-type: none"> • Glomerulopatias • Pielonefrite • Nefrite intersticial crônica • Doenças obstrutivas crônicas
Doenças Hereditárias
<ul style="list-style-type: none"> • Rins policísticos • Síndrome de Alport • Cistinose
Malformações Congênitas
<ul style="list-style-type: none"> • Válvula de uretra posterior • Refluxo vesicoureteral • Agenesia renal, entre outros

QUADRO 1 - DOENÇAS QUE PODEM CAUSAR DRC
 FONTE: Draibe¹ (2002) citado por Ramalho *et al.* (2009)

Em 2002, a National Kidney Foundation propôs um esquema de definição e classificação da doença renal crônica, que desde então tem sido adotado mundialmente (Quadro 2).

Estágio	Descrição	TFG (mL/min/1.73 m²)
1	Lesão Renal com normal ou aumento da TFG	≥90
2	Lesão Renal com leve diminuição da TFG	60–89
3	Moderada diminuição da TFG	30–59
4	Severa diminuição da TFG (Sintomas urêmicos iniciais)	15–29
5	Falência renal (Uremia grave)	<15 (ou em diálise)

QUADRO 2 – ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL
 FONTE: National Kidney Foundation (2002)

¹¹ DRAIBE, S.A. Insuficiência renal crônica. In: Ajsen H, Schor N. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar Unifesp – Nefrologia. São Paulo: Manole, 2002. p. 181.

O declínio gradual na função renal de pacientes com DRC é inicialmente assintomático, mas, com a progressão dos estágios, diversos sinais e sintomas podem se manifestar. De acordo com o CDC, 16,8% da população dos EUA com mais de 20 anos se enquadra em algum dos 5 estágios (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2007). A velocidade dessa progressão pode ser influenciada por uma vasta gama de fatores de risco como o controle da pressão sanguínea, proteinúria, hiperglicemia, hiperlipidemia, anemia, a dieta ingerida pelo paciente, obesidade e tabagismo (BRENNER, 2008). Alguns estudos também correlacionaram a velocidade da progressão da DRC com a idade (CONWAY *et al.*, 2009) e com o sexo (SILBIGER e NEUGARTEN, 2003), sugerindo que pacientes mais novos e do sexo masculino têm um declínio mais rápido da função renal.

Quando há uma queda acentuada da TFG, geralmente abaixo de 60 mL/min/1,73m², o paciente começa a sofrer de um conjunto de sintomas, decorrentes da síndrome urêmica ou uremia (MEYER e HOSTETTER, 2007). A uremia já foi definida como uma síndrome que afeta todos os sistemas orgânicos, decorrente de uma combinação de fatores como moléculas retidas, deficiência de hormônios e produtos metabólicos (ANDREOLI *et al.*, 2005). No entanto, atualmente o termo uremia é utilizado para descrever os sintomas (Quadro 3) que acompanham a doença renal e não podem ser explicados pelos desarranjos no volume extracelular, nas concentrações de íons inorgânicos ou pela falta de conhecidos produtos sintetizados pelos rins, sugerindo que a principal causa da síndrome urêmica seja o acúmulo de resíduos orgânicos normalmente filtrados pelos rins (MEYER e HOSTETTER, 2007).

Pesquisas recentes sobre a uremia estão focadas em identificar as moléculas específicas que se acumulam excessivamente na uremia. Diferente da uréia, que ainda é o soluto mais utilizado para se avaliar a toxicidade urêmica, muitas dessas moléculas não apresentam uma toxicidade dependente da concentração e ainda não são muito bem filtradas pelas membranas de diálise (HIMMELFARB, 2009). A acumulação de toxinas em pacientes com DRC em estágio final apresenta uma extrema heterogeneidade em termos tanto de propriedades químicas e físicas das toxinas, como também de aspectos clínicos e bioquímicos. Toxinas urêmicas identificadas até agora distribuem-se em uma larga faixa de peso molecular - desde

solutos pequenos, com menos de 500 Da, até solutos maiores, com mais de 12000 Da - apresentam diferentes concentrações no sangue e diferentes graus de hidrofobicidade. Esses solutos compreendem componentes derivados do complemento, peptídeos e proteínas relacionados com hormônios, receptores solúveis, cadeias de IgG e proteínas derivadas da ativação de células sanguíneas, além de grandes moléculas formadas através de processos de oxidação e glicação (GALLI, 2007).

Neurológicos e Musculares
<ul style="list-style-type: none"> • Fadiga • Neuropatia periférica • Diminuição da acuidade mental • Anorexia e náusea • Diminuição do olfato e do paladar • Distúrbios do sono • Coma • Redução do potencial de membrana do músculo • Cólicas
Endócrinos e Metabólicos
<ul style="list-style-type: none"> • Amenorréia e disfunções sexuais • Redução da temperatura corporal • Alteração nos níveis de aminoácidos • Doenças ósseas devido a retenção de fosfato, hiperparatireoidismo e deficiência de vitamina D • Resistência a insulina • Aumento do catabolismo protéico-muscular
Outros
<ul style="list-style-type: none"> • Serosite • Prurido • Soluços • Estresse Oxidativo • Anemia devido à deficiência de eritropoetina e à diminuição da meia-vida dos eritrócitos • Disfunção nos granulócitos e leucócitos • Disfunção plaquetária

QUADRO 3 - SINAIS E SINTOMAS DA UREMIA
 FONTE: Meyer e Hostetter (2007)

Um dos maiores desafios no campo da toxicidade urêmica é entender como o risco cardiovascular é aumentado com a perda da função renal (HIMMELFARB,

2009). Aproximadamente 50% dos indivíduos com doença renal crônica em seu estágio final morrem prematuramente em decorrência de complicações cardiovasculares, uma incidência de 15 a 30 vezes maior que a mortalidade encontrada na população em geral, ajustada pela idade (SCHIFFRIN *et al.*, 2007). Apesar de boa parte deste aumento do risco poder ser atribuído às muitas comorbidades existentes na população que sofre com a doença renal crônica, esses fatores sozinhos não explicam todo esse aumento observado. Em razão disso, os fatores não-tradicionais de risco cardiovasculares tem sido amplamente estudados na doença renal crônica, o que remete diretamente ao estado urêmico (HIMMELFARB, 2009). Entre os fatores não-tradicionais de risco estudados, o aumento do estresse oxidativo é um fenômeno muito associado à uremia e que tem sido fortemente relacionado ao aumento do risco cardiovascular.

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo é um termo comumente empregado para designar um desbalanço entre os níveis de oxidantes gerados pelo organismo e de antioxidantes, em favor dos oxidantes (AUGUSTO, 2006). Foi introduzido pelo pesquisador Helmut Sies na década de 80 (SIES, 1985) e serviu de alicerce para demonstrar que as espécies reativas e radicais livres oxidam biomoléculas e participam de vários processos patológicos *in vivo*. De fato, atualmente é bem conhecido que reações oxidativas exacerbadas estão associadas a praticamente todas as doenças, crônicas e infecciosas (para uma revisão, VALKO *et al.*, 2007). Evidências indicam que o estresse oxidativo contribui em vários processos relacionados ao envelhecimento e a doenças, como diabetes (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2004), câncer (BERGER, 2005), doenças pulmonares (CANTIM, 2004), cardiovasculares (STOCKER e KEANEY, 2004) e neurodegenerativas (VINA *et al.*, 2004). Baseada no conceito do desbalanço redox, a terapia antioxidante surgiu como uma terapia inovadora, preventiva e até remediadora de todas as doenças onde o estresse oxidativo apresentava-se evidente. Contudo, contrariando as expectativas, os resultados de longos testes clínicos têm mostrado que a terapia antioxidante não melhora o quadro clínico na maioria das populações testadas (DUIJVESTIJN e BRAND, 1999;

GOODMAN *et al.*, 2004; LONN *et al.*, 2005; WILLIAMS e FISHER, 2005; ROBINSON *et al.*, 2006; ORREL *et al.*, 2007), sugerindo que as suplementações empregadas não têm sido adequadas às necessidades dos pacientes e/ou que uma melhor definição de estresse oxidativo seja necessária. Assim, o pesquisador Dean Jones tem sugerido que estresse oxidativo seja definido como uma desregulação da sinalização e do controle redox (JONES, 2006), criando a possibilidade de haver estresse oxidativo envolvendo apenas a alteração do circuito redox sem a ocorrência de desbalanço redox global. Segundo esta nova definição, o estresse oxidativo poderia ser quantificado através da determinação dos potenciais de redução (SCHAFER e BUETTNER, 2001) plasmáticos dos pares GSH/GSSG (glutathiona/glutathiona dissulfeto) e, principalmente, Cys/CySS (cisteína/cistina).

2.3.1 Potencial de redução

O potencial de redução é uma medida da tendência de espécies químicas de receber ou doar elétrons (KEMP *et al.*, 2008). Esse potencial é quantitativamente expresso através de milivolts (mV), e é possível determinar esse valor através das concentrações das substâncias nas suas formas oxidada e reduzida aplicadas na equação de Nernst.

A equação de Nernst relaciona o potencial padrão de redução (E_0), uma medida determinada através de experimentos relativa a cada par redox, ao potencial de redução (E_h) para quaisquer concentrações de espécies oxidadas e reduzidas:



$$E_h = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{receptor de elétrons}]^y}{[\text{doador de elétrons}]^x}$$

Onde:

R = constante universal dos gases perfeitos (8,314 J/mol.K);

T = temperatura absoluta (K);

n = número de elétrons transferidos por molécula;

F = constante de Faraday (96,406 J/V).

x = número de mols do receptor de elétrons

y = número de mols do doador de elétrons

2.3.2 O par redox cisteína/cistina

A cisteína (CyS) é o único aminoácido que possui o grupo tiol (-SH) (RIZVI e MAURYA, 2008) e, devido à presença desse grupo, pode sofrer oxidações reversíveis sob condições fisiológicas (BLANCO *et al.*, 2007). A cisteína é facilmente oxidada para formar um aminoácido dimérico, unido covalentemente, chamado de cistina (CySS), no qual duas moléculas de cisteína estão unidas por uma ligação dissulfeto. CyS/CySS é o principal par tiol/dissulfeto de baixo peso molecular presente no plasma de mamíferos (KEMP *et al.*, 2008).

Essas oxidações reversíveis permitem um meio de controlar uma ampla gama de atividades e estruturas de proteínas (SCHAFER e BUETTNER, 2001) e sendo assim, mudanças no estado de oxidação/redução desses pares de tióis/dissulfetos afetam interações DNA-proteína, atividades de enzimas, conformações de proteínas, interações proteína-proteína, atividade de transporte e degradação de proteínas (JORDAN e GIBBINS, 2006; REEVES *et al.*, 1986; YANG *et al.*, 2006).

