

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLA JULIANA RIBEIRO DOLENGA

**DETERMINAÇÃO DE TOXINAS URÊMICAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC)**

CURITIBA
Maio/2016

CARLA JULIANA RIBEIRO DOLENGA

**DETERMINAÇÃO DE TOXINAS URÊMICAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC)**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lia Sumie Nakao

CURITIBA
Maio/2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Dolenga, Carla Juliana Ribeiro
Determinação de toxinas urêmicas em amostras biológicas por
cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). / Carla Juliana Ribeiro
Dolenga. – Curitiba, 2016.
65 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Lia Sumie Nakao

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

1. Toxinas. 2. Insuficiência Renal Crônica. 3. Cromatografia líquida de
alta eficiência. I. Título. II. Nakao, Lia Sumie. III. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 543.6854
616.6



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Determinação de toxinas urêmicas em amostras biológicas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)”

por

Carla Juliana Ribeiro Dolenga

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

Prof^ª. Dr^ª. Lia Sumie Nakao

Presidente

Prof^ª. Dr^ª. Andrea Novais Moreno-Amaral

Prof^ª. Dr^ª. Glauca Regina Martinez

Dr. Max Ingberman

Curitiba, 25 de maio de 2016.

*Dedico este trabalho
Ao meu querido e amado esposo Sandro,
Por seu amor incondicional e
Aos meus pais (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a vida e a fé nos momentos mais difíceis.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Dra Lia Sumie Nakao por ter me dado a oportunidade de chegar até aqui, pelos ensinamentos, paciência, amizade, por ter confiado a mim um trabalho tão especial, por achar que eu seria capaz.

Aos meus amados pais (*in memoriam*) por todo apoio, incentivo, amor e carinho que me proporcionaram durante suas vidas, fazendo de mim a pessoa que sou hoje. Vocês foram o meu espelho, e a dor misturada com a saudade me fez forte durante minha caminhada.

Ao meu esposo Sandro, por ser meu melhor amigo, estar comigo em todos os momentos, entender a minha ausência e não me deixar desistir diante das dificuldades, te amo.

Aos professores Silvio Marques Zanata e Adriana Mercadante por sempre estarem dispostos a solucionar as dúvidas emergenciais e pelo conhecimentos transmitidos.

Aos financiadores deste trabalho (CNPq, Fundação Araucária e Redoxoma), à CAPES e ao Programa de Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR, pela concessão da bolsa de estudos

Ao Max por ter me apresentado o mundo da ciência e pela amizade; a Fernanda por dividir seus conhecimentos no início desta caminhada e pela amizade; ao Douglas e Karime pela ajuda na etapa final deste trabalho e pela amizade.

A Zaine e Sílvia, vocês foram essenciais na fase de coleta de amostras; a Roberta, Sze, Camila, Nathly, Bruna, Isa, Bruno, Susumu e Valentin ajuda e amizade, com vocês dei muitas risadas e aprendi muitas coisas.

Ao nosso grupo de estudos Redox pelos conhecimentos adquiridos e pela amizade, a equipe do Laboratório de Neurobiologia e Patologia Redox da UFPR, pela grande oportunidade.

As grandes amigas Ellen e Paola por estarem sempre dispostas a me ouvir.

Agradeço, por fim, a todos que torceram por mim de alguma forma e contribuíram para meu sucesso e crescimento pessoal. Hoje sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

*"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve...
E a vida é muito para ser insignificante."*

(Charles Chaplin)

RESUMO

O interesse crescente nos mecanismos moleculares da toxicidade urêmica tem incentivado os pesquisadores da área de nefrologia a analisar os efeitos patológicos de cada toxina individualmente. Para isso, o monitoramento de suas concentrações em diversas amostras biológicas (como soro, plasma, urina ou em células e tecidos) torna-se importante para permitir uma avaliação detalhada e mecanística de seus efeitos. Além disso, em termos clínicos, a determinação das concentrações das toxinas urêmicas em fluidos biológicos poderá ser utilizada para avaliar o efeito de intervenções dietéticas ou farmacológicas na função renal. Dados da *National Kidney Foundation* indicam que nos Estados Unidos, Europa e Japão, o número de pacientes com doença renal crônica (DRC) tem aumentado nos últimos anos. A Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) divulgou no ano de 2011 que o número de doentes renais no Brasil dobrou na última década. Estima-se que no país 10 milhões de pessoas apresentam alguma disfunção renal, e destas, de 90 a 100 mil passam por diálise (SBN, 2011). A síndrome urêmica é causada pela retenção de metabólitos no organismo devido a uma disfunção renal, quando os mesmos deveriam ser eliminados através da urina e/ou metabolizados pelos rins. Em pacientes doentes renais crônicos é muito comum uma excreção urinária deficiente levando ao acúmulo de toxinas urêmicas no plasma, quadro denominado de uremia. A uremia induz disfunção endotelial, inflamação e calcificação vascular, além de estresse oxidativo sistêmico que tende a aumentar com a progressão da doença. Utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detecção por fluorescência, estabelecemos um método para identificar e quantificar simultaneamente as concentrações totais de três toxinas urêmicas persistentes (que se ligam a proteínas) em amostras de soro e plasma. Escolhemos as toxinas indoxil sulfato (IS), *p*-cresilsulfato (PCS) e ácido indol-3 acético (3-IAA) por serem de grande interesse clínico. O método possui alta resolução, com separações rápidas e reprodutíveis. A validação do método foi realizada com base na Resolução 27/2012 (ANVISA) e em outros estudos já publicados. As curvas de calibração para cada toxina apresentaram excelentes linearidades ($R^2 > 0,99$) e os limites de quantificação encontrados no soro para IS, *p*-CS e 3-IAA foram 1,1, 24,5 e 0,2 pmol, respectivamente, e no plasma para IS, PCS e 3-IAA foram 4,8, 8,1 e 0,3 pmol, respectivamente. As precisões *intraday* e *interday* apresentaram variações inferiores a 5% para as 3 toxinas nas 2 matrizes estudadas. Além disso estabelecemos um método para analisar a incorporação de indoxil sulfato em células mesangiais em cultura. A identificação e a quantificação das toxinas urêmicas nessas amostras podem contribuir para o acompanhamento da progressão da DRC, bem como alterações na conduta terapêutica.

Palavras chaves: toxinas urêmicas, DRC, HPLC, fluorescência.

ABSTRACT

The growing interest in the molecular mechanisms of uremic toxicity has encouraged researchers from the nephrology area to examine the pathological effects of each toxin individually. To this end, monitoring their concentrations in various biological samples (such as serum, plasma, urine and tissues or cell) becomes important to allow a detailed mechanistic evaluation of their effects. Furthermore, in clinical terms, the determination of concentrations of uremic toxins in biological fluids can be used to assess the effects of dietary or pharmacological interventions in renal function. Data from the National Kidney Foundation indicate that in the United States, Europe and Japan, the number of patients with chronic kidney disease (CKD) has increased in recent years. The Brazilian Society of Nephrology (SBN) announced in 2011 that the number of kidney disease patients in Brazil has doubled in the last decade. It is estimated that in our country 10 million people have some renal dysfunction, and of these, 90 to 100 thousand undergo dialysis (SBN, 2011). The uremic syndrome is caused by the retention of metabolites in the body due to renal dysfunction, when they should have been eliminated through the urine and / or metabolized by the kidneys. A poor urinary excretion leading to the accumulation of uremic toxins in the plasma is a feature of chronic renal failure patients. This buildup, referred to as uremia, induces endothelial dysfunction, vascular inflammation and calcification, and systemic oxidative stress, which tends to increase with disease progression. Using high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection, we established a method to identify and quantify simultaneously the total concentrations of three persistent uremic toxins (which bind to proteins) in serum and plasma samples. We have chosen indoxyl sulfate toxins (IS), *p*-cresylsulphate (PCS) and 3-indole acetic acid (3-IAA), due to their clinical importance. The method has high resolution, and fast and reproducible separations. The method validation was based on the ANVISA document RDC 27/2012 and other published studies. The calibration curves for each toxin presented excellent linearities, with $R^2 > 0.99$ and the quantitation limits found in serum IS, *p*-CS and 3-IAA were 1,1, 24,5 and 0,2 pmol, respectively, and in plasma for IS, PCS and 3-IAA were 4.8, 8.1 and 0.3 pmol, respectively. The intraday and interday accuracies showed lower variations of 5% for the 3 toxins in 2 matrices studied. Furthermore, we established a method to analyze the uptake of indoxyl sulphate by mesangial cells in culture. The identification and quantification of uremic toxins in these samples can contribute to the monitoring of CKD progression, as well as to conduct changes in therapeutic approaches.

Keys words: uremic toxins, CKD, HPLC, fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da localização das células mesangiais	15
Figura 2 – Metabolismo do aminoácido triptofano a IS	17
Figura 3 – Metabolismo do aminoácido tirosina a PCS.....	18
Figura 4 – Estrutura química do 3-IAA	19
Figura 5 – Gradiente de concentração.....	25
Figura 6 – Cromatograma representativo da detecção de IS em extratos de células mesangiais	30
Figura 7 – Incorporação de IS em células mesangiais.....	31
Figura 8 – Cromatograma representativo dos padrões comerciais	32
Figura 9 – Curvas de calibração das toxinas urêmicas em matriz soro saudável	33
Figura 10 – Curvas de calibração das toxinas urêmicas em matriz plasma saudável	34
Figura 11 – Eficiência da separação cromatográfica em amostras soro	35
Figura 12 – Eficiência da separação cromatográfica em amostras plasma	35
Figura 13 – Identidade dos 3 analitos em amostra soro após <i>spikes</i>	36
Figura 14 – Identidade dos 3 analitos em amostra plasma após <i>spikes</i>	36
Figura 15 – Linearidade das curvas de calibração em matriz soro saudável	40
Figura 16 – Linearidade das curvas de calibração em matriz plasma saudável	41
Figura 17 – Estabilidade pré-processamento das amostras soro.....	43
Figura 16 – Estabilidade pré-processamento das amostras plasma	43
Figura 19 – Estabilidade pós-processamento das amostras soro	44
Figura 20 – Estabilidade pós-processamento das amostras plasma	45
Figura 21 – Comparação entre matrizes soro e plasma.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estágios da DRC	14
Tabela 2 – Concentrações das toxinas urêmicas.....	19
Tabela 3 – Concentrações das toxinas urêmicas em diferentes estágios da DRC ...	19
Tabela 4 – Comparações entre métodos HPLC publicados.....	23
Tabela 5 – Comparações dos métodos utilizados.....	24
Tabela 6 – Variação da precisão <i>intraday</i>	37
Tabela 7 – Variação da precisão <i>interday</i>	38
Tabela 8 – Recuperação das amostras.....	39
Tabela 9 – Variação da inclinação das curvas	42
Tabela 10 – Concentrações encontradas em voluntários saudáveis	46
Tabela 11 – Resultados amostras soro e plasma (colaboração 1).....	48
Tabela 11 – Resultados amostras plasma (colaboração 2)	48
Tabela 13 – Resultados amostras soro (colaboração 3)	48
Tabela 14 – Resultados amostras soro (colaboração 4)	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
DMEM	Meio de cultivo celular, do inglês <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DRC	Doença renal crônica
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUTox	Grupo Europeu de Trabalho em toxinas urêmicas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
IS	Indoxil sulfato
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCS	<i>p</i> -Cresilsulfato
PROB	Probenecid
OAT1	Transportador de ânions orgânicos, do inglês <i>organic anion transporter</i>
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SFB	Soro fetal bovino
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor</i>
3-IAA	Ácido indol-3 acético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Doença renal crônica	14
1.2 Células mesangiais	15
1.3 Toxinas urêmicas	16
1.4 Cromatografia líquida de alto desempenho	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Materiais	23
3.2 Instrumentação analítica	23
3.2.1 Condições cromatográficas para análise de IS intracelular.....	24
3.3 Amostras biológicas	25
3.3.1 Cultivo de células mesangiais	25
3.3.2 Coleta de sangue	25
3.4 Preparo das Amostras	26
3.4.1 Células mesangiais	26
3.4.2 Padrões e amostras de soro e plasma	27
3.5 Etapas da validação da metodologia	27
3.6 Análise estatística	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Incorporação de IS em células mesangiais	30
4.2 Padronização da separação e quantificação dos analitos	31
4.3 Validação da metodologia	32
4.3.1 Curvas de calibração	32
4.3.2 Seletividade	35
4.3.3 Precisão	36
4.3.5 Linearidade.....	39
4.3.6 Estabilidade	42
4.3.7 Limites de detecção e quantificação	46
4.4 Variação entre matrizes - soro X plasma	46
4.5. Colaborações com outros estudos	47

5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE 1 – Parecer consubstanciado do CEP.....	60
APÊNDICE 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela perda lenta, progressiva e irreversível da função renal, e em sua fase mais avançada os rins perdem a capacidade de filtração sanguínea, sendo necessário um tratamento de hemodiálise nos pacientes para retirada de metabólitos retidos na circulação, pois estes quando se acumulam se tornam tóxicos ao organismo (ROMÃO JUNIOR, 2004; BASTOS *et al.*, 2010; BASTOS & KIRSZTAJN, 2011). Em 2002 o KDOQI (*Kidney Disease Outcome Quality Initiative*) publicou uma diretriz sobre DRC envolvendo avaliação, classificação e estratificação de risco, baseada em estágios (tabela 1), associados a presença ou ausência de proteinúria (ROMÃO JUNIOR, 2004; BASTOS *et al.*, 2010; BASTOS & KIRSZTAJN, 2011).

TABELA 1 – ESTADIAMENTO DA DRC

Estágio	Descrição	TFG mL/min/1,73 m ²	Proteinúria
1	Lesão renal com TFG normal ou aumentada	≥90	Sim
2	Lesão renal com TFG levemente diminuída	60-89	Sim
3A	Lesão renal com TFG moderadamente diminuída	45-59	Sim ou Não
3B		30-44	
4	Lesão renal com TFG severamente diminuída	15-29	Sim ou Não
5	DRC estando ou não em hemodiálise	<15	Sim ou Não

FONTE: Adaptado de KDOQI, 2002.

TFG: taxa de filtração glomerular.

Doenças como diabetes *mellitos* e hipertensão arterial lesam o parênquima renal e alteram os tecidos devido ao impacto mecânico na parede dos vasos e aos distúrbios cardiovasculares (ZATZ *et al.*, 2012). A DRC promove a redução da filtração glomerular, com a presença ou não de proteinúria, além de acúmulo de toxinas urêmicas no plasma nos últimos estágios da doença, levando o paciente a uma síndrome urêmica (BARRETO *et al.*, 2014; DUMMER *et al.*, 2007). Nos glomérulos podem ocorrer uma proliferação excessiva de células mesangiais, associada ao acúmulo de colágeno, fibronectina e proteoglicanos (ZATZ *et al.*, 2012).

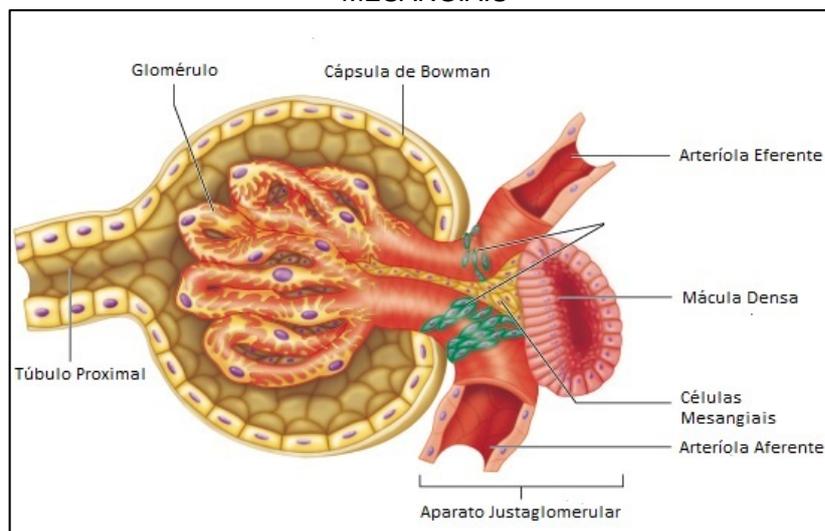
A uremia pode ser definida como a retenção ou o acúmulo de metabólitos que podem levar o paciente a morte em poucos dias (MEYER & HOSTETTER, 2007; ZATZ

et al., 2012). Compostos como a uréia e a creatinina são considerados marcadores laboratoriais que indicam a diminuição da TFG (VANHOLDER & SMET, 1999). É caracterizada pela falência da função excretora renal, bem como alterações metabólicas e endócrinas que resultam da insuficiência renal, levando pacientes urêmicos a manifestações do sistema gastrointestinal (gastroenterite urêmica), hematológicas (anemia), dermatológicas (dermatite), de fluidos e eletrólitos (edema e acidose metabólica), de nervos periféricos (neuropatia periférica) e do coração (pericardite fibrinosa urêmica) (ALPERS, 2010).

1.2 Células mesangiais

Células mesangiais são células mononucleares modificadas da musculatura lisa, de forma irregular, aspecto estrelado e estão situadas no centro do tufo glomerular, entre as alças capilares, onde ficam recobertas por matriz mesenquimal (PINTO, 1998; JENNETE, 2013). São conhecidas também por pericitos perivascularres, ou miofibroblastos. Suas principais funções são promover apoio mecânico ao glomérulo; promover endocitose e processamento de proteínas plasmáticas, inclusive imunocomplexos; gerar mediadores moleculares como prostaglandinas e citocinas; modular a filtração glomerular por meio de sua contratilidade ou liberação de hormônios vasoativos; e promover manutenção dos elementos da membrana basal e da matriz (ALBERTONI *et al.*, 2010; JENNETE, 2013).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS MESANGIAIS



FONTE: Disponível em: <<http://medsimples.com/sistema-renina-angiotensina-aldosterona/>>, acesso em 22/08/2015.

1.3 Toxinas urêmicas

Toxinas urêmicas são definidas como os metabólitos que o organismo retém quando ocorre lesão renal (KIKUCHI *et al.*, 2010, LIN *et al.*, 2015). Em condições normais são eliminadas pelos rins (De SMET *et al.*, 1998, VANHOLDER *et al.*, 2012), mas com o avanço da DRC podem interagir de maneira negativa com outras funções biológicas (BARRETO *et al.*, 2014). Diversos compostos são identificados em amostras de soro e plasma de pacientes com DRC e a sua classificação acontece conforme seu comportamento durante a diálise (CALAF *et al.*, 2011). De acordo com Barreto e colaboradores (2014) e Ito & Yoshida (2014), baseados no EUTox (Grupo de Trabalho Europeu em Toxinas Urêmicas (1999), no ano de 2012 havia 88 solutos urêmicos descritos, e estes podem ser divididos em 3 classes:

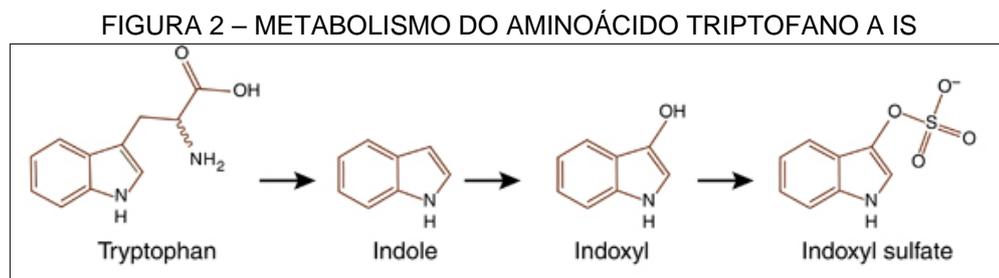
1. Compostos Pequenos: solúveis em água e com massa molecular máxima de 500 Da, removíveis por diálise. Nesta condição aparecem a uréia, creatinina e guanidinas (monometil arginina - MMA; dimetilarginina simétrica - SDMA e dimetilarginina assimétrica - ADMA).
2. Compostos Médios: possuem massa molecular acima de 500 Da, sendo removíveis por membranas de diálise com poros grandes, geralmente são peptídeos e afetam muitos órgãos e sistemas. São eles: microglobulina- β 2 e leptina.
3. Compostos ligados a Proteínas: possuem baixa massa molecular, exercem muitos efeitos tóxicos e sua remoção é difícil por diálise. Se encaixam nesta classificação os fenóis e os indóis.

Os compostos ligados a proteínas são conhecidos como moléculas citotóxicas por promoverem efeitos deletérios em diversos tecidos, incluindo o sistema cardiovascular (BARRETO *et al.*, 2014; NIWA, 2013; HSU *et al.*, 2014). As toxinas urêmicas mais abundantes e estudadas são indoxil sulfato, fenil sulfato, ácido indol-3 acético, ácido hipúrico, *p*-cresol, *p*-cresilsulfato, homocisteína (KIKUCHI *et al.*, 2010; VANHOLDER & SMET, 1999; BARRETO *et al.*, 2014).

Para que um composto seja considerado toxina urêmica, este deve ser quimicamente identificado e ser mensurado de forma precisa; os níveis plasmáticos totais devem ser mais elevados do que nos indivíduos não-urêmicos; possuir elevadas concentrações relacionadas com disfunções e sintomas específicos; e, ter sua

atividade biológica comprovada em estudos *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo* (VANHOLDER *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2014).

O indoxil sulfato (IS) é uma toxina urêmica do grupo indol, de baixa massa molecular (212,21 Da), derivada do aminoácido triptofano proveniente de dieta proteica do metabolismo bacteriano, no qual *E.coli* converte o aminoácido em IS em no fígado (figura 2) (NIWA, 2010; WANG *et al.*, 2014; ITO & YOSHIDA, 2014; LIN *et al.*, 2015; VANHOLDER & SMET, 1999), sendo normalmente excretado na urina. No sangue, se liga à albumina sérica e sua excreção ocorre inicialmente por secreção tubular e depois por filtração glomerular (BARRETO *et al.*, 2014; ROSSI *et al.*, 2014). Porém, em pacientes renais crônicos quando a função renal é diminuída, ele se acumula no plasma (KIKUCHI *et al.*, 2010; NIWA, 2010; ROSSI *et al.*, 2014, LIN *et al.*, 2015), e induz a citotoxicidade de células mesangiais, musculares lisas, endoteliais e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (GELASCO & RAYMOND, 2006; NIWA, 2010; MIYAMOTO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2014). A sua toxicidade é mediada por processos oxidativos, inflamatórios e pró-fibróticos, além de desempenhar importante papel na lesão endotelial desencadeando a produção de moléculas pró-inflamatórias, inibição da regeneração e reparo endotelial, e produção endotelial de radicais livres (BOELAERT *et al.*, 2013; BARRETO *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014).

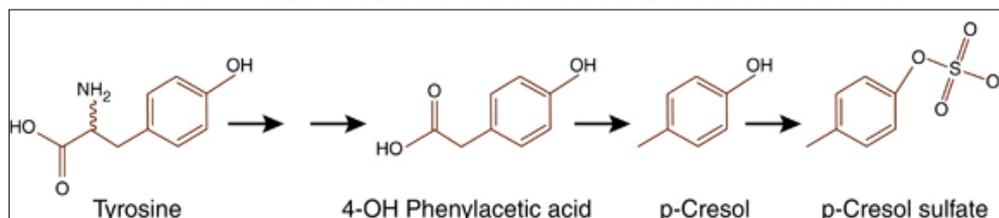


Nota: A figura mostra os intermediários do metabolismo dos aminoácidos triptofano. FONTE: Disponível em <www.nature.com/ki/journal/v81/n10/fig_tab/ki2011504f1.html>, acesso em 14/09/2015.

O *p*-cresilsulfato (PCS) é uma toxina urêmica do grupo fenol, de baixa massa molecular que se liga a proteínas séricas. É formada a partir do processo de sulfatação do *p*-cresol durante sua passagem pelo fígado e cólon, que se origina do metabolismo da tirosina (figura 3) e fenilalanina por fermentação da microbiota no intestino grosso (BARRETO *et al.*, 2014; KIKUCHI *et al.*, 2010, LIN *et al.*, 2015). A presença de níveis elevados pode ser associada à mortalidade e presença de doenças cardiovasculares em pacientes DRC (BARRETO *et al.*, 2014; VANHOLDER *et al.*, 2014; WATANABE

et al., 2013; ROSSI *et al.*, 2014, LIN *et al.*, 2015). Liabeuf e colaboradores (2010) observaram que os níveis de PCS total e a fração livre estão mais elevados em pacientes renais crônicos de estágios avançados, porém apenas a fração livre foi associada a mortalidade desses pacientes. Alguns estudos revelaram que o acúmulo de PCS também está relacionado com a progressão da DRC, podendo ser um bom indicador no prognóstico da doença (WATANABE *et al.*, 2013). Esta toxina induz a liberação de micropartículas endoteliais, mesmo sem a presença da lesão, sugerindo seu envolvimento com disfunção endotelial (BARRETO *et al.*, 2014). Possui efeito pró-inflamatório, aumentando a formação de radicais livres produzidos por leucócitos e contribuindo para a lesão vascular em pacientes DRC (BARRETO *et al.*, 2014; KIKUCHI *et al.*, 2010; MEERT *et al.*, 2011; WATANABE *et al.*, 2013).

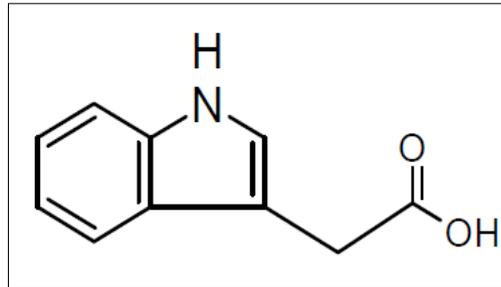
FIGURA 3 – METABOLISMO DO AMINOÁCIDO TIROSINA A PCS



Nota: A figura mostra os intermediários do metabolismo do aminoácido tirosina. FONTE: Disponível em: <www.nature.com/ki/journal/v81/n10/fig_tab/ki2011504f1.html>, acesso em 14/09/2014.

O ácido indol-3 acético (3-IAA) é uma toxina urêmica também do grupo indol, derivada do metabolismo do aminoácido triptofano (figura 4). Está presente em plasma humano e seu nível aumenta em pacientes renais crônicos. Bertuzzi e colaboradores (1997) verificaram a presença da toxina em concentrações elevadas em soro e plasma de pacientes doentes renais crônicos, produzindo, possivelmente, efeitos tóxicos ao organismo. Um recente estudo mostrou que a concentração média urêmica é de 5 μM e a máxima urêmica de 50 μM (DOU *et al.*, 2014), e juntamente com o IS, o 3-IAA induz estresse oxidativo em células tubulares e endoteliais (CALAF *et al.*, 2011). Dou e colaboradores (2014) demonstraram que 3-IAA indica resultados clínicos em pacientes renais crônicos, promovendo efeitos pró-inflamatórios e pró-oxidantes, inflamação vascular, estresse oxidativo e aterosclerose, agindo como um marcador significativo para doenças cardiovasculares nesses pacientes, podendo estar associado a mortalidade. *In vitro*, o 3-IAA induz a produção de radicais livres nas células tubulares e ativa NF-Kappa B (BOELAERT *et al.*, 2013).