De fato, estudos têm mostrado que o potencial de redução do par CyS/CySS livre no plasma aumenta (torna-se mais oxidado) progressivamente com a idade (JONES *et al.*, 2002) e encontra-se mais alto em tabagistas quando comparado a não tabagistas (MORIARTY *et al.*, 2003). Ou seja, o potencial de redução plasmático encontra-se elevado em duas situações reconhecidamente de estresse oxidativo. Outros estudos também mostraram que o estado redox do plasma apresenta-se mais oxidado em situações como quimioterapia (JONAS *et al.*, 2000) e doenças cardiovasculares (ASHFAQ *et al.*, 2006). Recentemente, estudos demonstraram que o potencial de redução mais oxidado do par CyS/CySS também está associado positivamente com o nível plasmático de IL-1 β , uma conhecida citocina pró-inflamatória (IYER *et al.*, 2009). De acordo com esses estudos, indivíduos saudáveis apresentam potenciais de redução plasmáticos entre -80 a -62 mV para o par Cys/CySS. Potenciais acima desses valores indicariam estresse oxidativo. Apesar

de estes valores serem aproximados, mais trabalhos são necessários para se chegar a valores clínicos de referência, que possam ser usados rotineiramente para quantificar estresse oxidativo. Até o momento, não há dados disponíveis mostrando que indivíduos com potenciais de redução plasmáticos mais oxidados correm maiores risco de doença ou que intervenções que normalizem o estado redox oxidado possam trazer benefícios (JONES *et al.*, 2006).

2.3.3 Metodologias utilizadas para análise de cisteína e cistina

Há uma grande variedade de métodos para determinar concentrações de tióis em fluidos e tecidos biológicos, incluindo eletroforese capilar, cromatografia líquida ou gasosa acoplada com espectrometria de massa e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando detecção ultravioleta, fluorescente ou eletroquímica (MCMENAMIN *et al.*, 2009).

No entanto, dentre esses métodos, apenas métodos utilizando a HPLC com espectrometria de massa (JOHNSON *et al.*, 2008), fluorescência (BLANCO *et al.*, 2007; JONES e LIANG, 2009; MCMENAMIN *et al.*, 2009) ou detecção eletroquímica (MELNYK *et al.*, 1999) foram descritos para a determinação de cisteína e cistina simultaneamente no plasma.

Atualmente os métodos baseados em espectrometria de massa detêm uma maior sensibilidade e especificidade se comparados aos outros métodos cromatográficos; entretanto requerem equipamentos muito mais caros, tornando difícil sua aquisição pela maioria dos laboratórios (MCMENAMIN *et al.*, 2009). Métodos baseados em HPLC com detecção por fluorescência são os mais utilizados devido a sua alta sensibilidade e relativa simplicidade. No entanto, geralmente necessitam que as amostras passem por um processo de derivatização antes serem separadas cromatograficamente, o que pode acarretar em um grau de oxidação da cisteína maior do que em métodos em que não há essa etapa. Os métodos que utilizam HPLC com detecção eletroquímica, embora não possuam uma sensibilidade tão grande quanto os métodos que utilizam detecção por fluorescência ou espectrometria de massa (MCMENAMIN *et al.*, 2009), dispensam a etapa de derivatização e são relativamente simples e baratos.

2.3.4 Outros biomarcadores de estresse oxidativo

Além do par cisteína/cistina, outros biomarcadores podem ser utilizados para detecção do estresse oxidativo in vivo. A combinação de baixas concentrações, grande reatividade e uma curta meia-vida biológica faz com que a detecção direta de espécies reativas de oxigênio seja tecnicamente bastante difícil. Por esse motivo a detecção de produtos finais de reações químicas redox tem sido utilizada para a medição indireta do estresse oxidativo (HIMMELFARB, 2009).

O quadro 4 lista alguns biomarcadores de estresse oxidativo comumente utilizados em humanos e modelos experimentais.

Proteínas
3-Nitrotirosina Formação de carbonilas em proteínas Produtos finais avançados de glicação (AGEs)
Lipídios
Malondialdeído F2-isoprostano LDL oxidado Isolevuglandina
Ácidos Nucléicos
8-hidroxi 2'- deoxiguanina

QUADRO 4 – ALGUNS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO
FONTE: Adaptado de Himmelfarb (2005) e Himmelfarb (2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Pessoas em diferentes estágios da doença renal crônica foram selecionadas no ambulatório de Nefrologia Aliança Saúde PUC-PR em Curitiba. Também foram selecionados pacientes que realizavam diálise na Clínica de Hemodiálise do Hospital Cajuru. Os indivíduos saudáveis foram selecionados dentre docentes, funcionários e discentes da Universidade Federal do Paraná.

Os pacientes em diferentes estágios da doença renal, mas que não estavam em diálise, foram selecionados a partir das respectivas fichas médicas. As taxas de filtração glomerular de todos os pacientes foram calculadas a partir da concentração de creatinina plasmática e da fórmula de Cockcroft-Gault. Foram incluídos na pesquisa apenas pacientes com mais de 18 anos e que não sofriam de malignidades e doenças infecciosas. No setor de hemodiálise foram selecionados pacientes que realizavam diálise, maiores de 18 anos, que não apresentavam nenhuma doença infecciosa e que não sofriam de diabetes. No caso dos pacientes em diálise não foi levado em conta a TFG e a coleta foi realizada um pouco antes das sessões de hemodiálise.

No caso dos indivíduos saudáveis foram selecionados apenas as pessoas maiores de 18 anos, que não sofriam de diabetes nem de hipertensão arterial sistêmica, que apresentaram taxa de filtração glomerular e nível de uréia plasmática normais e não possuíam histórico de doença renal nem lesões renais.

Às pessoas abordadas para participar do estudo era explicado o estudo e entregue um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice), o qual era lido e assinado.

3.2 COLETA DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas nos mesmos locais onde foram feitas as seleções dos indivíduos (Hospital Cajuru, Ambulatório Nossa Senhora da Luz e

Universidade Federal do Paraná). As coletas foram realizadas por profissionais habilitados. Este protocolo está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – PUCPR/1582.

Foram coletados 3 mL de sangue de cada indivíduo. O sangue foi coletado através de seringa e transferido para 2 tubos de 1,5 mL, contendo 5 uL de uma solução de 6,25 mM DTPA e 12 uL de heparina sódica (5000 UI/mL). Após isso os tubos foram imediatamente centrifugados a 12000 rpm por 1,5 minutos para a separação do plasma. O plasma foi então pipetado, aliquotado em novos tubos de 1,5 mL e prontamente congelado em gelo seco. Ao término das coletas programadas para cada dia as amostras eram armazenadas em freezer -80° C para posterior análise.

3.3 REAGENTES QUÍMICOS

Cisteína, cistina, DTPA (diethylenetriamine-pentaacetic acid) e octanosulfonato de sódio foram adquiridos da Sigma Chemical (EUA). O isopropanol (grau cromatográfico) é proveniente da Carlo Erba (Itália). Ácido ortofosfórico (H_3PO_4), hidróxido de sódio, metanol (grau cromatográfico), acetonitrila, ácido perclórico, ácido metafosfórico, ácido tricloroacético, acetona, etanol foram adquiridos da Merck (Alemanha).

3.4 SOLUÇÕES

Soluções estoque contendo 1 mM de cisteína e 0,2 mM de cistina foram preparadas na solução tampão utilizada na fase móvel da cromatografia e estocadas em freezer -80° C até a sua utilização.

A solução tampão utilizada na fase móvel consiste em 25 mM de H_3PO_4 , 0,5 mM de octanosulfonato de sódio e pH ajustado para 2,7 com hidróxido de sódio, filtrada em membrana de PVDF de 0,45 μ m.

3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Cromatografia é um processo de separação no qual uma mistura de substâncias é distribuída através de duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase estacionária pode ser um material sólido e poroso ou uma fina camada líquida revestida por um suporte sólido ou paredes da coluna. A fase móvel pode ser gasosa ou líquida, determinando as respectivas denominações cromatografia gasosa ou cromatografia líquida (MEYER, 1996).

As técnicas de cromatografia podem se utilizar de diferenças de cargas, tamanho, afinidade de ligações, polaridade ou interações bioquímicas específicas para realizar a separação. Desse modo as substâncias migram, carregadas pela fase móvel, mais rapidamente ou mais lentamente através da fase estacionária, dependendo de suas propriedades (NELSON E COX, 2002).

Uma das técnicas mais utilizadas em biociências é a cromatografia líquida em coluna, na qual um material sólido e poroso é mantido em uma coluna, sendo percorrido pela fase móvel. No entanto separações em tais colunas podem demorar várias horas. Outro método utilizado, a cromatografia em camada delgada, diminui para menos de uma hora o tempo de análise, entretanto seus resultados são apenas qualitativos ou semi-quantitativos. A cromatografia líquida de alta eficiência é um método mais moderno, no qual bombas de alta pressão aceleram o movimento da fase móvel (e conseqüentemente dos analitos) através da coluna, limitando o espalhamento por difusão, aumentando a resolução e diminuindo drasticamente o tempo de análise (MEYER, 1996).

Em nosso laboratório, o sistema cromatográfico é o Shimadzu Prominence, utilizando uma bomba modelo LC-20AD, degaseificador modelo DGU-20 e forno para coluna equipados com um injetor manual Rheodyne. A separação dos analitos foi obtida através de uma coluna de fase-reversa Phenomenex Gemini 5 μ C18 com 150 x 4,6mm acondicionada em 40 $^{\circ}$ C. Para a detecção foi utilizado um detector eletroquímico ESA Coulochem III com uma cela ESA 5011 contendo dois eletrodos em série, com potenciais estabelecidos em 633 e 866 mV. O controle do equipamento e a análise dos dados foram feitos através do programa LC Solution (Shimadzu). A fase móvel consistiu de 1% de metanol e 99% do um tampão (descrito em 3.2). Os analitos eram separados em um tempo aproximado de 4

minutos, sob um fluxo de 0,6 mL/min, seguidos de mais 8 minutos de corrida, perfazendo um tempo total de 12 minutos para cada amostra.

3.6 DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DAS CONCENTRAÇÕES DOS PADRÕES DE CISTEÍNA E CISTINA

As concentrações das soluções estoque foram confirmadas através de espectrofotometria, utilizando o DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)).

O DTNB reage apenas com o grupo tiol. Portanto, para se determinar a concentração de cistina foi necessário reduzir a cistina através de borohidreto (JOCELYN, 1987; JACOBSEN *et al.*, 1994).

A redução foi realizada adicionando-se, em um tubo de 1,5 mL, 100 µL da solução estoque (0,2 mM) de cistina e 35 µL de uma solução 1,43 M NaBH₄ dissolvida em 0,1 M NaOH. Em outro tubo de 1,5 mL foram adicionados 100 µL da solução tampão utilizada na fase móvel e 35 µL da solução de borohidreto. Os tubos foram então incubados a 36°C por 30 minutos. Após essa etapa foi acrescentado 35 µL de 1 M HCl aos tubos e estes foram agitados até pararem de borbulhar.

Para a reação com DTNB foram colocados, em tubos de 1,5 mL, 50 µL da solução de cistina reduzida ou 50 µL de fase móvel tratada com NaBH₄. Aos tubos foram adicionados 950 µL de uma solução 0,5 mM DTNB, 0,5 mM DTPA em 50 mM KH₂PO₄. Foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro, na faixa de 412 nm, e a concentração foi calculada através da equação:

$$A = \epsilon b c$$

Onde:

A = Absorbância

ϵ = Coeficiente de absorção molar (14100 M⁻¹x cm⁻¹)

b = Caminho óptico da cubeta (1 cm)

c = Concentração (M)

Para a determinação da concentração da cisteína foi utilizada a mesma reação com DTNB, sem a prévia redução.