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-IAA



Nota: O 3-IAA também derivado do metabolismo do aminoácido triptofano. FONTE: Figura obtida através do software ACD/Chemsketch, disponível em <<http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch>>, acesso em 30/10/2015.

Alguns estudos descreveram as concentrações das toxinas urêmicas encontradas em indivíduos saudáveis e pacientes em diferentes estágios da DRC, incluindo pacientes em hemodiálise, como Vanholder e colaboradores (2012) e Boelaert e colaboradores (2013) (tabelas 2 e 3).

TABELA 2 – CONCENTRAÇÕES DAS TOXINAS URÊMICAS

Toxinas Urêmicas	[μ M] Normal	[μ M] Média	[μ M] Urêmica
IS	2,00	90,00	180,00
PCS	10,00	150,00	210,00
3-IAA	2,50	10,00	12,00

Nota: Concentrações normais, médias e urêmicas encontradas em indivíduos saudáveis e pacientes DRC. FONTE: Adaptada do estudo realizado por Vanholder e colaboradores, 2012.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES DAS TOXINAS URÊMICAS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA DRC

Toxinas Urêmicas	[μ M] Normal	[μ M] Estágios DRC					
		1	2	3	4	5 (ND)	5 (HD)
IS	2,35	2,35	3,30	8,01	12,73	21,69	90,56
PCS	35,00	50,53	54,78	106,38	116,48	140,95	297,34
3-IAA	2,50	2,50	3,04	5,07	5,07	5,07	11,16

Nota: Concentrações normais encontradas em indivíduos saudáveis e concentrações encontradas nos diferentes estágios da DRC incluindo pacientes pré-diálise (ND) e em hemodiálise (HD). FONTE: Adaptada do estudo realizado por Boelaert e colaboradores, 2013.

Estudos realizados *in vivo* sugerem uma interferência de outros compostos em amostras de pacientes renais crônicos, pois algumas toxinas podem induzir a produção de TNF, mostrando assim um sinergismo entre eles (MEERT *et al.*, 2011). Foi demonstrado que o IS acelera a progressão para DRC estimulando a esclerose glomerular e a fibrose intersticial (NIWA, 2013).

Estudos realizados *in vitro* apontaram danos cardiovasculares e progressão da doença renal, geração de ERO causada pelo aumento de IS (DOU *et al.*, 2007), disfunção endotelial, interação endotélio-leucócito, resistência à insulina

(VANHOLDER *et al.*, 2014), produção de citocinas pró-inflamatórias e o tratamento com antioxidantes pode inibir efeitos oxidantes do PCS e IS (ROSSI *et al.*, 2014), foi observado ainda que o 3-IAA induz inflamação endotelial e estresse oxidativo e inflamatório (DOU *et al.*, 2015).

1.4 Cromatografia líquida de alto desempenho

Cromatografia é um termo genérico, aplicado a um processo de separação físico-química, baseado nos fenômenos de adsorção e partição. Este termo foi escolhido porque as primeiras separações foram realizadas com substâncias coloridas, porém, o processo cromatográfico é muito utilizado em separações de aminoácidos, proteínas, fármacos, compostos orgânicos e inorgânicos (COLLINS *et al.* 2006; SCHULER, 2010).

As características da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) segundo Mendham (2011) são: alto poder de resolução; separações rápidas; monitoramento contínuo do eluente; medidas quantitativas acuradas; análises repetíveis e reprodutíveis com a mesma coluna e automação do procedimento analítico e do manuseio dos dados. A técnica possui boa detectabilidade, porém apresenta alto custo da instrumentação e operação (custos das fases móveis de alto grau de pureza constituem despesas contínuas), e necessidade de experiência no seu manuseio são causas de limitações (COLLINS *et al.*, 2010).

O sistema HPLC utiliza colunas metálicas e pressões de fase móvel elevadas, obtidas com o auxílio de uma bomba de alta pressão que pode empurrar a fase móvel com vazão alta. As fases móveis são importantes no processo de separação e necessitam de alto grau de pureza (MENDHAM, 2011), por isso são utilizados solventes de grau cromatográfico que permitem realizar análises dos compostos presentes nas amostras, bem como água purificada em deionizadores para eliminar as possíveis impurezas presentes.

A fase estacionária encontra-se dentro da coluna metálica e os componentes das amostras são separados pela diferença de solubilidade entre esta fase e a fase móvel (SCHULER, 2010), o analito mais solúvel na fase estacionária ficará mais tempo retido e demorará mais para ser eluído, e se for mais solúvel na fase móvel apresentará menor tempo de retenção.

Entre as fases estacionárias mais frequentemente utilizadas em amostras biológicas encontram-se as de fase reversa, como a C8 e a C18. A cromatografia de fase reversa é baseada em uma fase estacionária apolar enquanto que a fase móvel é polar, que consiste em utilizar água ou soluções tampões aquosas com solventes miscíveis em água, como por exemplo metanol e/ou acetonitrila, com alto grau de pureza (MEYER, 1993).

Em se tratando de análise de toxinas que se ligam a proteínas, um ponto importante no estabelecimento metodológico é o preparo das amostras para analisar a toxina livre e a toxina conjugada a proteínas. Neste sentido, vários autores avaliaram métodos diferentes para determinar toxinas conjugadas (ligadas a proteínas). Um estudo realizado por Vanholder e colaboradores (1992) compararam alguns métodos para desproteinização das toxinas urêmicas para identificá-las por HPLC, entre eles estão desnaturação por calor, extração com acetonitrila, extração com ácido tricloroacético, deslocamento de bilirrubina e extração com ácido acético. O resultado mostrou que há um maior rendimento na desnaturação seguida pela extração com acetonitrila, porém foi levantada a dúvida sobre a geração de novos compostos a partir da desnaturação.

De Smet e colaboradores (1998) padronizaram um método para quantificar *p*-cresol livre e conjugado a proteínas através de um procedimento de extração com éter isopropílico que promove um rendimento alto de *p*-cresol, e análise por HPLC com detector de fluorescência; e Kikuchi e colaboradores (2010) utilizaram HPLC para quantificar indoxil sulfato, ácido hipúrico e *p*-cresilsulfato com apoio de espectrômetro de massa.

Tendo em vista o grande interesse por grupos brasileiros de estudos da toxicidade urêmica em monitorar e analisar os efeitos patológicos de cada toxina, e o fato de que aqui no Brasil ainda não existe este tipo de análise, nós desenvolvemos um método cromatográfico que possibilita a análise simultânea de 3 toxinas urêmicas (IS, PCS e 3-IAA) em amostras de soro e plasma, e também um método eficiente para determinar a incorporação de IS em células mesangiais, ambos utilizando detecção por fluorescência, o que torna as análises economicamente acessíveis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer um método para identificar e quantificar indoxil sulfato, *p*-cresilsulfato e ácido indol 3-acético em amostras biológicas como soro e plasma, e para quantificar indoxil sulfato em extrato celular, usando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detecção por fluorescência, seguindo métodos discutidos por protocolos já publicados.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um método baseado em HPLC e detecção por fluorescência para determinação das toxinas urêmicas: indoxil sulfato, *p*-cresilsulfato e ácido indol-3 acético.
- Estabelecer um método baseado em HPLC e detecção por fluorescência para análise da incorporação de indoxil sulfato em células em cultura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Indoxil sulfato (Sigma Aldrich), *p*-cresilsulfato (sintetizado pela Universidade de Gent, Bélgica e gentilmente doado pela Dra. Griet Glorieux, da mesma universidade), ácido indol-3 acético (Sigma Aldrich), metanol (Sigma Aldrich), acetonitrila (Sigma Aldrich), NaOH (Merck), HCl (Química Moderna), solução de PBS, BSA (Sigma Aldrich), NaH₂PO₄ (Sigma Aldrich), TBAI (Sigma Aldrich), formiato de amônio (Sigma Aldrich), probenecid (gentilmente doado pela Prof^a Dra Andrea E. Stinghen), meio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), SFB (Cultilab), tripsina, água ultra pura (Milli-Q).

3.2 Instrumentação analítica

O instrumento utilizado foi um sistema cromatográfico (Shimadzu Prominence, Tokyo, Japão), equipado com um injetor manual modelo 7125 Rheodyne, uma bomba de dois pistões (LC-20AD) controlada pelo software LC Solution equipada com detector de fluorescência Shimadzu RF-20A.

Para identificação das toxinas urêmicas seguimos os métodos de protocolos já publicados, como descrito por Meert e colaboradores (2011) que utilizaram um protocolo para análise de toxinas livres ou ligadas a proteínas; o método descrito por Calaf e colaboradores (2011), que padronizaram uma metodologia baseada em detecção por fluorescência para análise simultânea de diversas toxinas urêmicas; e o protocolo descrito por Kikuchi e colaboradores (2010) que padronizou um método que utiliza gradiente de eluição para a separação por HPLC (tabela 4).

TABELA 4 – COMPARAÇÕES ENTRE MÉTODOS HPLC PUBLICADOS

Itens Comparados	Kikuchi <i>et al.</i> (2010)	Calaf <i>et al.</i> (2011)	Meert <i>et al.</i> (2011)
Detecção	Espectrometria de massa	Fluorescência	Fluorescência
Coluna	Não informado	Fase reversa	Fase reversa
Fase Móvel	Acetato de amônio / Acetonitrila	NaH ₂ PO ₄ / Acetonitrila	Metanol / Formiato de amônio
Eluição	Gradiente	Isocrática	Gradiente
Fluxo	0,2 mL/min	1,5 mL/min	1 mL/min

Nota: Comparação de métodos cromatográficos já publicados que embasaram o desenvolvimento da nossa metodologia. FONTE: O autor.

3.2.1 Condições cromatográficas para análise de IS intracelular

O IS foi separado com uma coluna C-18 (Phenomenex, Gemini 5 μm , 110Å, 250x4,6 mm), em temperatura ambiente, 23°C, utilizando fluxo isocrático, eluído com 78% de tampão 20 mM de fosfato de sódio (NaH_2PO_4 – Sigma Aldrich), pH=7,5, contendo 5 mM de iodeto de tetrabutilamônio (TBAI – Sigma Aldrich) e 22% de acetonitrila (Sigma Aldrich), com 0,6mL/min de fluxo, sendo detectado por fluorescência, com comprimento de onda $\lambda_{\text{exc}} = 278 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emi}} = 348 \text{ nm}$ (adaptado de CALAF *et al.*, 2011), tendo como tempo total de corrida 60 minutos.

3.2.2 Condições cromatográficas para análise simultânea de IS, PCS e 3-IAA

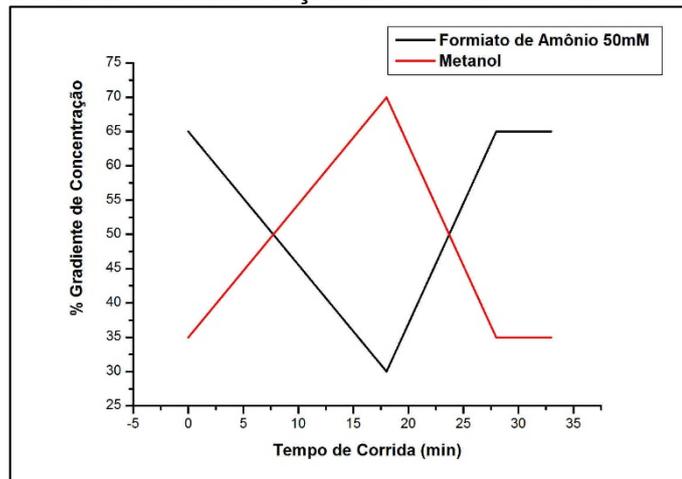
As toxinas foram separadas por uma coluna C8 (Phenomenex, Luna 5 μm , 100Å, 150x4,6mm), utilizando gradiente de concentração, eluída com 50mM de formiato de amônio (Sigma Aldrich), pH=3,0 e metanol (Sigma Aldrich) variando entre 35% a 65%, com 0,7 mL/min de vazão (figura 5). As toxinas foram detectadas por fluorescência, e durante a corrida os comprimentos de onda foram alternados da seguinte maneira: IS com comprimento de onda $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emi}} = 383 \text{ nm}$ (adaptado de CALAF *et al.*, 2011) até 6,5 minutos; PCS com comprimento de onda $\lambda_{\text{exc}} = 265 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emi}} = 290 \text{ nm}$ (MEERT *et al.*, 2011) de 6,51 a 10,0 minutos; e 3-IAA com comprimento de onda $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emi}} = 383 \text{ nm}$ (adaptado de CALAF *et al.*, 2011) a partir de 10,01 minutos até o final da corrida, em 33 minutos. A tabela 5 apresenta os principais itens que diferem os 2 métodos utilizados neste trabalho.

TABELA 5 – COMPARAÇÕES DOS MÉTODOS UTILIZADOS

Itens Comparados	Células	Soro e Plasma
Deteção	Fluorescência	Fluorescência
Coluna	C18	C8
Fase Móvel	Acetonitrila / NaH_2PO_4	Metanol / Formiato de amônio
Eluição	Isocrática	Gradiente
Fluxo	0,6 mL/min	0,7 mL/min
pH	7,5	3,0
Tempo	60 minutos	33 minutos

Nota: Tabela comparativa entre os métodos utilizados em nosso trabalho. FONTE: O autor.

FIGURA 5 – GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DAS FASES MÓVEIS UTILIZADO NO MÉTODO



Nota: O método inicia-se com 35% de metanol indo até 70% em 18 minutos, retornando a condição inicial até 25 minutos e estabilizando a coluna durante 8 minutos, totalizando 33 minutos de corrida. FONTE: O autor.