3.7 PREPARAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente. Imediatamente era realizada a precipitação das proteínas plasmáticas. Para isso, isopropanol 2:1 (v/v) era adicionado ao plasma. A amostra era agitada e incubada no gelo por dez minutos. A amostra foi então centrifugada a 13000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante filtrado em membrana de PVDF de 0,22 µm e transferido para um novo tubo. A esse filtrado foi adicionado 1:1 (v:v) do mesmo tampão utilizado na fase móvel.

As amostras foram injetadas manualmente e diariamente foram feitas curvas de concentração de cisteína e cistina, utilizando para isso concentrações de 5, 10, 20, 40 e 60 µM preparadas a partir das soluções estoque de cisteína e cistina preparadas e congeladas anteriormente. Foram utilizados 30 µL de amostra em cada injeção. A detecção dos picos de cisteína e cistina foi feita em 866 mV e as concentrações calculadas através das equações das curvas de concentração.

3.8 CÁLCULO DOS POTENCIAIS DE REDUÇÃO

O potencial de redução do par cisteína/cistina de cada indivíduo foi calculado através da equação de Nernst, utilizando um potencial padrão de redução (E_0) de -250 mV, para pH 7,4 (Blanco et al, 2007) e as concentrações plasmáticas de cisteína e cistina, em mols por litro, obtidas de cada indivíduo:

$$E_h = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[cistina]}{[cisteína]^2}$$

Onde:

$$E_0 = -250 \text{ mV};$$

$$R = 8,314 \text{ J/mol.K};$$

$$T = 309 \text{ K};$$

$$n = 2;$$

$$F = 96,406 \text{ J/V}.$$

3.9 DETECÇÃO DE CARBONILAS EM PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Para a análise do conteúdo carbonílico de proteínas plasmáticas foi utilizado o protocolo descrito por Quinlan e Gutteridge (2000).

Primeiramente, em dois tubos de plástico de 1,5 mL foram adicionados 100 μL de plasma em cada um. No tubo A foi pipetado 0,5 mL de uma solução 10mM 2,4-dinitrofenil hidrazina em 2M HCl. No tubo B foi pipetado 0,5 mL de uma solução 2M HCl. Os dois tubos foram incubados a 37°C por 90 minutos.

Após essa etapa foi adicionado 0,5 mL de ácido tricloroacético 28% em cada tubo e procedeu-se a agitação por 3 minutos. Os tubos foram então centrifugados por 3 minutos a 6000 rpm e tiveram seu sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuscitado em 0,5 mL de uma solução 1:1 de etanol e acetato de etila e centrifugado novamente por 6 minutos a 6000 rpm.

O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi finalmente ressuscitado em 0,5 mL de uma solução 6 M hidrocloreto de guanidina. Os tubos são centrifugados uma última vez a 6000 rpm por 3 minutos.

Foi lida então a absorbância na faixa de 360 nm, em um equipamento nanodrop, utilizando o tubo B como branco, e a concentração de carbonila foi determinada através da equação:

$$A = \varepsilon b c$$

Onde:

A = Absorbância

ε = Coeficiente de absorção molar (21000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b = Caminho óptico da cubeta (1 cm)

c = Concentração (M)

Como a unidade mais utilizada para a carbonila é nmol/g de proteína, a concentração de proteínas no plasma foi determinada utilizando o tubo B. A absorvância do tubo B foi lida em 280 nm e calculada a partir de uma curva padrão (0,25-2 mg/mL) de BSA (albumina de soro bovino) dissolvida em 6 M hidrocloreto de guanidina.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através de análise de variância (ANOVA) e do teste Bonferroni de comparação de médias a 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO

O método foi padronizado conforme as seguintes etapas: cromatografia, detecção coulométrica, precipitação de proteínas, quantificação da cisteína e da cistina e coleta e armazenamento das amostras.

4.1.1 Cromatografia

A cromatografia de fase reversa utilizando par iônico foi escolhida baseando-se inicialmente no método de Melnyk *et al.* (1999) para separação de metionina, homocisteína, homocistina, cisteína, cistina, cistationa, glutatona e glutatona dissulfeto.

Em uma primeira etapa utilizou-se soluções padrões de cisteína e cistina, preparadas a partir das respectivas soluções estoque, com o objetivo de se determinar os parâmetros para a separação dos dois analitos. Utilizando inicialmente uma coluna C18 de 250 x 4,6 mm, as condições da fase móvel foram amplamente testadas e alteradas até se obter as condições ótimas para separação. Foram feitos testes com 1 a 10% de metanol e de 1 a 5% de acetonitrila na fase móvel. Apesar de concentrações maiores de solvente proporcionarem uma melhor qualidade dos picos, foi necessário utilizar pequenas concentrações devido à proximidade dos tempos de retenção dos dois analitos. Grandes concentrações de solvente faziam com que os picos se sobrepusessem. Foram também alteradas a composição do tampão, variando a sua composição entre 25 mM e 50 mM de H₃PO₄, e a concentração do par iônico utilizado, o octanosulfonato de sódio, cujas concentrações testadas foram de 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM. Dentre essas variáveis, a concentração de par iônico foi o fator principal no tempo de retenção dos analitos. O fluxo da fase móvel também foi um componente crítico na escolha das condições, determinando a separação e a pressão total do sistema.

Após essa etapa foram realizados testes utilizando plasma humano, com finalidade de se determinar os parâmetros em que houvesse, além da separação entre cisteína e cistina, a separação entre estes analitos e os outros compostos do plasma. Nessa etapa foi necessário trocar a coluna C18 de 250 x 4,6 mm por uma coluna de 150 x 4,6 mm, devido ao fato de que a coluna maior retinha por mais tempo os compostos do plasma que não interessavam ao trabalho, tornando o tempo de corrida de uma amostra desnecessariamente mais longo. Para manter a separação dos analitos com a mesma qualidade que apresentava com a coluna maior foi necessário apenas diminuir o fluxo, que anteriormente havia sido fixado como 1 mL/min, para 0,6 mL/min. Também nessa etapa foi definida a temperatura do forno em que estava acondicionada a coluna: 40° C.

Concluídas essas duas etapas, foi possível determinar os parâmetros ideais de separação (Quadro 5).

Fase Móvel
99% de solução tampão 1% de metanol
Solução Tampão
25 mM de H ₃ PO ₄ 0,5 mM de octanosulfonato de sódio pH 2,7
Coluna
C18 de 150 x 4,6 mm
Fluxo
0,6 mL/min
Temperatura
40°C

QUADRO 5 – PARÂMETROS IDEAIS ENCONTRADOS

Utilizando-se essas condições, os tempos de retenção da cistina e da cisteína foram, respectivamente, 3,15 e 3,5 minutos (Figura 2), enquanto o tempo total de corrida para uma amostra foi de 12 minutos.

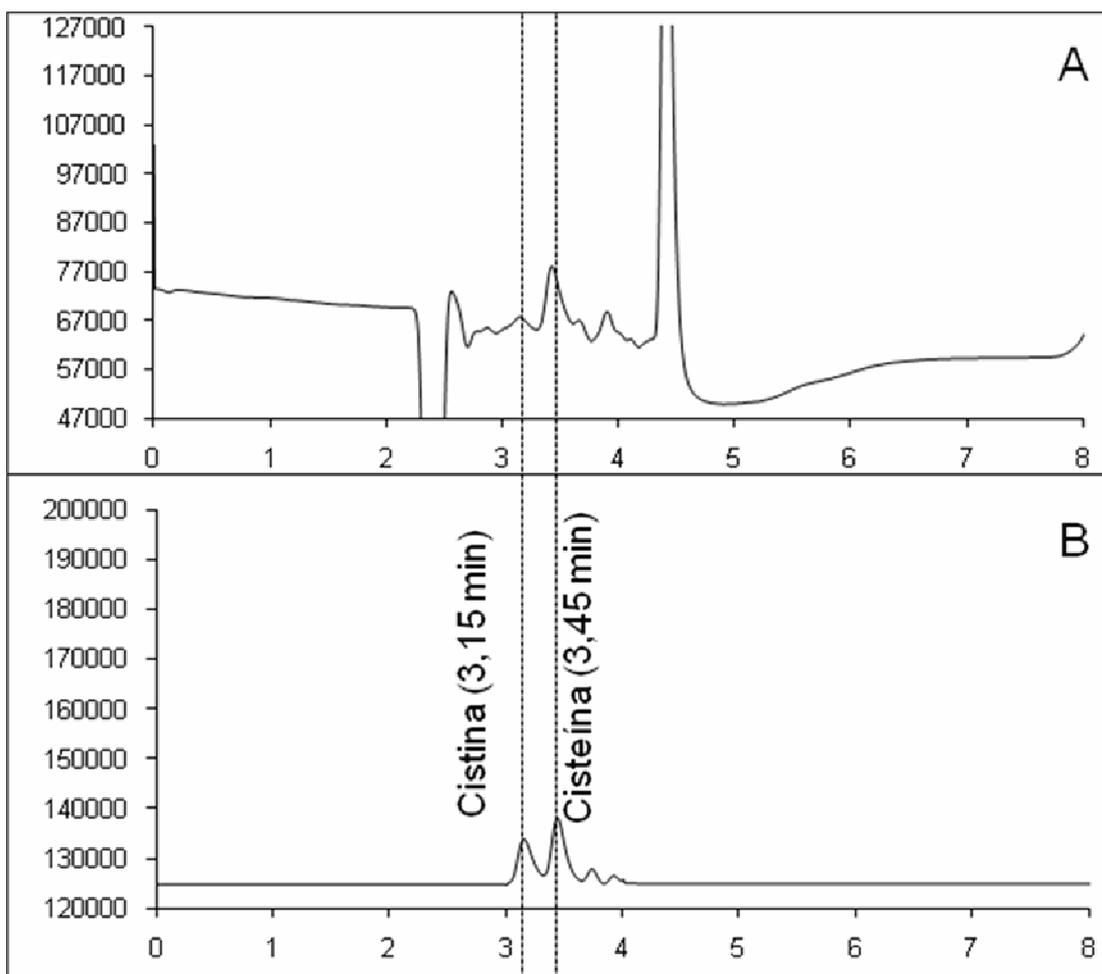


FIGURA 2 - CROMATOGRAMAS DE PADRÕES DE 60 μ M DE CISTEÍNA E CISTINA (B) E PLASMA HUMANO (A)

NOTA: O volume injetado foi de 30 μ L. O potencial aplicado foi de 866 mV

4.1.2 Detecção coulométrica

Após determinar as condições de separação foram realizados os testes para otimizar a detecção eletroquímica dos analitos. Para isso primeiramente foram feitos voltamogramas específicos para cada substância (Figura 3), nos quais uma mesma quantidade de analito foi detectada em diferentes potenciais. Para a confecção dos voltamogramas foram injetados 30 μ L de soluções de 100 μ M de cisteína e cistina, perfazendo um total de 3000 picomols de analito por injeção. Utilizando-se os voltamogramas foram determinados os potenciais ideais para a oxidação e consequente detecção da cisteína e da cistina. O detector utilizado permitia a utilização de até duas voltagens diferentes simultaneamente, então as voltagens

aplicadas foram 633 mV e 866 mV, com o objetivo inicial de se quantificar a cisteína no menor potencial e a cistina no maior potencial. Posteriormente verificou-se que era possível utilizar tanto um quanto outro para a leitura do pico de cisteína.

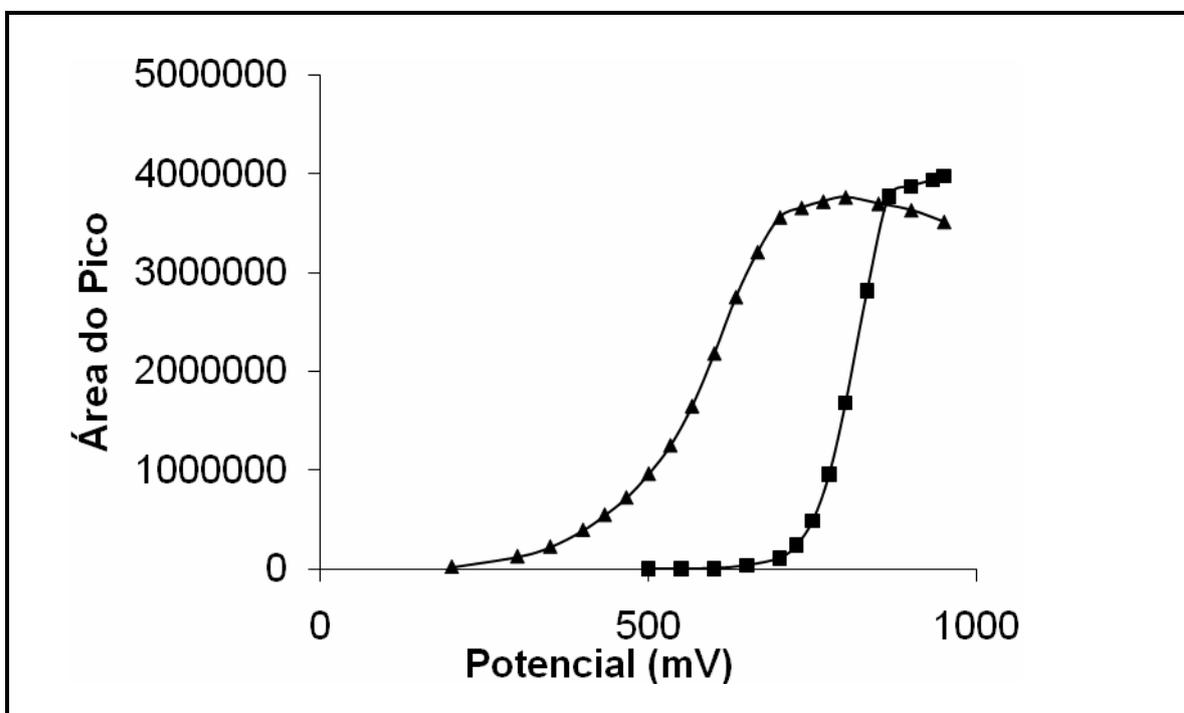


FIGURA 3 - VOLTAMOGRAMAS DE CISTEÍNA (▲) E CISTINA (■)
NOTA: Injeções de 30 μ L e concentrações de 100 μ M

Foram realizados então testes de sensibilidade para se determinar a concentração mínima de cisteína e cistina detectáveis sob essas condições. Os resultados mostraram que a cisteína poderia ser detectada em quantidades de até 6 picomols enquanto a cistina apresentava um limite de detecção de 15 picomols. Estudos indicam que as concentrações normais no plasma humano de cisteína e cistina são de aproximadamente 10 e 60 μ M respectivamente (IYER *et al.*, 2009; BLANCO *et al.*, 2007), o que em um volume de 30 μ L (volume utilizado de amostra em casa análise) corresponde, respectivamente, a 300 e 1800 pmols de cisteína e cistina. A partir dessas informações, e de experimentos feitos com plasma humano no próprio laboratório, pôde-se concluir que o método até então padronizado era sensível o suficiente para esta finalidade.

4.1.3 Precipitação de proteínas

Foram testados sistematicamente diversos protocolos com o intuito de conseguir uma precipitação protéica satisfatória e que não causasse interferência no cromatograma. Entendeu-se por precipitação satisfatória a que proporcionou um cromatograma com o mínimo possível de substâncias plasmáticas detectadas, sem afetar a detecção dos analitos. Foram testadas precipitações com ácido tricloroacético (NOLIN *et al.*, 2007), ácido perclórico (JACOBSEN *et al.*, 1994), ácido metafosfórico (MELNIK *et al.*, 1999), metanol, acetonitrila, acetona (JOHNSON *et al.*, 2008), etanol e isopropanol, todos seguidos de centrifugação a 13000 rpm por 20 minutos e refrigerada (4° C).

Dentre todos esses procedimentos, o que apresentou um maior equilíbrio entre uma boa precipitação e uma baixa interferência na detecção foi a precipitação com isopropanol. Nesse procedimento foi adicionado 200 uL de isopropanol a uma amostra de 100 uL de plasma. Essa amostra foi deixada por 10 minutos no gelo e centrifugada a 13000 rpm por 20 minutos, a 4 °C. Após isso foi filtrado o sobrenadante em membrana de PVDF de 0,22 um e diluído 1:1 no mesmo tampão utilizado na fase móvel.

4.1.4 Quantificação da cisteína e da cistina

Para realizar a quantificação dos analitos no plasma foram utilizadas soluções padrão contendo uma mistura de cisteína e cistina em várias concentrações. Essas soluções foram feitas sempre no dia da utilização, a partir de soluções estoque de cisteína e cistina estocadas em freezer a -80°C. As soluções estoque foram submetidas a processos de redução (no caso da cistina), reação com DTNB e leitura de absorbância para a determinação exata de suas concentrações.

As soluções padrão foram submetidas às mesmas condições utilizadas na preparação das amostras – diluição com isopropanol, centrifugação e filtração - analisadas no HPLC e utilizadas para a confecção de uma curva de concentração.

Para a realização das curvas de concentração foram utilizadas concentrações de cisteína e cistina de 5, 10, 30, 40 e 60 µM.

As curvas de concentração foram feitas plotando-se as áreas dos picos de cistina e cisteína e as concentrações correspondentes (Figura 4). Utilizando a equação da reta de cada curva era possível calcular as concentrações encontradas no plasma, a partir das áreas dos picos correspondentes. Foram utilizadas apenas retas com R^2 superior a 0,98.

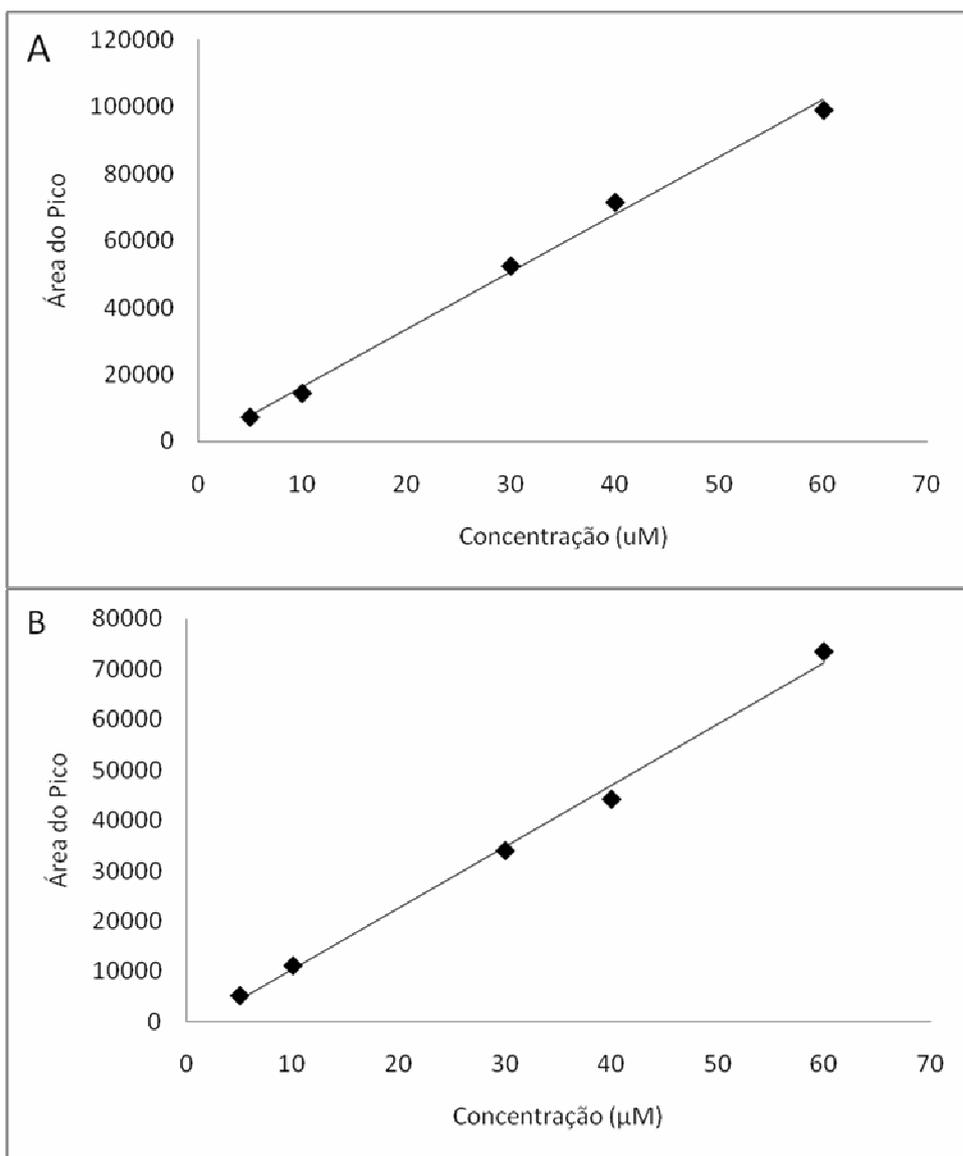


FIGURA 4 - CURVAS DE CONCENTRAÇÃO

NOTA: Cisteína (A), apresentando R^2 de 0,9949, e cistina (B), apresentando R^2 de 0,9953

Em dias de análise diferentes, as áreas correspondentes às concentrações padrões apresentavam variações de até 55% para a cisteína e de até 36% para cistina.