3.3 Amostras biológicas

3.3.1 Cultivo de células mesangiais

As células mesangiais utilizadas foram obtidas por doação (da Dra. Mirian A. Boim, UNIFESP), não estando disponíveis para compra na ATCC. Essas células foram extraídas de feto de 16 semanas após aborto espontâneo, imortalizadas por transfecção de plasmídeos pUCInwt e pRc/CMV por vírus SV40 (BANAS, *et al*, 1999). As células foram cultivadas em incubadoras de CO₂, a 37°C, (Panasonic) utilizando meio de cultivo DMEM baixa glicose (Cultilab), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% da solução de penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (Gibco). O repique foi feito a cada 2 dias, em uma taxa de 1:3, utilizando solução de tripsina para promover desadesão celular.

3.3.2 Coleta de sangue

Oito mL de sangue foram coletados com seringas de indivíduos doadores saudáveis às 11h. Quatro mL foram transferidos para tubos com heparina (BD Vacutainer K2 EDTA 367861), centrifugados a 1200 x g (Centrífuga Eppendorf), 4°C, durante 15 minutos, e o plasma foi transferido para novo tubo e armazenado em temperatura -80°C. Quatro mL foram transferidos para tubos (BD Vacutainer SST 367988) e centrifugados a 1200 x g (Centrífuga Eppendorf), em temperatura ambiente, durante 5 minutos e o soro foi transferido para novo tubo e armazenado em temperatura -80°C.

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, sob o parecer CEP/SD-PB nº 1.230.685/2015 (ANEXO 1). Os doadores de sangue para este projeto assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2).

3.4 Preparo das Amostras

3.4.1 Células mesangiais

As células mesangiais foram plaqueadas em placas P35, com densidade de 8×10^5 células por placa em meio completo (DMEM baixa glicose + 10% SFB + 1% antibiótico). No dia seguinte, elas foram tratadas com 939 μM IS (máxima urêmica, segundo EuTOX) em PBS ou no meio completo por 60 minutos na incubadora de CO_2 (Panasonic), na ausência ou presença de um pré-tratamento com 2,5 ou 10 mM probenecid (PROB), um inibidor de OAT (transportador de IS), por 15 minutos.

Após o tratamento, as células foram lavadas 3 vezes com 1 mL de PBS gelado, e 1 vez com 1 mL da solução PBS+1%BSA para remoção de toxinas livres. As células foram transferidas da placa para tubos de 1,5 mL (Eppendorf) e centrifugadas a 1000 x g (Centrífuga Sorvall Fresco), 4°C, durante 3 minutos, e o sobrenadante descartado. A lise celular foi realizada com a adição de 420 μL de 0,2 M NaOH aos *pellets*. Os tubos permaneceram durante 30 minutos no gelo, recebendo após este período 28 μL de 3 M HCl para ajustar o pH para a faixa de 4. O pH foi verificado com fitas medidoras (Merck). Os extratos foram aquecidos durante 30 minutos a 95°C, resfriados em gelo por 10 minutos e centrifugados a 14000 x g (Centrífuga Sorvall Fresco), 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi separado e injetado no HPLC (Miyamoto et al., 2011; Watanabe et al., 2013).

As proteínas das células foram dosadas pelo método de Bradford (1976), fazendo o uso do corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Diluímos o reagente de Bradford Bio-Rad Protein Assay em proporção de 1 parte do reagente para 4 partes de água ultra pura (Miili-Q). Em placa de 96 poços adicionou-se 120 μL do reagente diluído. Para a curva padrão em triplicata utilizou-se uma solução de BSA a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Em cada poço foi adicionado 10 μL de cada tratamento em triplicata, homogeneizando com a própria ponteira de micropipeta. A leitura da absorbância foi feita a 595 nm. Para o cálculo da concentração das amostra utilizou-se a equação da reta, obtida por software Microsoft Excel 2013 a partir da curva padrão feita com BSA.

3.4.2 Padrões e amostras de soro e plasma

IS, PCS e 3-IAA foram preparados a partir de padrões autênticos diluídos separadamente em água ultra pura (Milli-Q) e injetados no HPLC para identificação. Depois foram misturados e novamente identificados para testar a metodologia. Utilizamos diferentes concentrações, entre normal e urêmica, conforme descrito por Duranton e colaboradores (2012) para se obter o volume final de 360 µL.

Após aprovação do projeto, passamos a utilizar amostras de soro e plasma de doadores saudáveis para testar a metodologia. Os padrões foram pipetados com micropipetas (Gilson) de acordo com as concentrações definidas, em 100 µL de soro ou plasma e o volume final foi completado até 360 µL com água ultra pura (Milli-Q). Após a diluição, as amostras foram aquecidas durante 30 minutos a 95°C para desnaturação de proteínas e resfriadas em gelo durante 10 minutos. Foram centrifugados a 14000 x g (Centrífuga Sorvall), 4°C, durante 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos com filtro 30 kDa (Amicon Ultra® 0,5 mL). Os tubos foram novamente centrifugados a 8400 x g (Centrífuga Sorvall), 4°C, durante 30 minutos e o filtrado transferido para um novo tubo. Dez µL foram injetados no HPLC para análise.

3.5 Etapas da validação da metodologia

Após a padronização do nosso método em água e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética, iniciamos as etapas de validação em amostra de soro e plasma com base na Resolução nº 27/2012 da ANVISA, que traz os requisitos para validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com a finalidade de registro de medicamentos. De acordo com esta resolução, a validação deve conter ensaios de curva de calibração, seletividade, precisão, recuperação, linearidade, estabilidade, entre outros conforme o ensaio.

Curvas de calibração foram preparadas em concentrações entre normais e urêmicas (VANHOLDER *et al.*, 2014; BOELAERT *et al.*, 2013; DURANTON *et al.*, 2012) para validar nosso método, sendo todo o processamento nas mesmas condições que os padrões; após a validação em água fizemos o mesmo protocolo com amostras biológicas.

A seletividade do método foi obtida com o preparo de uma mistura de padrões autênticos (mix) em matriz soro saudável ou em matriz plasma saudável, utilizando

uma concentração conhecida de padrão (IS 5 μ M + PCS 15 μ M + IAA 0,2 μ M), comparando com amostras soro ou plasma saudáveis de 3 fontes distintas: amostra soro e plasma pool F (2 fontes femininas), amostra soro e plasma pool M (2 fontes masculinas) e amostra soro e plasma F (1 fonte feminina). E para confirmação da identidade do analito, *spikes* individuais foram feitos em uma amostra de soro F e em uma amostra de plasma F.

Para etapa de precisão *intraday*, fizemos 5 injeções de cada amostra (soro e plasma basais, urêmicos e com *spikes*) em um mesmo dia, totalizando 20 injeções, e para a precisão *interday* fizemos 3 preparos independentes das amostras, em 3 dias diferentes utilizando a mesma matriz para soro e plasma (basais, urêmicos e com *spikes*).

A recuperação avalia a interferência do processamento das amostras na quantificação do analito (CHASIN *et al.*, 1998). Para isso, adicionamos uma massa conhecida de analito e calculamos o quanto nosso método recuperou. O ensaio foi realizado 3 vezes independentemente a partir de 3 fontes de soro e 3 fontes de plasma (basal e 2 *spikes*). As amostras foram processadas independentemente e injetadas em 3 dias diferentes. Para se obter o valor da recuperação utiliza-se a fórmula =

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{pmol final} - \text{pmol inicial}) \times 100}{\text{valor em pmol adicionado}}$$

onde pmol final é a quantidade obtida; pmol inicial é a quantidade encontrada na amostra basal sem adição de analitos; e valor em pmol adicionado é a quantidade de analito adicionada a amostra basal.

Para o ensaio de linearidade, preparamos 3 curvas de calibração contendo 7 concentrações de cada analito, na faixa de concentrações biológicas. Foram construídas 3 curvas independentemente, sendo cada uma construída a partir de uma fonte distinta para soro e uma para plasma.

A estabilidade das amostras foram testadas para pré-processamento com 2 preparos independentes das mesmas amostras em intervalo de 3 meses para soro e 6 meses para plasma; e pós-processamento, com 3 injeções em datas distintas da mesma amostra processada de soro ou plasma.

O limite de detecção é a menor concentração ou quantidade do analito que pode ser identificado com um nível de confiança ou que pode ser diferenciado do ruído (CHASIN *et al.*, 1998). Para esta etapa fizemos diluições do menor ponto da curva de

calibração e injetamos até o limite de obtenção de 3 vezes a altura dos picos dos analitos em comparação com o sinal ruído.

Limite de quantificação (QL) é a menor concentração ou quantidade do analito que pode ser determinada com confiança (CHASIN *et al.*, 1998). Construímos 3 curvas de calibração para soro e para plasma e calculamos o QL a partir desta equação:

$$QL = \frac{10 \cdot \sigma}{S}$$

onde QL é o limite de quantificação, σ é o desvio padrão da resposta (determinada pela integração do menor calibrador da curva) e S é a média das inclinações das regressões lineares.

Para verificar possíveis variações entre matrizes (soro e plasma), avaliamos o método quanto ao desempenho em determinar os analitos independentemente do tipo de amostra. Os níveis basais em 4 fontes distintas no soro e no plasma foram isolados de uma mesma amostra de sangue, determinados e comparados.

3.6 Análise estatística

Para os resultados com células mesangiais foram realizados 6 experimentos independentes e a análise estatística foi feita pelo software SigmaStat, com teste de ANOVA e *post-hoc* TUKEY, com $p < 0,05$.

Para verificar as variações entre matrizes da mesma fonte, a análise estatística foi feita pelo software Excel com teste T-pareado.

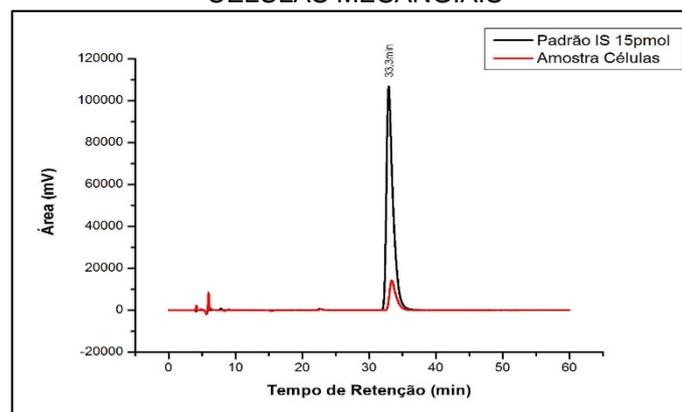
4 RESULTADOS

4.1 Incorporação de IS em células mesangiais

Para podermos analisar os efeitos intracelulares de toxinas urêmicas, inicialmente estabelecemos um método para quantificar os níveis de indoxil sulfato no meio intracelular. Para isso, usamos células mesangiais humanas em cultura incubadas com uma alta concentração de indoxil sulfato, correspondente a uma concentração máxima urêmica, determinada pelo EUTox. Após o cultivo e tratamento das células mesangiais, seus extratos foram injetados no cromatógrafo e foi possível verificar a presença de IS intracelular.

O cromatograma (figura 6) mostra que nosso método foi eficaz para identificar e quantificar o IS nas células mesangiais, pois o tempo de retenção do analito e da amostra preparada com as células são os mesmos.

FIGURA 6 – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA DETECÇÃO DE IS EM EXTRATO DE CÉLULAS MESANGIAIS

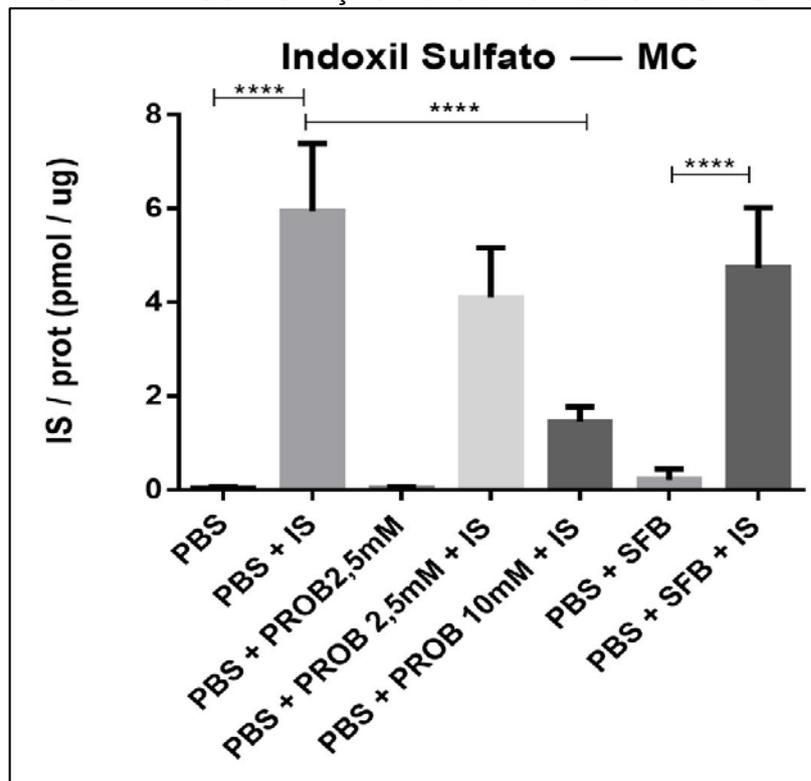


Nota: As células incubadas com 939 μM de IS e 15 picomols de IS foram injetadas no cromatógrafo. IS foi detectada por um detector de fluorescência com comprimento de onda em $\lambda_{\text{exc}} = 278 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 348 \text{ nm}$. O cromatograma mostra um pico único de IS identificado no sobrenadante das amostras de células mesangiais, comparando com o padrão autêntico. FONTE: O autor.

A quantificação mostrou que células tratadas com IS incorporaram significativamente esta toxina do meio extracelular. Não houve diferença significativa na incorporação quando as células foram incubadas em PBS ou em meio contendo 10% de soro fetal bovino, indicando que a presença de proteínas no meio ou sua ligação a proteínas não interfere na incorporação (figura 7). A pré-incubação com 2.5 mM probenecid inibiu a incorporação do IS nas células, embora apenas na concentração de 10 mM a inibição foi significativa estatisticamente quando comparada a incorporação na ausência de probenecid. Este resultado indica que a incorporação depende dos transportadores de ânions orgânicos, mas a alta

concentração necessária para a inibição possivelmente indica que este OAT não seja o transportador primordial neste tipo celular. As células também foram incubadas com SFB para verificar se ele promovia inibição da incorporação do IS, e o resultado nos mostrou que ocorreu tal inibição quando comparado com o controle apenas (PBS + IS). Estes resultados mostram que o método estabelecido para analisar os níveis de IS em células tratadas ou não tratadas com IS foi bem sucedido, uma vez que conseguimos modular a incorporação.

FIGURA 7 – INCORPORAÇÃO DE IS EM CÉLULAS MESANGIAIS

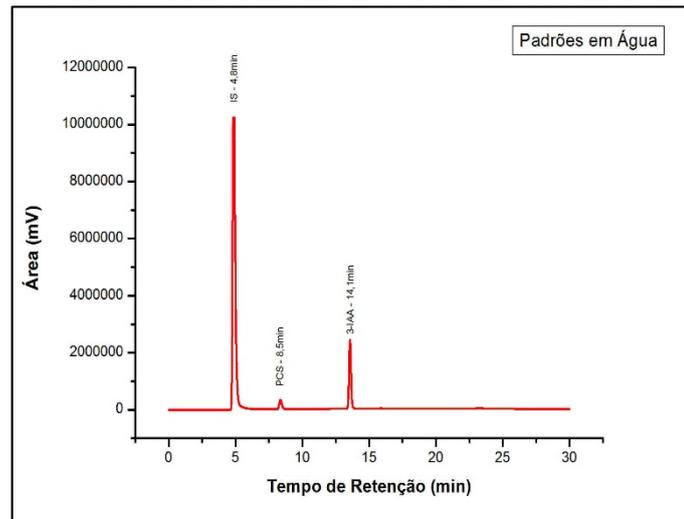


Nota: Os dados mostraram que IS é transportado para dentro das células, na presença ou na ausência de soro fetal, e que 10 mM de probenecid inibiu significativamente a captação. Os dados apresentados foram normalizados pelo teor de proteína nos sobrenadantes e correspondem à média \pm DP de 6 experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas são indicadas (**** $p < 0,05$). FONTE: O autor.

4.2 Padronização da separação e quantificação dos analitos

Adaptando os métodos de Kikuchi e colaboradores (2010), Calaf e colaboradores (2011) e Meert e colaboradores (2011), foi possível padronizar a quantificação simultânea primeiramente em água das 3 toxinas do nosso estudo, utilizando os padrões comerciais: IS, PCS e 3-IAA (figura 8).

FIGURA 8 – CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DOS PADRÕES AUTÊNTICOS



Nota: Os padrões foram submetidos ao mesmo processamento que as amostras biológicas e analisados por HPLC. O cromatograma mostra a detecção das 3 toxinas, onde 400 pmol IS (tempo de retenção de 4,8 minutos), 1060pmol PCS (tempo de retenção de 8,5 minutos) e 200pmol 3-IAA (tempo de retenção de 14 minutos). FONTE: O autor.

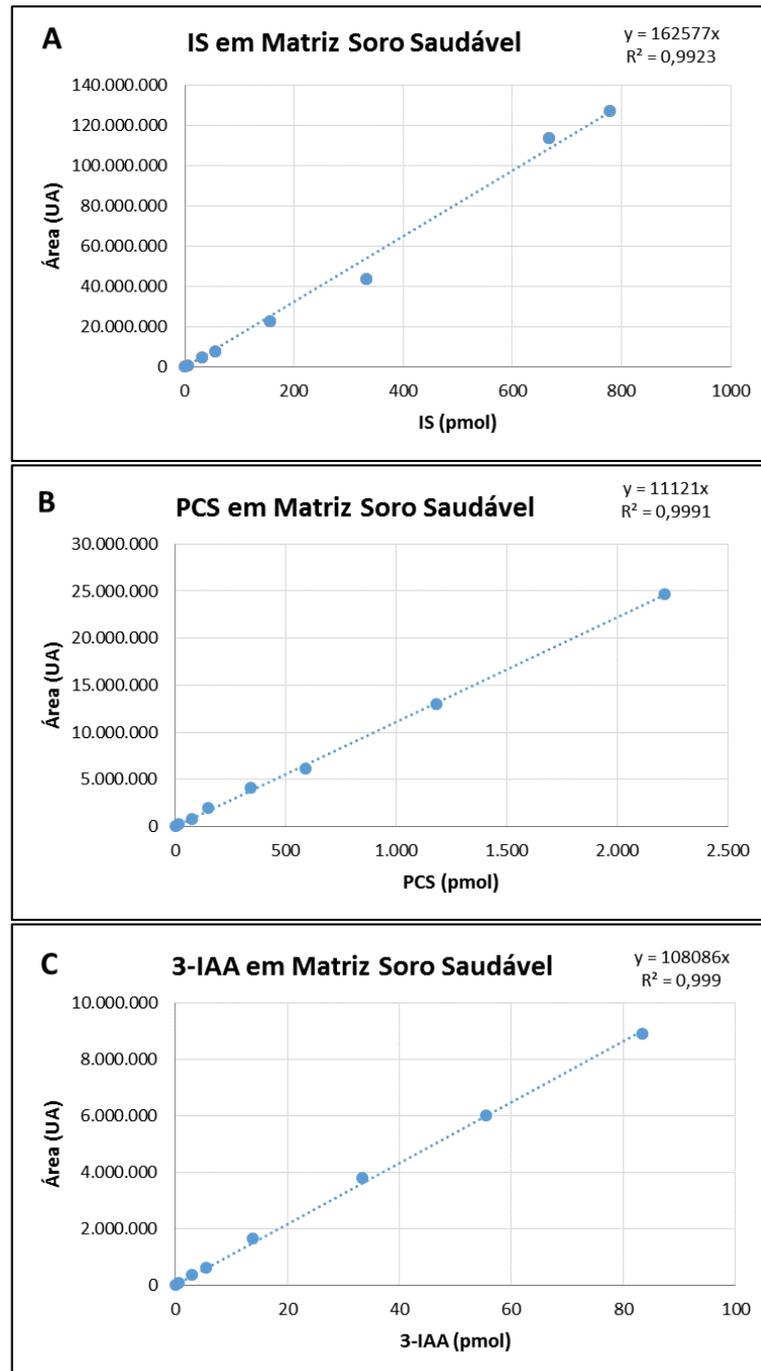
4.3 Validação da metodologia

A validação do método foi feita de acordo com a Resolução RDC nº 27/2012 (ANVISA) e outros protocolos estudados durante o nosso trabalho.

4.3.1 Curvas de calibração

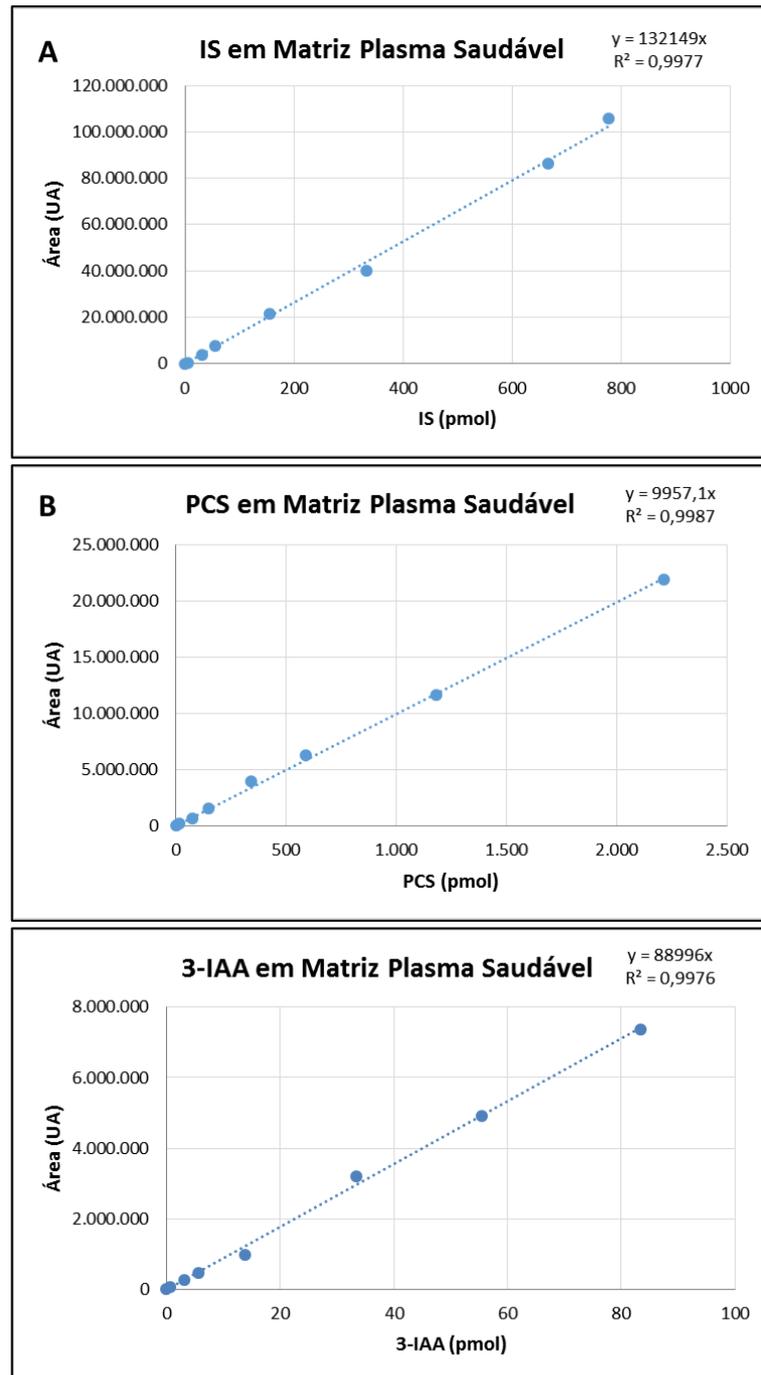
Iniciamos a validação do método com a curva de calibração que determina os limites de detecção e faixa de linearidade. Esta etapa traz a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (RDC 27/2012). As curvas de calibração foram feitas em matrizes biológicas distintas (soro e plasma) de indivíduos não acometidos de DRC, utilizando calibradores correspondentes a concentrações normais e urêmicas das toxinas estudadas: IS (2, 10, 20, 50, 100, 250 e 280 μM), PCS (6, 25, 50, 100, 200, 400 e 700 μM) e 3-IAA (0,2, 1, 2, 5, 10, 20 e 30 μM). Todas as curvas de calibração utilizadas para os 3 analitos, tanto soro como plasma, apresentaram um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99 (figuras 9 e 10).

FIGURA 9 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DAS TOXINAS URÊMICAS EM MATRIZ SORO SAUDÁVEL



Nota: Curvas feitas em matriz soro saudável, contendo 7 pontos dos analitos (cada ponto representa uma injeção), na faixa de concentração biológica, sendo curva A: IS; curva B: PCS; e curva C: 3-IAA.
 FONTE: O autor.

FIGURA 10 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DAS TOXINAS URÊMICAS EM MATRIZ PLASMA SAUDÁVEL



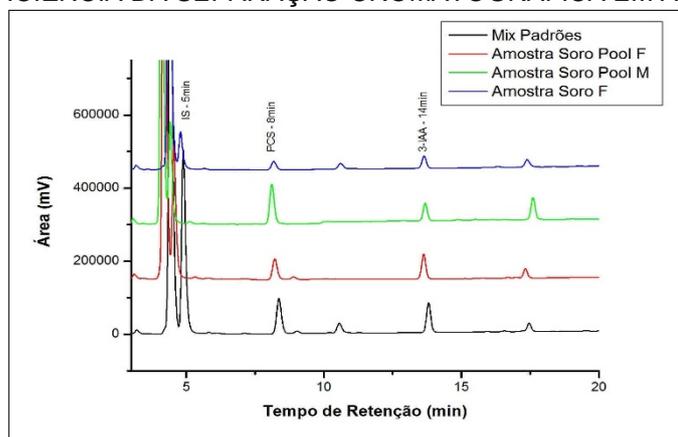
Nota: Curvas feitas em matriz plasma saudável, contendo 7 pontos dos analitos (cada ponto representa uma injeção), na faixa de concentração biológica, sendo curva A: IS; curva B: PCS; e curva C: 3-IAA.
FONTE: O autor.

4.3.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra (RDC nº 27/2012; CHASIN *et al.*, 1998). Ela pode ser demonstrada por uma separação eficiente dos 3 analitos na corrida cromatográfica, utilizando amostras processadas de soro (figura 11) e de plasma (figura 12) de 3 fontes distintas, obtidas de voluntários sem DRC.