Para confirmar se as áreas dos picos estavam se mantendo ao longo das sucessivas injeções de amostras, soluções de concentração padrão foram injetadas

a cada duas amostras de plasma, assim como amostras de plasma contaminadas com concentrações conhecidas de cisteína e/ou cistina. Nos casos em que havia variação nas áreas dos picos ao longo do dia foi utilizado ainda um fator de correção, levando em conta a hora em que foi feita a análise e a curva de variação das áreas dos padrões. Essa curva era construída plotando-se a porcentagem de variação das áreas dos picos dos padrões injetados versus o tempo, em minutos, passado desde a confecção da curva de concentração (Figura 5). Desse modo, para se determinar a concentração nas amostras em que ocorria essa variação eram utilizadas duas variáveis, as áreas dos picos e o horário em que a amostra foi injetada. Essas variações na detecção podem ser devido a resíduos contidos no plasma que podem adsorver no detector ou, ainda, pelo fato de o mesmo não estar acondicionado em um local de temperatura constante, estando sujeito às variações de temperatura ao longo do dia.

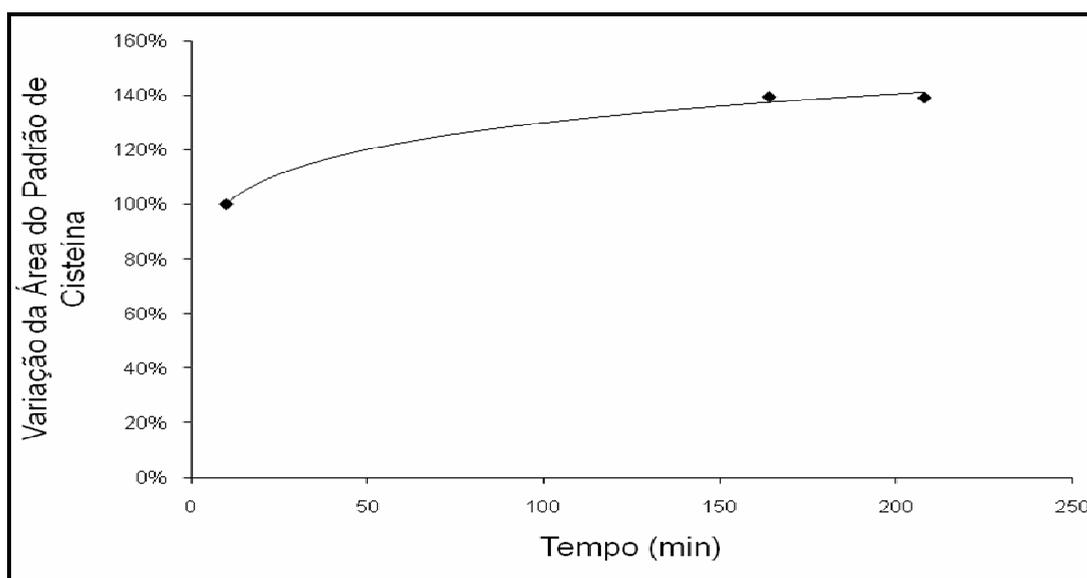


FIGURA 5 – FATOR DE CORREÇÃO

NOTA: Porcentagem de variação das áreas dos picos dos padrões injetados versus o tempo passado desde a confecção da curva de concentração

4.1.5 Coleta e armazenamento do plasma

O sangue foi coletado através de seringas para evitar a hemólise (Jones *et al.*, 1998) e recolhido em tubos de 1,5 mL contendo heparina sódica e DTPA. A

heparina foi utilizada para evitar a coagulação enquanto o DTPA atua como um quelante com afinidade por íons metálicos trivalentes e bivalentes, incluindo ferro (AISEN e LISTOWSKY, 1980), evitando a oxidação da cisteína. O quelante mais utilizado para a preservação de tióis tem sido o BPDS (bathophenanthroline disulfonate sodium salt) (Jones *et al.*, 1998), que também é um quelante de ferro. No entanto, devido à dificuldade de se obter este composto, optou-se pelo DTPA que, apesar de ser menos solúvel, tem as mesmas propriedades.

De acordo com McMenamim *et al.* (2009), após a coleta o sangue deve ser imediatamente colocado em gelo, centrifugado o mais rápido possível e o plasma obtido deve ser congelado sem demora. Seguindo essa orientação todo o sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 12000 g por 1,5 minuto para a separação das células sanguíneas e o plasma foi pipetado e congelado em gelo seco logo em seguida. Por ser necessário manter o sangue em temperatura ambiente para se obter a coagulação (MCMENAMIM *et al.*, 2009), o que poderia causar a oxidação da cisteína, foi descartada a utilização de soro e definida a utilização do plasma. O plasma foi então transportado em gelo seco e estocado em freezer -80° C até que a análise pudesse ser feita. Estudos mostraram que concentrações de tióis armazenados nessas temperaturas permanecem constantes por muitos anos (DUCROS *et al.*, 2002).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Os indivíduos com algum grau de doença renal crônica que participaram do estudo foram selecionados a partir dos respectivos prontuários médicos. Tanto na caracterização do paciente como doente renal crônico, como na classificação em um dos estágios da doença renal crônica foram utilizados os critérios definidos na National Kidney Foundation (2002).

A princípio o estudo tinha o objetivo de selecionar pacientes que sofriam apenas de doença renal crônica, rejeitando pacientes que sofriam de algumas comorbidades, entre elas o diabetes melito. Essa restrição se devia ao fato de que várias situações patológicas contribuem, ou estão ligadas de alguma forma com o estresse oxidativo no organismo (Valko *et al.*, 2007) o que acabaria por afetar a

quantificação do estresse nos doentes renais. O diabetes, por si só, introduz várias fontes de estresse oxidativo ao organismo (YOH *et al.*, 2008).

No entanto, a exclusão de pacientes com diabetes tornava inviável a realização do estudo, já que em 40% dos pacientes pesquisados a diabetes melito era a doença causadora da DRC (Tabela 1). Sendo assim, foram excluídos apenas os pacientes tabagistas ou que sofriam de doenças infecciosas e/ou malignidades.

TABELA 1 - DADOS DAS POPULAÇÕES

	Indivíduos saudáveis	Doentes renais (estágios 1-5)	Doentes renais em diálise
Número de indivíduos	8	25	10
Média de idade (anos)	55 ± 10	60 ± 15	52 ± 15
% de homens	50	51	60
% de diabéticos	0	40	0

Foi coletado sangue de 25 pessoas com DRC que não estavam sendo submetidas à diálise, sendo que deste total 28% apresentavam hipertensão arterial sistêmica como doença de base, além dos 40% de diabéticos já mencionados. Além dessas duas doenças mais frequentes, foram identificados pacientes com nefropatia obstrutiva, gota e malformações congênitas. Também foram recolhidas amostras de sangue de 10 pacientes com DRC que já estavam em hemodiálise. Nesse grupo, devido à maior quantidade de pacientes disponíveis, foi possível excluir os indivíduos que sofriam de diabetes do estudo.

Além disso, também foi coletado sangue de indivíduos saudáveis. Para isso foram selecionadas pessoas que não sofriam de nenhuma doença sistêmica, como hipertensão e diabetes, ou infecciosa. Foram feitos exames laboratoriais dos níveis de creatinina plasmática e de uréia plasmática para o cálculo da TFG e confirmação do funcionamento normal dos rins. Foram coletadas amostras de 8 indivíduos e todos apresentaram níveis plasmáticos de creatinina e uréia (Tabela 2) e taxas de filtração glomerular normais.

TABELA 2 - NÍVEIS DE CREATININA E URÉIA PLASMÁTICOS DOS INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS SELECIONADOS

Indivíduo	Creatinina Plasmática (mg/dL)	Uréia Plasmática (mg/dL)
1	1,09	34,1
2	1,19	12,86
3	1,53	31,5
4	1,09	26,1
5	0,96	23,8
6	1,01	16,9
7	1,35	26,3
8	0,86	18,6

NOTA: Valores de referência para creatinina: 0,53 – 1,00 mg/dL para mulheres e 0,70 – 1,20 mg/dL para homens (JUNGE *et al.*, 2004; CERIOTTI *et al.*, 2008). Valores de referência para uréia: 15 – 45 mg/dL (LABTEST, 2008).

A população de indivíduos saudáveis apresentou uma idade média de aproximadamente 55,5 anos, enquanto as populações de doentes renais crônicos apresentaram idades médias de 60 anos, para o grupo de pacientes em vários estágios da DRC, e 52,2 anos, para o grupo de pacientes com DRC que realizavam tratamento de hemodiálise (Tabela 1). A proporção de homens e mulheres nas três situações foi próxima de 1:1, com um predomínio de homens na população de pacientes em diálise (Tabela 1).

A população foi subdividida em 6 grupos (Tabela 3). Os doentes renais que não realizavam hemodiálise foram agrupados de acordo com a sua TFG e a classificação em 5 estágios da DRC (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002). Devido ao fato de os estágios 1 e 2 da DRC serem assintomáticos, com taxas de filtração glomerular normais ou apenas levemente diminuídas, pacientes nesses estágios são raros em ambulatórios e hospitais. Com base nisso os estágios 1 e 2 foram reunidos em um só grupo. Os pacientes que realizavam diálise foram reunidos em um grupo a parte, separados dos outros pacientes também classificados no estágio 5 que nunca haviam feito hemodiálise, porque alguns estudos mostraram

que a hemodiálise é um fator causador de aumento do estresse oxidativo (SCHETTLER *et al.*, 1998).

TABELA 3 - SUBDIVISÃO DA POPULAÇÃO DE PACIENTES

Grupo	Estágios	Número de indivíduos
A	Indivíduos Saudáveis	8
B	Estágio 1 e 2	7
C	Estágio 3	7
D	Estágio 4	8
E	Estágio 5 pré-diálise	3
F	Estágio 5 em diálise	10

4.3 ANÁLISE DO POTENCIAL DE REDUÇÃO PLASMÁTICO DE PACIENTES RENAIIS

As amostras de plasma coletadas foram analisadas, através do método padronizado, para a determinação das concentrações plasmáticas de cisteína e cistina. A partir dessas concentrações, utilizando a equação de Nernst, foram calculados os potenciais de redução de cada indivíduo.

Os potenciais de redução (Figura 6) apresentaram uma tendência de aumento, portanto, se mostrando mais oxidados, a partir do estágio 4 da DRC, o que coincide com os estágios onde a uremia e o estresse oxidativo se mostram mais presentes (MEYER E HOSTETTER, 2007).

Apesar da tendência observada, o único grupo que apresentou diferença significativa em relação aos indivíduos saudáveis foi o grupo F, que mostrou um grande aumento ($\Delta = +22,26$ mV) na média dos potenciais em relação aos indivíduos saudáveis. Apesar de não apresentar uma diferença estatística, este grupo apresentou também um aumento em relação aos doentes renais em estágio 5 que ainda não haviam sido submetidos à diálise ($\Delta = +10,16$ mV). Esse maior aumento reforça uma relação entre a diálise e o aumento do estresse oxidativo, associação já sugerida anteriormente por estudos que mostraram que as

membranas de diálise causavam a ativação de granulócitos (SCHETTLER *et al.*, 1998).