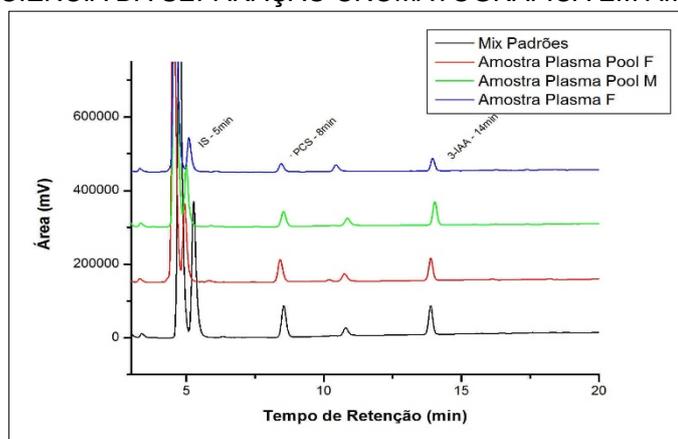
A confirmação da identidade dos analitos está evidenciada pelo aumento da área dos picos após a contaminação das amostras de soro (figura 13) e de plasma (figura 14) com padrões autênticos (*spikes*).

FIGURA 11 – EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM AMOSTRAS SORO



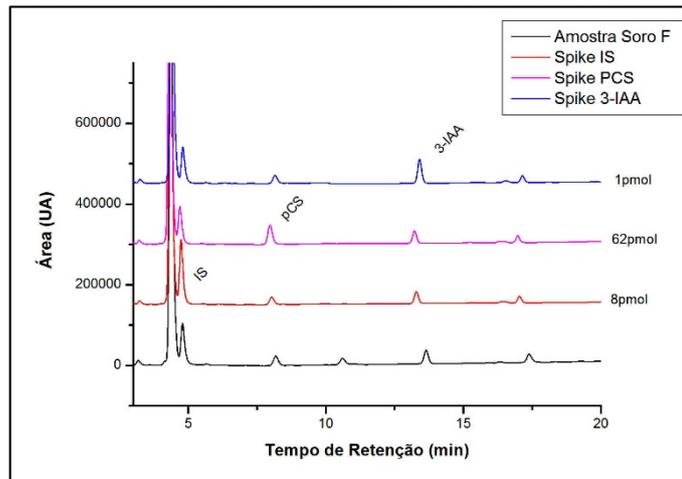
Nota: Mix dos 3 padrões em matriz soro utilizando o ponto 1 da curva de calibração (IS 5 μ M + PCS 15 μ M + IAA 0,2 μ M) comparado com amostras soro de 3 fontes distintas: amostra soro pool F (2 fontes femininas), amostra soro pool M (2 fontes masculinas) e amostra soro F (1 fonte feminina). FONTE: O autor.

FIGURA 12 – EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM AMOSTRAS PLASMA



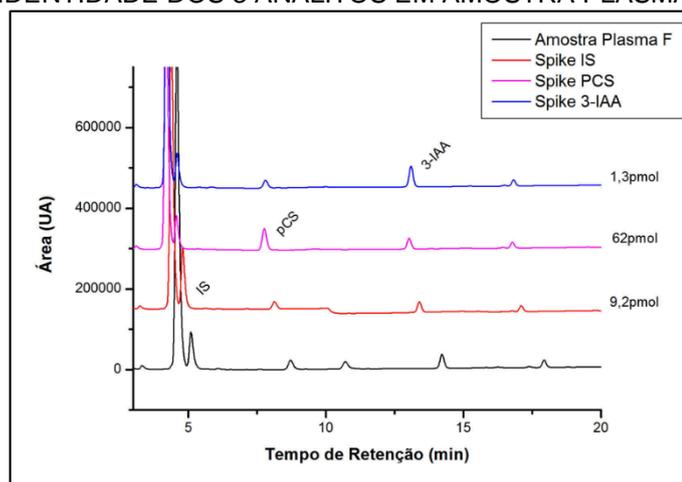
Nota: Mix dos 3 padrões em matriz plasma utilizando o ponto 1 da curva de calibração (IS 5 μ M + PCS 15 μ M + IAA 0,2 μ M) comparado com amostras soro de 3 fontes distintas: amostra plasma pool F (2 fontes femininas), amostra plasma pool M (2 fontes masculinas) e amostra plasma F (1 fonte feminina). FONTE: O autor.

FIGURA 13 – IDENTIDADE DOS 3 ANALITOS EM AMOSTRA SORO APÓS SPIKES



Nota: Amostra soro F na ausência ou presença de IS (4pmol), PCS (31pmol) e 3-IAA (0,5pmol). Para realizar os *spikes* foram adicionados os valores de massa equivalente ao dobro dos encontrados na amostra de soro basal. FONTE: O autor.

FIGURA 14 – IDENTIDADE DOS 3 ANALITOS EM AMOSTRA PLASMA APÓS SPIKES



Nota: Amostra plasma F na ausência ou presença de IS (4,6pmol), PCS (31pmol) e 3-IAA (0,65pmol). Para realizar os *spikes* foram adicionados os valores de massa equivalente ao dobro dos encontrados na amostra de plasma basal. FONTE: O autor.

4.3.3 Precisão

Segundo Chasin e colaboradores (1998), a precisão é a etapa que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra, e seu valor depende de erros indeterminados, aleatórios e impossíveis de serem eliminados. De acordo com a RDC nº 27/2012, a precisão deve ser determinada em uma mesma corrida, isto é, um conjunto de amostras processadas simultaneamente e injetadas em um único dia ((intracorrída ou *intraday*) ou em no mínimo 3 corridas diferentes (intercorrída ou *interday*).

Com a precisão *intraday* verificamos possíveis variações do instrumento durante o dia. Estes dados estão demonstrados na tabela 6, na qual calculamos a média das áreas de picos, desvio padrão e coeficiente de variação (CV). Em todas as amostras analisadas, o CV foi menor que 5%.

TABELA 6 – VARIAÇÃO DA PRECISÃO INTRADAY

AMOSTRAS	Média Área	DP±	CV%	
SORO BASAL 10µL				
IS	2.820.327,13	78829,30204	2,80	
PCS	699.992,16	12180,23245	1,74	
IAA	699.728,72	21737,89435	3,11	
SORO URÊMICO 10µL				
IS	65.023.260,40	513281,5255	0,79	
PCS	8.469.995,84	136793,462	1,62	
IAA	5.236.472,48	61791,1131	1,18	
SORO SPIKE - IS 25µM + PCS 50µM + IAA 10µM - 10µL				
IS 25µM (3330pmol / 360µL = 9,2pmol/µL)	14.673.358,22	257519,7562	1,76	
PCS 50µM (5522pmol / 360µL = 15,3pmol/µL)	2.025.975,72	71521,87225	3,53	
IAA 10µM (1110pmol / 360µL = 3,0pmol/µL)	16.986.837,68	568392,8863	3,35	
SORO SPIKE - IS 75µM + PCS 150µM + IAA 55µM - 10µL				
IS 75µM (9200pmol / 360µL = 25,5pmol/µL)	33.677.241,88	1526257,156	4,53	
PCS 150µM (20921pmol / 360µL = 58,1pmol/µL)	8.572.748,66	413701,113	4,83	
IAA 55µM (6150pmol / 360µL = 17,0pmol/µL)	90.353.088,15	3825745,042	4,23	CV% < 5,0%
PLASMA BASAL 10µL				
IS	1.692.987,83	62896,65676	3,72	
PCS	519.577,64	25080,13203	4,83	
IAA	563.299,06	25397,93701	4,51	
PLASMA URÊMICO 10µL				
IS	23.112.794,70	894495,3351	3,87	
PCS	11.497.227,74	552543,2625	4,81	
IAA	8.845.348,10	149913,7911	1,69	
PLASMA SPIKE - IS 25µM + PCS 50µM + IAA 10µM - 10µL				
IS 25µM (3330pmol / 360µL = 9,2pmol/µL)	12.708.477,02	585380,5216	4,61	
PCS 50µM (5522pmol / 360µL = 15,3pmol/µL)	1.848.387,98	47260,89802	2,56	
IAA 10µM (1110pmol / 360µL = 3,0pmol/µL)	16.258.401,91	329015,0091	2,02	
PLASMA SPIKE - IS 75µM + PCS 150µM + IAA 55µM - 10µL				
IS 75µM (9200pmol / 360µL = 25,5pmol/µL)	43.748.571,66	849070,7915	1,94	
PCS 150µM (20921pmol / 360µL = 58,1pmol/µL)	9.642.503,04	132396,6288	1,37	
IAA 55µM (6150pmol / 360µL = 17,0pmol/µL)	114.739.229,21	2286133,809	1,99	

Nota: A tabela mostra as médias das áreas das amostras soro e plasma, com coeficiente de variação menor que 5%. FONTE: O autor.

As possíveis variações na etapa *interday* podem ser atribuídas a problemas do operador durante o preparo das amostras. Cada amostra foi injetada apenas 1 vez e os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 5%. Os dados estão demonstrados na tabela 7, na qual calculamos a média das áreas de picos de amostras independentes, desvio padrão e coeficiente de variação.

TABELA 7 – VARIAÇÃO DA PRECISÃO *INTERDAY*

AMOSTRAS	Média Área	DP±	CV%	
SORO BASAL 10µL				
IS	2.733.090,93	125023,1749	4,57	
PCS	626.636,43	31203,16138	4,98	
IAA	665.892,80	30306,70804	4,55	
SORO URÊMICO 10µL				
IS	69.668.047,17	860896,3259	1,24	
PCS	8.986.860,73	348577,7905	3,88	
IAA	5.653.189,07	137718,2698	2,44	
SORO SPIKE - IS 25µM + PCS 50µM + IAA 10µM - 10µL				
IS 25µM (3330pmol / 360µL = 9,2pmol/µL)	14.324.975,40	84478,51169	0,59	
PCS 50µM (5522pmol / 360µL = 15,3pmol/µL)	1.678.904,23	36402,66432	2,17	
IAA 10µM (1110pmol / 360µL = 3,0pmol/µL)	16.726.148,97	423561,3694	2,53	
SORO SPIKE - IS 75µM + PCS 150µM + IAA 55µM - 10µL				
IS 75µM (9200pmol / 360µL = 25,5pmol/µL)	35.371.566,30	1043976,524	2,95	
PCS 150µM (20921pmol / 360µL = 58,1pmol/µL)	6.582.667,13	304624,5653	4,63	
IAA 55µM (6150pmol / 360µL = 17,0pmol/µL)	82.436.133,80	851398,2333	1,03	CV% < 5,0%
PLASMA BASAL 10µL				
IS	1.831.730,80	77569,33889	4,23	
PCS	485.119,93	18171,17318	3,75	
IAA	632.789,37	22499,60517	3,56	
PLASMA URÊMICO 10µL				
IS	25.496.842,30	1137168,673	4,46	
PCS	11.220.588,80	485271,3113	4,32	
IAA	8.352.897,77	378021,2719	4,53	
PLASMA SPIKE - IS 25µM + PCS 50µM + IAA 10µM - 10µL				
IS 25µM (3330pmol / 360µL = 9,2pmol/µL)	13.025.161,33	426993,2675	3,28	
PCS 50µM (5522pmol / 360µL = 15,3pmol/µL)	1.936.561,37	58191,36384	3,00	
IAA 10µM (1110pmol / 360µL = 3,0pmol/µL)	16.625.888,77	333763,672	2,01	
PLASMA SPIKE - IS 75µM + PCS 150µM + IAA 55µM - 10µL				
IS 75µM (9200pmol / 360µL = 25,5pmol/µL)	41.527.956,13	1346241,297	3,24	
PCS 150µM (20921pmol / 360µL = 58,1pmol/µL)	7.217.822,20	135453,5416	1,88	
IAA 55µM (6150pmol / 360µL = 17,0pmol/µL)	92.076.887,27	4107588,796	4,46	

Nota: A tabela mostra as médias das áreas das amostras soro e plasma, com coeficiente de variação menor que 5%. FONTE: O autor.

4.3.4 Recuperação

Foram feitas as médias das amostras injetadas para a obtenção do coeficiente de variação, e os nossos resultados mostraram que as recuperações foram superiores a 87%, conforme tabela 8.

TABELA 8 – RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS

AMOSTRAS	pmol Inicial	pmol Final	Recuperação %
SORO SPIKE 1 (IS 10µM + PCS 25µM + 3-IAA 1µM) 10µL			
IS 10µM (1110pmol / 360µL = 3,06pmol/µL)	30,6	36,8	91,3
PCS 25µM (2655pmol / 360µL = 7,38pmol/µL)	73,8	111,7	98,4
3-IAA 1µM (110pmol / 360µL = 0,31pmol/µL)	3,1	6,6	112,5
SORO SPIKE 2 (IS 250µM + PCS 400µM + IAA 20µM) 10µL			
IS 250µM (24000pmol / 360µL = 66,67pmol/µL)	666,7	707,3	104,8
PCS 400µM (42480pmol / 360µL = 118pmol/µL)	1180	1206,4	98,9
3-IAA 20µM (2000pmol / 360µL = 5,56pmol/µL)	55,6	58,8	100,2
SORO BASAL 10µL			
IS	8,9		
PCS	39,1		
3-IAA	3,1		
PLASMA SPIKE 1 (IS 10µM + PCS 25µM + 3-IAA 1µM) 10µL			
IS 10µM (1110pmol / 360µL = 3,06pmol/µL)	30,6	37,0	96,5
PCS 25µM (2655pmol / 360µL = 7,38pmol/µL)	73,8	121,3	96,3
3-IAA 1µM (110pmol / 360µL = 0,31pmol/µL)	3,1	9,0	99,4
PLASMA SPIKE 2 (IS 250µM + PCS 400µM + IAA 20µM) 10µL			
IS 250µM (24000pmol / 360µL = 66,67pmol/µL)	666,7	660,6	98,0
PCS 400µM (42480pmol / 360µL = 118pmol/µL)	1180	1215,8	98,8
3-IAA 20µM (2000pmol / 360µL = 5,56pmol/µL)	55,6	61,3	99,6
PLASMA BASAL 10µL			
IS	7,5		
PCS	50,2		
3-IAA	5,9		

Nota: A tabela mostra as quantidades de toxinas injetadas e as médias das porcentagens de recuperação das amostras superior a 87%. FONTE: O autor.