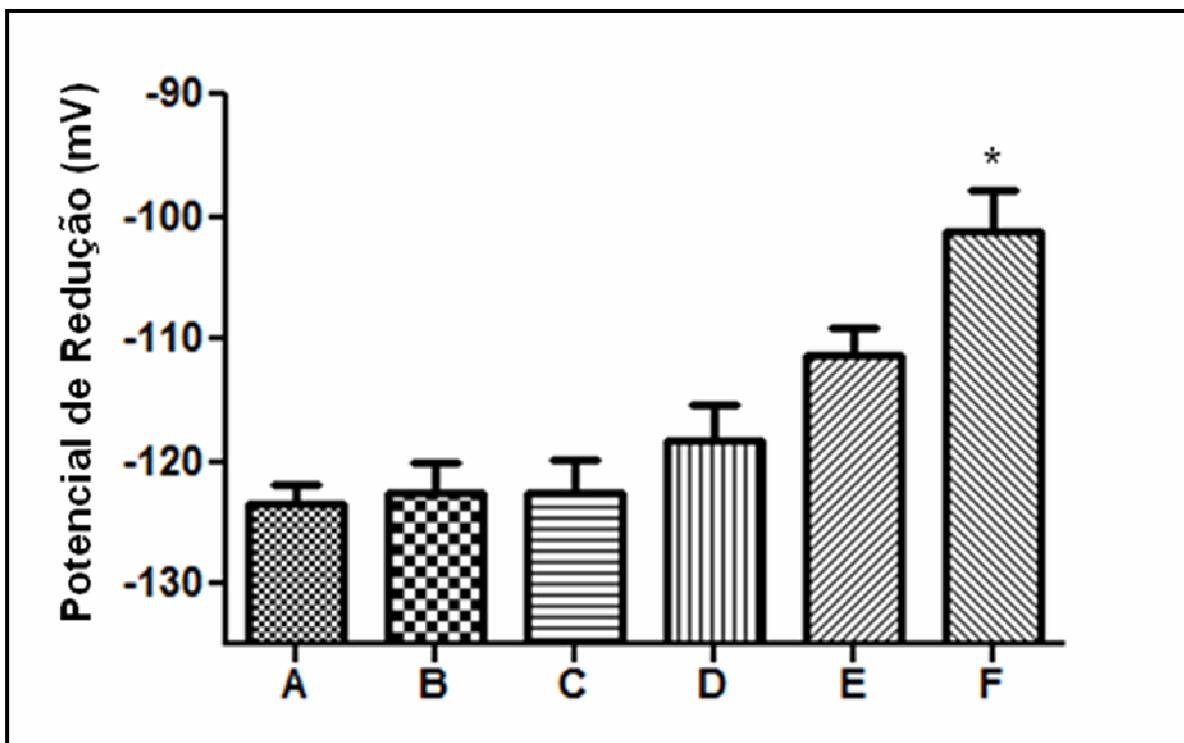


FIGURA 6 - POTENCIAL DE REDUÇÃO PLASMÁTICO DOS GRUPOS PESQUISADOS
NOTA: (A) Indivíduos Saudáveis, (B) Estágios 1 e 2, (C) Estágio 3, (D) Estágio 4, (E) Estágio 5 Pré-Diálise, (F) Estágio 5 em Diálise. * $P < 0,05$ versus A, B, C e D

No entanto, mesmo com os dados apresentando o perfil esperado de aumento progressivo do potencial de redução plasmático da CyS/CySS ao longo dos estágios da DRC, os potenciais de redução apresentaram valores muito menores do que os valores encontrados para populações saudáveis em outros estudos (BLANCO *et al.*, 2007; JONES E LIANG, 2009). Enquanto os valores de referência indicam potenciais próximos a -80 mV para indivíduos saudáveis, os valores encontrados no trabalho ficaram em torno de -120 mV para indivíduos saudáveis. Essa diferença de potenciais vem do fato de que as concentrações determinadas (tabela 4) de cisteína no plasma foram aproximadamente 500% maiores que os valores encontrados na literatura para pessoas saudáveis, enquanto as concentrações de cistina foram 50% menores. Tióis, como a cisteína, sofrem rápida oxidação em temperatura ambiente, podendo vir a formar dissulfetos, como a cistina, que tendem a ser estáveis no plasma (KLEINMAN e RICHIE, 2000), o que sugere

que essas discrepâncias entre os resultados obtidos e dados da literatura podem ser resultado de oxidações ocorridas antes da análise dos plasmas, nos outros estudos. Uma hipótese para essa maior oxidação em outros estudos pode ser o fato de que a grande maioria deles (BLANCO *et al.*, 2007; JONES e LIANG, 2009; MCMENAMIN *et al.*, 2009) utiliza a detecção por fluorescência, que necessita de uma etapa de derivatização das amostras, na qual pode estar havendo a oxidação da cisteína, enquanto a detecção coulométrica não necessita dessa etapa. Outra explicação seria uma diferença ambiental e cultural, já que os outros experimentos foram realizados, na grande maioria, nos Estados Unidos, onde a alimentação é diferente e os indivíduos estão expostos a poluentes, toxinas e patógenos diferentes. Tudo isso poderia contribuir para um estado redox mais oxidado.

TABELA 4. CONCENTRAÇÕES DE CISTEÍNA E CISTINA E POTENCIAIS DE REDUÇÃO DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

	CyS (μM)	CySS (μM)	CyS total (μM)	Potencial (mV)
Valores de referência (JONES e LIANG, 2009)	$8,6 \pm 3,4$	47 ± 19	102,6	-72 ± 14
Valores encontrados no Grupo A	$41,9 \pm 5,2$	$26,1 \pm 17,7$	94,1	$-123,5 \pm 4,8$

NOTA: A cisteína total corresponde a CyS + 2 CySS

No entanto, a oxidação da cisteína não leva apenas a formação de cistina. A oxidação de tióis pode levar a formação de diversos outros produtos, incluindo ácidos sulfênicos, sulfínicos e sulfônicos (LEICHERT e JAKOB, 2006). Além disso, a cisteína pode ser convertida em vários outros produtos, dentro de sistemas biológicos (Figura 7). Esses são fatores que podem contribuir para a diferença entre as concentrações totais de cisteína encontradas nesse e em outros estudos (tabela 4). Essa concentração total de cisteína foi calculada a partir das concentrações de cisteína e cistina, levando em conta que uma cistina é formada por duas cisteínas ligadas por uma ponte dissulfeto.

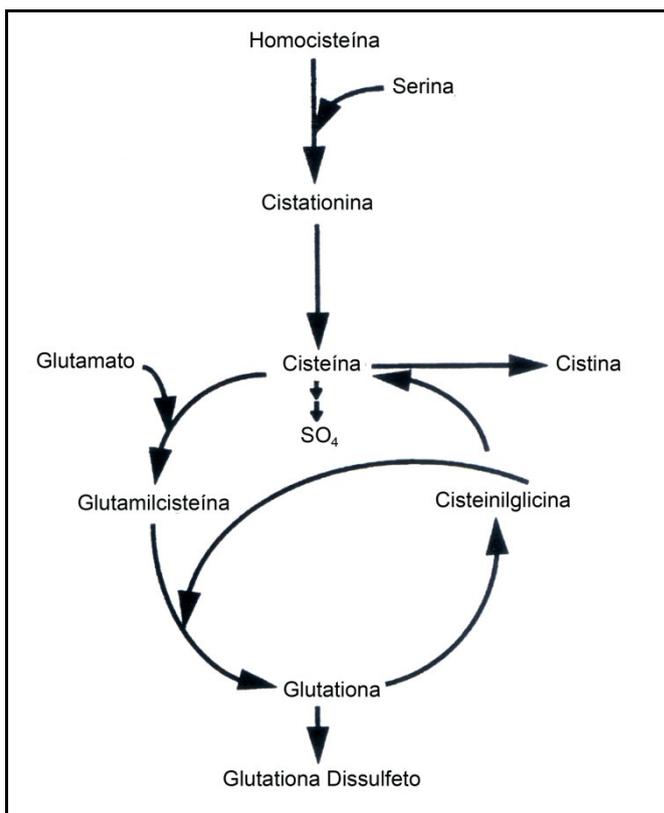


FIGURA 7 - DIAGRAMA SIMPLIFICADO DO METABOLISMO DE AMINOTIÓIS
 FONTE: Adaptado de Melnyk *et al.* (1999)

Utilizando os mesmo dados, foram construídos dois gráficos (figura 8) de potencial de redução versus TFG, para se determinar a correlação entre essas duas variáveis. Quando se observou todos os indivíduos (Figura 8 A), incluindo os diabéticos, pudemos aferir que a TFG responde por 25% da variação do potencial de redução, com um $P < 0,005$.

Quando se observou a mesma correlação, mas excluindo-se os indivíduos diabéticos (Figura 8 B), houve uma diminuição dessa relação, com a TFG explicando apenas 12% da variação do potencial de redução. No entanto, esse enfraquecimento da correlação pode ser, em grande parte, devido à diminuição do número total de indivíduos, já que não apresentou diferença estatística significativa ($P > 0,1$).

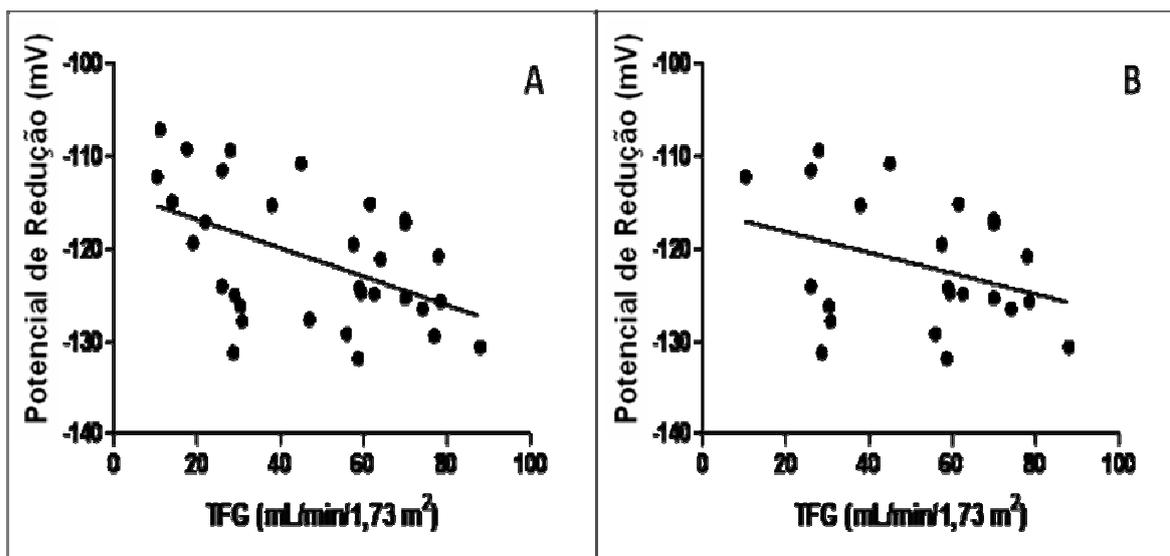


FIGURA 8 - CORRELAÇÃO ENTRE A TFG E O POTENCIAL DE REDUÇÃO DE TODOS OS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS A-D (A) E GRÁFICO DA MESMA CORRELAÇÃO EXCLUINDO OS INDIVÍDUOS DIABÉTICOS (B)
 NOTA: (A) $R^2 = 0,25$ $P = 0,0036$ (B) $R^2 = 0,12$ $P = 0,11$

4.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DA DETECÇÃO DO CONTEÚDO CARBÔNICO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Além do potencial de redução plasmático da cisteína/cistina, foi utilizado outro biomarcador para se quantificar o estresse oxidativo da população pesquisada. Para isso foi utilizado, como marcador de dano oxidativo em proteínas, o conteúdo carbonílico das proteínas plasmáticas.

As amostras foram então submetidas ao método descrito por Quinlan e Gutteridge (2000) e analisadas em espectrofotometria para a determinação da concentração de carbonilas nas proteínas plasmáticas.

Apesar de os valores obtidos (Figura 9) estarem próximos dos valores de referência encontrados na literatura, de 0,5 – 4,0 nmol/ mg de proteína no plasma humano (REZNICK e PARCKER, 1992), os resultados não permitiram afirmar se havia um aumento do conteúdo carbonílico das proteínas plasmáticas ao longo da progressão renal. Houve uma grande variação das concentrações de carbonilas entre os indivíduos de mesmo grupo, o que acabou por inviabilizar uma análise mais detalhada dos resultados.

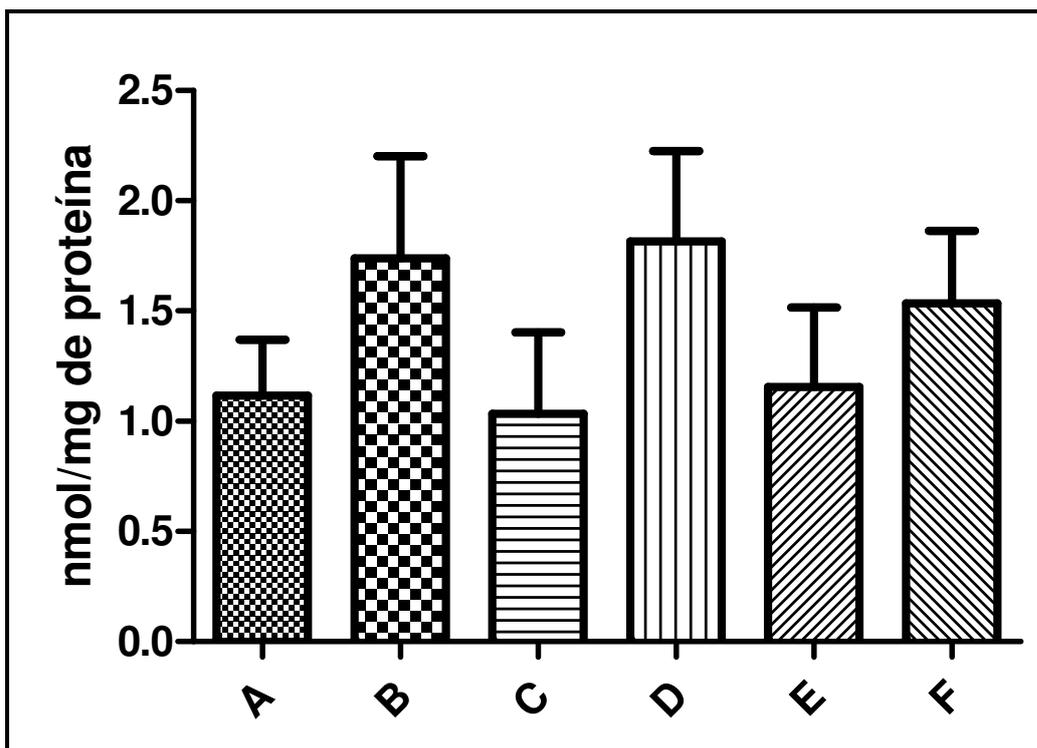


FIGURA 9 - CONTEÚDO CARBONÍLICO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

NOTA: (A) Indivíduos Saudáveis, (B) Estágios 1 e 2, (C) Estágio 3, (D) Estágio 4, (E) Estágio 5 Pré-Diálise, (F) Estágio 5 em Diálise

O fato de os experimentos realizados para quantificar o dano oxidativo em proteínas plasmáticas não terem sido conclusivos para confirmar o estresse oxidativo detectado pelo método recém padronizado conduz a duas hipóteses. Ao mesmo tempo em que gera dúvidas quanto ao real estresse oxidativo apresentado pelas populações doentes, pode indicar que o método padronizado seja mais sensível do que o método utilizado para quantificação do dano oxidativo em proteínas.

5 CONCLUSÃO

Com base em uma série de estudos e experimentos, com o propósito de determinar os parâmetros ideais de cromatografia, coleta e armazenamento do plasma e quantificação de cisteína e cistina, foi possível padronizar um método, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e detecção coulométrica, para análise do potencial de redução baseado no par cisteína/cistina em plasma humano.

O método mostrou-se capaz de demonstrar um aumento do potencial de redução plasmático do par CyS/CySS em situações patológicas já descritas como oxidativas, sugerindo um aumento progressivo do estresse oxidativo à medida que a DRC evolui e também um maior estresse nos pacientes em hemodiálise. Entretanto, apesar de uma visível tendência, o aumento progressivo do potencial ao longo dos estágios da doença renal não foi estatisticamente significante, o que sugere que, talvez com um número maior de indivíduos estudados, possa se obter uma maior relevância estatística.

6 REFERÊNCIAS

AISEN, P.; LISTOWSKY, I. Iron transport and storage proteins. **Ann Rev Biochem**, v. 49, p. 367-93, 1980.

ALONSO, A., LAU, J., JABER, B.L., WEINTRAUB, A., SARNAK, M.J. Prevention of radiocontrast nephropathy with N-acetylcysteine in patients with chronic kidney disease: a meta-analysis of randomized, controlled trials. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 43, p.1-9, 2004.

ANDREOLI, T.E.; CARPENTER, C.C.J.; GRIGGS, R.C.; LOSCALZO, J. **Cecil – Medicina interna básica**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ASHFAQ, S.; ABRAMSON, J. L.; JONES, D. P.; RHODES, S. D.; WEINTRAUB, W. S.; HOOPER, W. C.; VACCARINO, V.; HARRISON, D. G.; QUYYUMI, A. A. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 47, p.1005–1011; 2006.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. Oficina de Textos, São Paulo, 2006.

BERGER M.M. Can oxidative damage be treated nutritionally? **Clin Nutr.**, v. 24, p.172–183, 2005.

BLANCO, R.A., ZIEGLER, T.R., CARLSON, B.A., CHENG, P., PARK, Y., COTSONIS, G.A., ACCARDI, C.J., JONES, D.P. Diurnal variation in glutathione and cysteine redox states in human plasma. **Am J Clin Nutr**; v. 86, p.1016 –23, 2007.

BONNEFONT–ROUSSELOT, D., The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. **Treat Endocrinol**, v. 3, p.41–52, 2004.

BRENNER, B.M. **Brenner and Rector's The Kidney**. 8ª ed. Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier Inc., 2008.

CANTIN, A.M., Potential for antioxidant therapy of cystic fibrosis. **Curr Opin Pulm Med.**, v. 10, p.531–536, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevalence of chronic kidney disease and associated risk factors – United States, 1999-2004. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v. 56, p.161-165, 2007.

CERIOTTI, F., BOYD, J.C., KLEIN, G., HENNY, J., QUERALTÓ, J., KAIRISTO, V., PANTEGHINI, M. Reference Intervals for Serum Creatinine Concentrations: Assessment of Available Data for Global Application. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 559-566, 2008.

CHEIDA, L.E. **Biologia Integrada**. São Paulo: Ed FTD. 2002.

CIRILLO, M. Evaluation of glomerular filtration rate and of albuminuria/proteinuria. **JNephrol.**, v. 23, n. 02, p. 125-132, 2010.

CLERMONT, G., LECOUR, S., LAHET, J.-J., SIOHAN, P., VERGELY, C., CHEVET, D., RIFLE, G., ROCHETTE, L.. Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. **Cardiovasc. Res.**, v. 47, p. 618-623, 2000.

COCKCROFT D.W.; GAULT M.H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. **Nephron**, v. 16, p.31-41, 1976.

CONWAY, B.; WEBSTER, A.; RAMSAY, G.; MORGAN, N.; NEARY, J.; WHITWORTH C.; HARTY, J. Predicting mortality and uptake of renal replacement therapy in patients with stage 4 chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**; v. 24, p. 1930–1937, 2009.

COUNAHAN R, CHANTLER C, GHAZALI S, KIRKWOOD B, ROSE F, BARRATT TM: Estimation of glomerular filtration rate from plasma creatinine concentration in children. **Arch Dis Child**, v. 51, p.875–878, 1976.

DESCHAMPS-LATSCHA, B., DRÜEKE, T. WITKO-SARSAT, V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. **Sem. Dial.**, v. 14, p.193-199, 2001.

DIAZ-BUXO, J.A., WOODS, H.F. Protecting the endothelium: a new focus for management of chronic kidney disease. **Hemodial. Int.**, v. 10, p. 42-48, 2006.

DUCROS, V.; DEMUTH, K.; SAUVANT, M.P.; QUILLARD, M.; CAUSSE, E.; CANDITO, M.; READ, M.H.; DRAI, J.; GARCIA, I.; GERHARDT, M.F. Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results. **J Chromatogr B**, v. 781, p. 207-226, 2002.

DUIJVESTIJN, Y.C., BRAND, P.L. Systematic review of N-acetylcysteine in cystic fibrosis. **Acta Paediatr.**, v. 88, p.38-41, 1999.

GALLI, F. Protein damage and inflammation in uremia and dialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 22, 2007.

GOODMAN, G.E., THORNQUIST, M.D., BALMES, J., CULLEN, M.R., MEYSKENS, F.L. JR, OMENN, G.S., VALANIS, B., WILLIAMS, J.H. JR. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 96, p.1743-1750, 2004.

HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231-255, 2004.

HIMMELFARB, J., MCMONAGLE, E., MCMENAMIN, E.. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. **Kidney Int.**, v. 58, p.2571-2578, 2000.

HIMMELFARB, J. Relevance of oxidative pathways in the pathophysiology of chronic kidney disease. **Cardiol Clin.**, v. 23, p. 319-330, 2005.

HIMMELFARB, J. Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy. **Seminars in Dialysis**, v. 22, n. 6, p. 636-643, 2009.

IYER, S. S., ACCARDI, C. J., ZIEGLER, T. R., BLANCO, R. A., RITZENTHALER, J. D., ROJAS, M., ROMAN, J., JONES, D. P. Cysteine redox potential determines pro-inflammatory IL-1 β levels. **Plos One**, 4. 2009.

JACOBSEN, D. W., GATAUTIS, V. J., GREEN, R., ROBINSON, K., SAVON, S. R., SECIC, M., OTTO, J. M., TAYLOR, L. M. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. **Clin. Chem.**, v. 40/6, p. 873-881, 1994.

JOCELYN, P. C. Chemical reduction of disulfides. **Methods in Enzymology**, v. 143, p. 246-256, 1987.

JOHNSON, J. M., STROBEL, F. H., REED, M., POHL, J., JONES, D.P. A rapid LC-FTMS method for the analysis of cysteine, cystine and cysteine/cystine steady-state redox potential in human plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 396, p. 43-48, 2008.