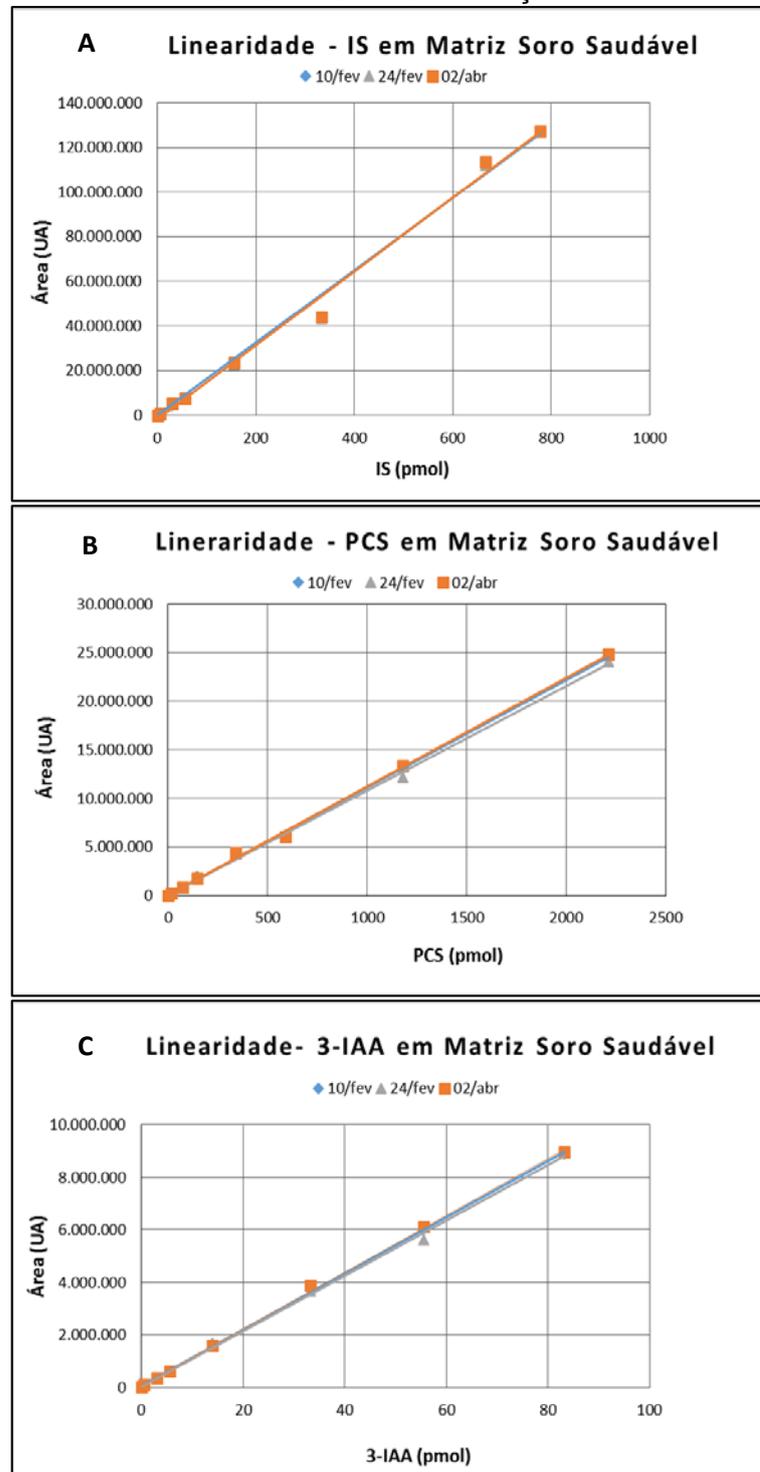
4.3.5 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico de responder proporcionalmente à concentração da amostra em análise, dentro de uma faixa que corresponda a concentração analítica especificada (CHASIN *et al.*, 1998) (figuras 15 e 16).

As curvas de calibração, além de servirem como instrumento de quantificação, mostram também o efeito da matriz biológica ao compararmos as inclinações das curvas. Segundo a RDC nº 27/2012, para matrizes não isentas de analitos, como as utilizadas neste trabalho, é importante mostrar que as inclinações não diferiram significativamente. Para todas as curvas, tanto soro como plasma, obtivemos variações das inclinações inferiores a 2% para IS e PCS e variação das inclinações

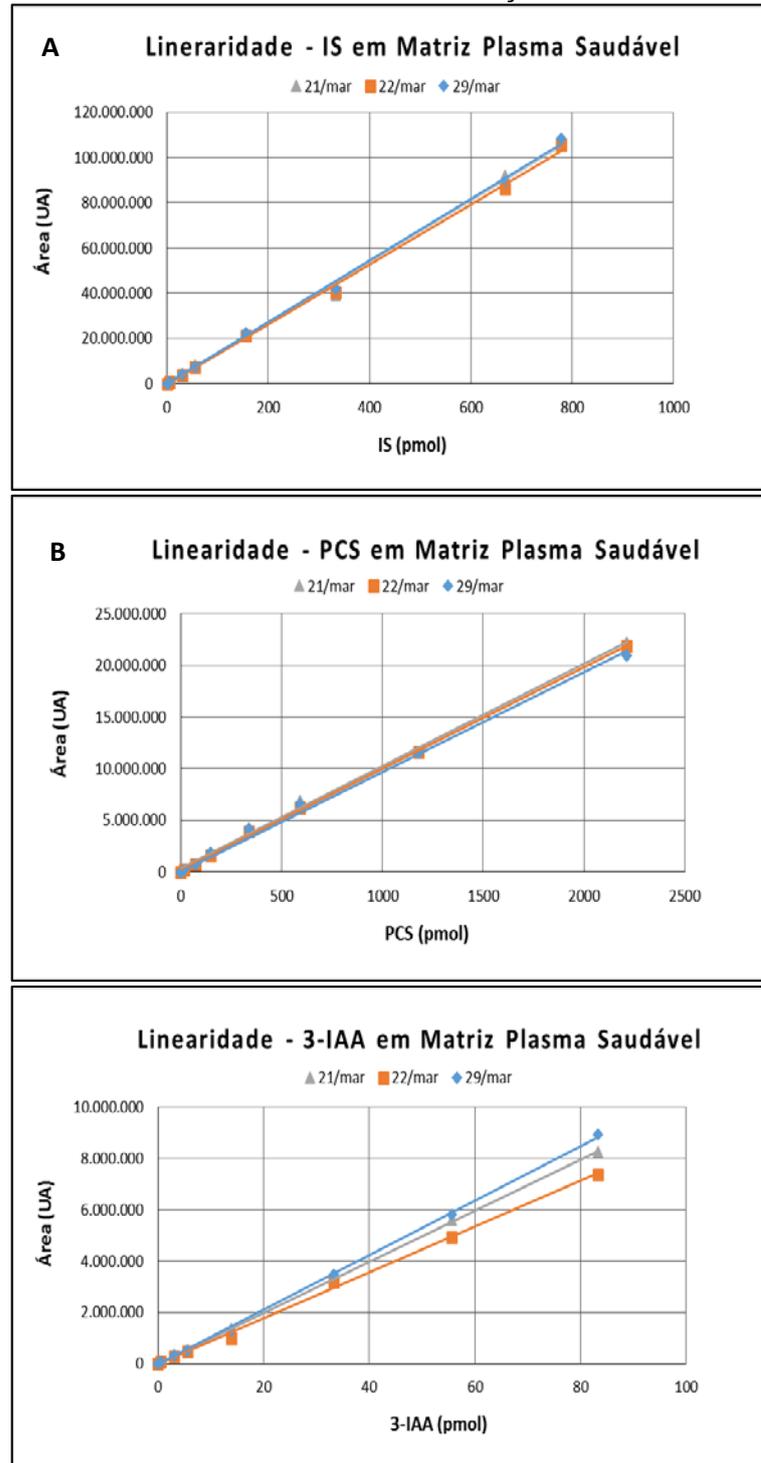
inferiores a 7,1% para 3-IAA. A média, o desvio padrão e a variação das inclinações estão relacionados na tabela 9.

FIGURA 15 – LINEARIDADE DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO EM MATRIZ SORO SAUDÁVEL



Nota: Curvas feitas em 3 matrizes distintas soro saudável, contendo 7 pontos dos analitos (cada ponto representa uma injeção), na faixa de concentração biológica, sendo curva A: IS; curva B: PCS; e curva C: 3-IAA. FONTE: O autor.

FIGURA 16 – LINEARIDADE DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO EM MATRIZ PLASMA SAUDÁVEL



Nota: Curvas feitas em 3 matrizes distintas plasma saudável, contendo 7 pontos dos analitos (cada ponto representa uma injeção), na faixa de concentração biológica, sendo curva A: IS; curva B: PCS; e curva C: 3-IAA. FONTE: O autor.

TABELA 9 – VARIAÇÃO DA INCLINAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Linearidade (Inclinação das Retas)			
Soro	IS	PCS	3-IAA
Fonte 1	162577	11121	108086
Fonte 2	163537	10788	105914
Fonte 3	162775	11243	109181
Média	162963	11051	107727
Desvio Padrão	413,85	192,30	1357,69
Variação %	0,25	1,74	1,26
Plasma	IS	PCS	3-IAA
Fonte 1	136338	9673	105901
Fonte 2	134669	10141	99422
Fonte 3	132149	9957	88996
Média	134385	9924	98106
Desvio Padrão	1721,88	192,69	6963,86
Variação %	1,28	1,94	7,10

Nota: Variação da inclinação das retas das curvas de calibração dos analitos em matrizes soro e plasma saudáveis. FONTE: O autor.

4.3.6 Estabilidade

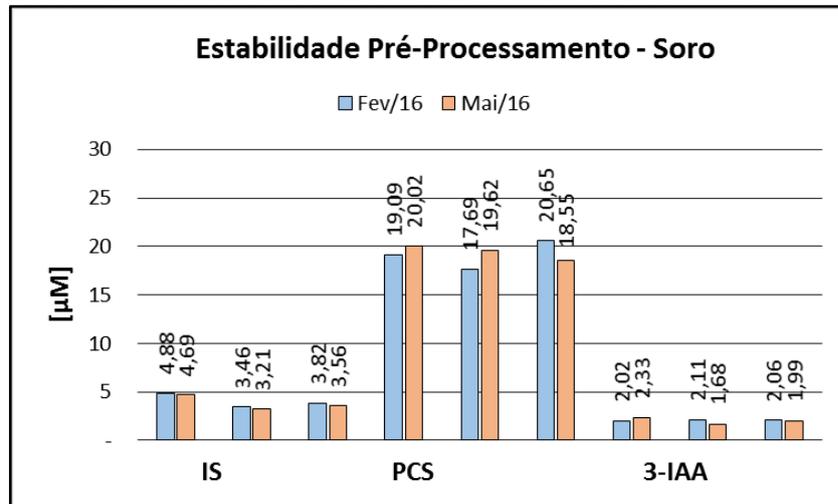
A estabilidade das amostras é uma etapa da validação na qual é possível analisar o analito na matriz biológica após ciclos de congelamento e descongelamento, curta duração, longa duração e pós-processamento (RDC 27/2012).

4.3.6.1 Estabilidade Pré-Processamento

Para garantir que as amostras de soro ou plasma possam ser usadas para estas análises mesmo após um tempo de estocagem congeladas, comparamos a quantificação das toxinas em 3 amostras de soro (figura 17) e 3 amostras de plasma (figura 18) em dois momentos distintos. As amostras de soro foram analisadas após 3 meses e as de plasma após 6 meses de armazenamento em -80°C.

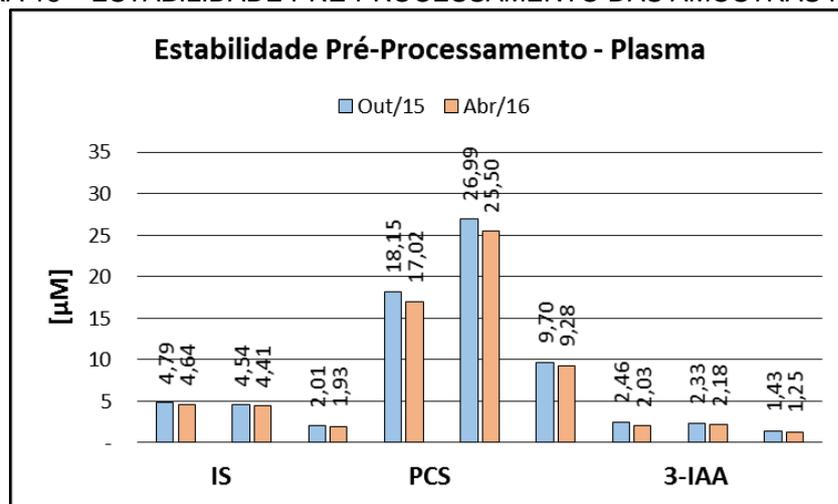
Os resultados não apresentaram diferenças nas concentrações das toxinas mostrando que as amostras podem ser armazenadas antes do processamento, com segurança, por um período de 3 meses para soro e 6 meses para plasma. Esta etapa será repetida quando as amostras completarem 12 meses de armazenamento.

FIGURA 17 – ESTABILIDADE PRÉ-PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS SORO



Nota: Na figura são demonstradas 3 amostras de soro processadas 2 vezes com intervalo de 3 meses. Os analitos estão separados por grupos e cada cor indica a data de processamento e análise, indicando que as amostras se mantiveram estáveis durante este período de tempo. FONTE: O autor.