JONAS, C. R.; PUCKETT, A. B.; JONES, D. P.; GRIFFITH, D. P.; SZESZYCKI, E. E.; BERGMAN, G. F.; FURR, C. E.; TYRE, C.; CARLSON, J. L.; GALLOWAY, J. R.; BLUMBERG, J. B.; ZIEGLER, T. R. Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. **Am. J. Clin. Nutr.**,v. 72, p.181–189; 2000.

JONES, D.P. CARLSON, J.L. SAMIEC, P.S. STERNBERG, P. MODY, V.C. REED, R.L. BROWN, L.S. Glutathione measurement in human plasma Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. **Clinica Chimica Acta**, v. 275, p.175–184, 1998.

JONES, D.P., MODY, V.C. JR, CARLSON, J.L., LYNN, M.J., STERNBERG, P. JR. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p.1290-1300, 2002.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress. Forum review. **Antiox. Redox Signal**, v. 8, p. 1865-1897, 2006.

JONES, D.P. Radical free biology of oxidative stress. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 295, C849-C868, 2008.

JONES, D.P.; LIANG, Y.; Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1329-1338, 2009.

JORDAN, P. A.; GIBBINS, J. M. Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. **Antioxid. Redox Signal**, v. 8, p. 312–324; 2006.

JUNGE, W., WILKE, B., HALABI, A., KLEIN, G. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffe´ method. **Clinica Chimica Acta**, v. 344, p. 137-148, 2004.

KEMP, M.; GO, Y.; JONES D.P. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v.44, p. 921–937, 2008.

KLEINMAN, W.A.; RICHIE, J.P.; Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. **Biochemical pharmacology**, v. 60, p. 19-29, 2000.

LABTEST – URÉIA CE – INSTRUÇÕES DE USO. Labtest Diagn.

LEICHERT, L.I.; JAKOB, U. Global methods to monitor the thiol-disulfide state of proteins in vivo. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 5 e 6, p. 763-772, 2006.

LEVEY AS, BOSCH JP, LEWIS JB, GREENE T, ROGERS N, ROTH D: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. **Ann Intern Med.**, v. 130, p.461–470, 1999.

LOCATELLI, F., CANAUD, B., ECKARDT, K.-U., STENVINKEL, P., WANNER, C., ZOCCALI, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging therat to patient outcome. **Nephrol. Dial. Tranplant**, v. 18, p. 1272-1280, 2003.

LONN, E., BOSCH, J., YUSUF, S., SHERIDAN, P., POGUE, J., ARNOLD, J.M., ROSS, C., ARNOLD, A., SLEIGHT, P., PROBSTFIELD, J., DAGENAIS, G.R. HOPE and HOPE-TOO Trial Investigators. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 293, p. 1338-1347, 2005.

MARCOS, M.A.G., SÁNCHEZ, E.R., RODRÍGUEZ, J.I.R., CANTERA, C.M., BLANES, R.R., ORTIZ, L.G. Differences between the CKD-EPI and the MDRD equations when estimating the glomerular filtration rate in hypertensive patients. **Nefrologia**, v. 30, n. 4, p. 458-462, 2010.

MATSUYAMA, Y., TERAWAKI, H., TERADA, T., ERA, S. Albumin thiol oxidation and serum protein carbonyl formation are progressively enhanced with advancing stages of chronic kidney disease. **Clin. Exp. Nephrol.**, 2009.

MCMENAMIN, M.E.; HIMMELFARB, J.; NOLIN, T.D. Simultaneous analysis of multiple aminothiols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 3274-3281, 2009.

MELNYK, S., POGRIBNA, M., POGRIBNY, I., HINE, R.J., JAMES, S.J. A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminothiols using coulometric electrochemical detection. **J. Nutr Biochem.**, v. 10, p. 490-497, 1999.

MEYER, T. W.; HOSTETTER, T. H. Uremia. **N Eng J Med.**, v. 357, p. 1316-1325, 2007.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 2^a ed. England: John Wiley & Sons Ltd., 1996.

MORIARTY, S.E., SHAH, J.H., LYNN, M., JIANG, S., OPENO, K., JONES, D.P., STERNBERG, P. Oxidation of glutathione and cysteine in human plasma associated with smoking. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 35, p.1582-1588, 2003.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. **Am J Kidney Dis** 39:S1-S266, 2002 (suppl 1)

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3^a Ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NOLIN, T. D., MCMENAMIN, M. E., HIMMELFARB, J. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: Application to studies of oxidative stress. **Journal of Chromatography B**, v. 852, p. 554-561, 2007.

ORRELL, R., LANE, R., ROSS, M. Antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis / motor neuron disease. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 24, p.CD002829, 2007.

POTTEL, H., HOSTE, L., MARTENS, F. New insights in glomerular filtration rate formulas and chronic kidney disease classification. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 1341-1347, 2010.

QUINLAN, G.J.; GUTTERIDGE, J.M.C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species**. England: Oxford University Press, p. 257-258, 2000.

RAMALHO, R. J.; RAMALHO, H.J.; ABBUD FILHO, M. Insuficiência renal crônica: uma visão para o médico generalista. In: **Sistema de educação continuada a distância - PROCLIM**. Ciclo 6, modulo 3. Porto Alegre: Artmed/Panamericana, p. 53-78, 2009.

REEVES, J. P.; BAILEY, C. A.; HALE, C. C. Redox modification of sodiumcalcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p.4948-4955; 1986.

REZNICK, A.Z., PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol.**, v. 233, p. 357-363, 1992.

RIZVI, S.I., MAURYA, P.K. L-Cysteine Influx in Erythrocytes as a Function of Human Age. **Rejuvenation Research**, v 11, n.3, p.661-665, 2008.

ROBINSON, I., DE SERNA, D.G., GUTIERREZ, A., SCHADE, D.S. Vitamin E in humans: an explanation of clinical trial failure. **Endocr. Pract.**, v. 12, p. 576-582. 2006.

SCHAFER, F. Q., BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med.**, v.30, p.1191-1212, 2001.

SCHETTLER, V.; WIELAND, E.; METHE, H.; SCHUFF-WERNER, P.; MÜLLER, G.A.; Oxidative stress during dialysis: effect on free radical scavenging enzyme (FRSE) activities and glutathione (GSH) concentration in granulocytes. **Nephrol Dial Transplant**, v. 13, p. 2588-2593, 1998.

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

SCHWARTZ G.J., HAYCOCK G.B., EDELMANN C.M., SPITZER A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. **Pediatrics**, v. 58, p.259–263, 1976.

SESSO, R.; LOPES, A.A.; THOMÉ, F.S.; BEVILACQUA, J.L.; ROMÃO JUNIOR, J.E.; LUGON, J. Relatório do censo brasileiro de diálise 2008. **J Bras Nefrol.**, v. 30, p. 233-238, 2008.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: **Oxidative stress**. Ed. Sies, H., Academic Press, London, p.1-8, 1985.

SILBIGER, S.R.; NEUGARTEN, J. The role of gender in the progression of renal disease. **Adv Ren Replace Ther.**, v. 10, p. 3–14, 2003.

STEVENS, L.A., SCHMID, C.H., GREENE, T., ZHANG, Y., BECK, G.J., FROISSART, M., HAMM, L.L., EGGERS, P.W., CORESH, J., LEVEY, A.S. Comparative performance of the CKD epidemiology collaboration (CKD-EPI) and the modification of diet in renal disease (MDRD) study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1,73 m². **Am J Kidney Dis.**, 2010.

STOCKER, R., KEANEY, J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev.**, v. 84, p.1381–1478, 2004.

TEPEL, M., VAN DER GIET, M., STATZ, M., JANKOWSKI, J., ZIDEK, W. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. **Circulation**, v. 107, p.992-995, 2003.

UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM 2008. Annual data atlas of Chronic kidney disease and end-stage renal disease in the united states. **Am J Kidney Dis.**, v. 53, p.129-142, 2009.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p.44-84, 2007.

VAZIRI, N.D., DICUS, M., HO, N.D., BOROUJERDI,-RAD, L., SINDHU, R.K. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. **Kidney Int.**, v. 63, p.179-185, 2003.

VINA, J., LLORET A., ORTI R., ALONSO D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. **Mol Aspects Med.**, v. 25, p.117–123, 2004.

WALSER, M. Assessing renal function from creatinine measurements in adults with chronic renal failure. **Am J Kidney Dis.**, v. 32, p.23–31, 1998.

WERNECK, M.L., FRANÇA, K, FORTES, P.C.N, AVELES, P., FERNANDES, D., LAURINDO, F.R., PECOITS-FILHO, R., NAKAO, L.S. Increased reactive oxygen species formation in endothelial cells induced by uremic serum. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 17, p. 27A, 2006.

WILLIAMS, K.J., FISHER, E.A. Oxidation, lipoproteins, and atherosclerosis: which is wrong, the antioxidants or the theory? **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 8, p.139-146, 2005.

YANG, J.; CHEN, H.; VLAHOV, I. R.; CHENG, J. X.; LOW, P. S. Evaluation of disulfide reduction during receptor-mediated endocytosis by using FRET imaging. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, p.13872–13877; 2006.

YAO, Q., PECOITS-FILHO, R., LINDHOLM, B., STENVINKEL, P. Traditional and non-traditional risk factors as contributors to atherosclerotic cardiovascular disease in end-stage renal disease. **Scand. J. Urol.**, v. 38, p. 405-416, 2004.

YOH, K.; HIRAYAMA, A.; ISHIZAKI, K.; YAMADA, A.; TAKEUCHI, M.; YAMAGISHI, S.; MORITO, N.; NAKANO, T.; OJIMA, M.; SHIMOHATA, H.; ITOH, K.; TAKAHASHI, S.; YAMAMOTO, M. Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. **Genes to Cells**, v. 13, p. 1159-1170, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, _____ anos, portador do RG _____ manifesto aqui meu consentimento em participar da pesquisa intitulada “Padronização de metodologia baseada em HPLC e detecção eletroquímica para determinação do potencial de redução plasmático de doentes renais”, sob responsabilidade da Dra. Lia S. Nakao, professora e pesquisadora do Laboratório de Neurobiologia, Departamento de Patologia Geral, Setor de Ciências Biológicas, UFPR.

Estou ciente de que:

- (i) Tal pesquisa poderá abrir novas perspectivas quanto ao entendimento da evolução de doenças vasculares associadas à doença renal crônica, e que a utilização do meu sangue poderá beneficiar outras pessoas a um médio-longo prazo;
- (ii) O sangue será coletado de uma veia de meu antebraço por profissional habilitado e a quantidade coletada (5 mL – 10 mL) não causará repercussão sobre meu estado de saúde, gerando apenas o desconforto na hora da coleta;
- (iii) Poderei a qualquer momento (desde o início até o final da pesquisa) solicitar esclarecimentos sobre a pesquisa;
- (iv) Tenho a liberdade de recusar-me a participar ou retirar meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo;
- (v) Minha privacidade está garantida quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa;
- (vi) Estou doando, e não vendendo, meu sangue, e portanto, não receberei dinheiro por tal ato.

Estando de acordo com tal termo, firmo aqui,

Nome, data e assinatura: _____