FIGURA 18 – ESTABILIDADE PRÉ-PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PLASMA



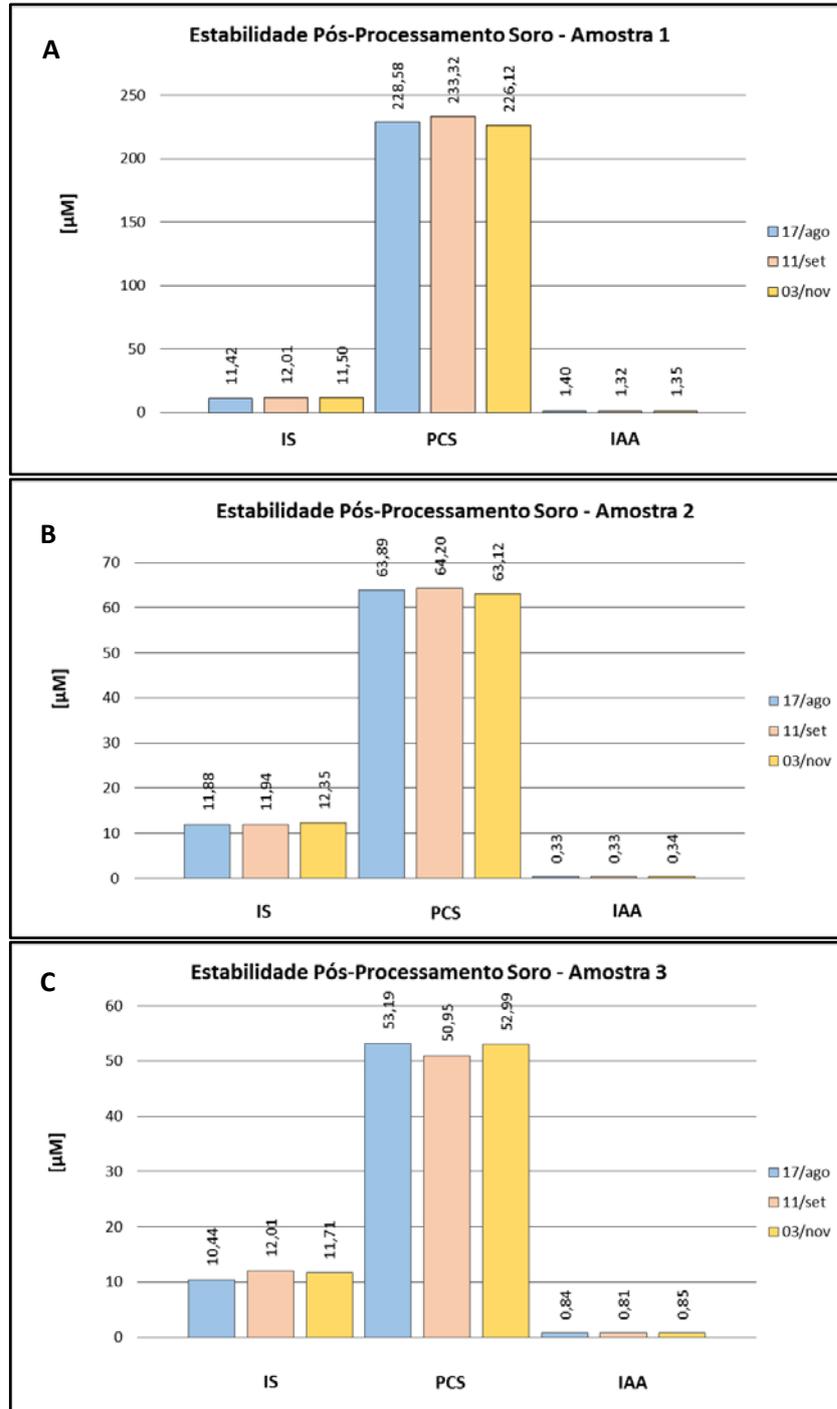
Nota: Na figura são demonstradas 3 amostras de plasma processadas 2 vezes com intervalo de 6 meses. Os analitos estão separados por grupos e cada cor indica a data de processamento e análise, indicando que as amostras se mantiveram estáveis durante este período de tempo. FONTE: O autor.

4.3.6.2 Estabilidade Pós-Processamento

Para avaliarmos se as amostras processadas podem ser analisadas após um tempo de armazenamento, analisamos amostras de soro (figura 19) injetadas em 3 momentos diferentes, de 3 fontes distintas, em intervalos de aproximadamente 1 mês e 2,5 meses pós-processamento, e amostras de plasma (figura 20) injetadas em 3 momentos diferentes, de 3 fontes distintas, com intervalo aproximado de 1,5 meses. As amostras de soro permaneceram armazenada em -20°C por 2,5 meses, mostrando que durante este período elas se mantiveram estáveis sem degradação das toxinas,

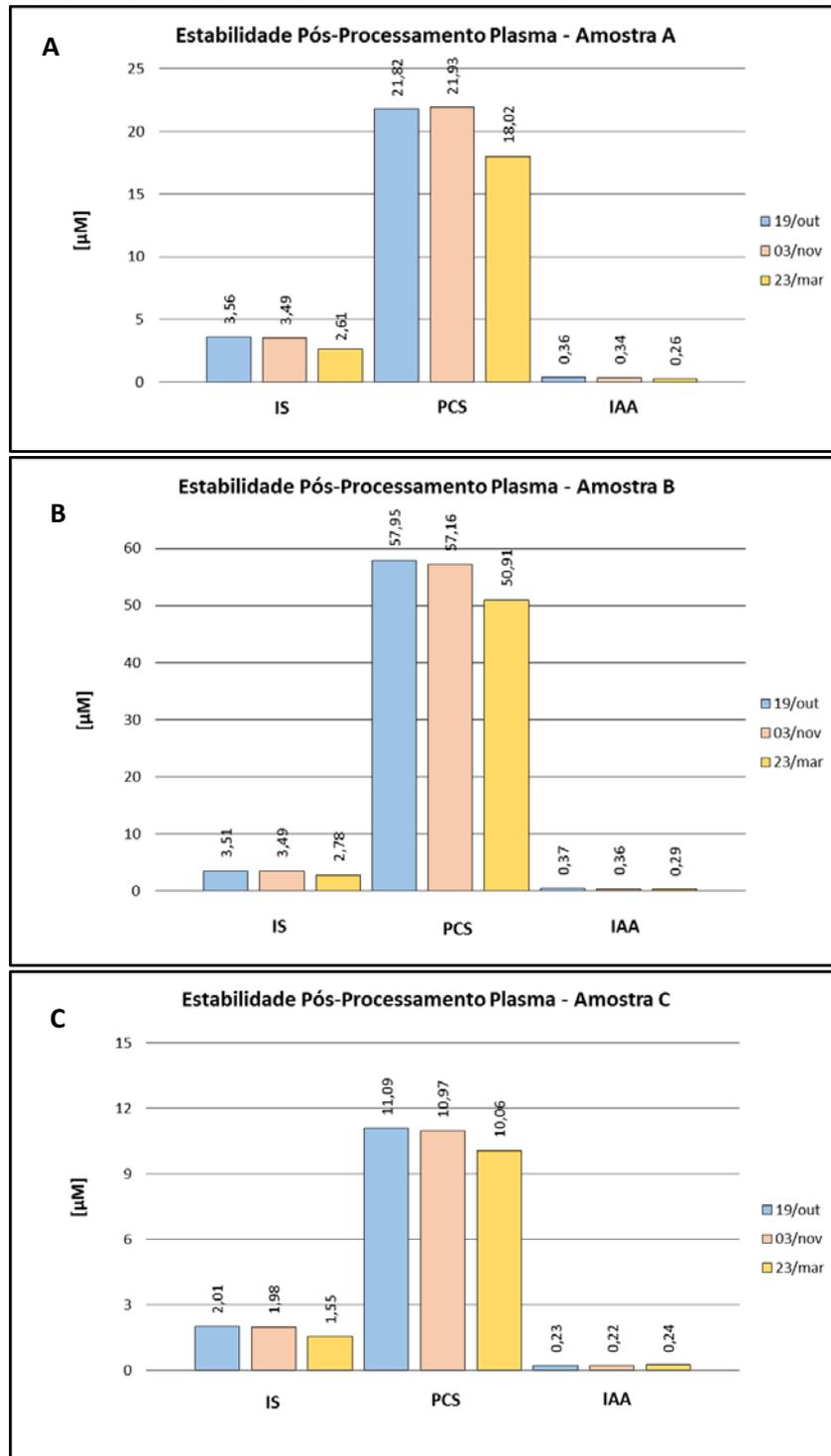
e as amostras de plasma permaneceram armazenadas nas mesmas condições por 5 meses, porém houve uma diminuição das áreas das toxinas após este período, mostrando que não é recomendável analisar as amostras processadas a após 2,5 meses.

FIGURA 19 – ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS SORO



Nota: Nas figuras A, B e C são demonstradas 3 amostras de soro distintas, processadas em uma data e injetadas em 3 momentos diferentes. FONTE: O autor.

FIGURA 20 – ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO AMOSTRAS PLASMA



Nota: Nas figuras A, B e C são demonstradas 3 amostras de plasma distintas, processadas em uma data e injetadas em 3 momentos diferentes. FONTE: O autor.

4.3.7 Limites de detecção e quantificação

Para obtermos o limite inferior de detecção diluímos o primeiro ponto da curva de calibração em matriz saudável de soro e de plasma até visualizarmos os analitos com confiança, simultaneamente. Nossos limites de detecção encontrados foram: 0,3 pmol para IS, 1,2 pmol para PCS e 0,06 pmol para 3-IAA.

Nossos limites de quantificação para as toxinas nas matrizes saudáveis de soro e plasma foram calculados através das curvas de calibração, utilizando como resposta do instrumento a menor concentração da curva. Os valores encontrados para matriz saudável soro foram: 1,1 pmol IS, 24,5 pmol PCS e 0,2 pmol 3-IAA, que correspondem as concentrações 0,4 μM , 8,8 μM e 0,1 μM , respectivamente; e para matriz saudável plasma foram: 4,8 pmol IS, 8,1 pmol PCS e 0,3 pmol 3-IAA, que correspondem as concentrações 1,7 μM , 2,9 μM e 0,1 μM , respectivamente, sendo todos os valores abaixo dos encontrados nas amostras basais dos voluntários saudáveis.

4.4 Variação entre matrizes - soro X plasma

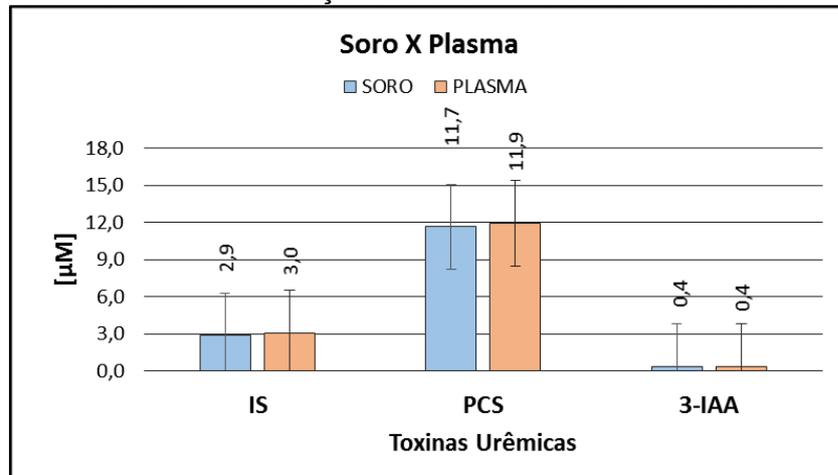
O método foi avaliado quanto ao desempenho em determinar os analitos independentemente do tipo de amostra (soro ou plasma). Os níveis basais em 4 fontes distintas no soro e no plasma foram isolados de uma mesma amostra de sangue, determinados e comparados (tabela 10 e figura 21). Os resultados mostram que não houve variação significativa entre as amostras de soro ou plasma.

TABELA 10 – CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS EM VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS

Voluntário 1	Soro [μM]	Plasma [μM]	Voluntário 2	Soro [μM]	Plasma [μM]
IS	1,84	2,03	IS	2,19	2,46
PCS	7,91	8,03	PCS	16,71	17,57
3-IAA	0,25	0,26	3-IAA	0,47	0,49
Voluntário 3	Soro [μM]	Plasma [μM]	Voluntário 4	Soro [μM]	Plasma [μM]
IS	3,95	4,06	IS	3,55	3,58
PCS	15,75	15,88	PCS	6,23	6,19
3-IAA	0,32	0,31	3-IAA	0,46	0,42

Nota: Concentrações das 3 toxinas encontradas em amostras na condição basal de soro e plasma dos voluntários saudáveis. FONTE: O autor.

FIGURA 21 – COMPARAÇÃO ENTRE MATRIZES SORO E PLASMA



Nota: Quantificação dos 3 analitos em amostras de soro ou plasma, isolados a partir da mesma amostra de sangue coletado de voluntários. Estatisticamente não houve diferenças significativas entre as matrizes (IS $p>0,06$, PCS $p>0,27$ e 3-IAA $p>0,73$). FONTE: O autor.

4.5. Colaborações com outros estudos

Nós estamos colaborando com alguns grupos de estudos na análise em amostras soro e plasma de pacientes DRC, com diferentes tratamentos, através do nosso método cromatográfico.

Até o momento, para o grupo de pesquisa do Dr. Roberto-Pecoits Filho (PUC-PR), analisamos entre soro e plasma, 130 amostras de pacientes DRC; para o grupo de pesquisa da Dra. Denise Mafra (UFF), analisamos 120 amostras plasma de pacientes DRC e aguardam análise 51 amostras soro; para o grupo de pesquisa da Prof^a. Dra. Andrea Moreno (PUC-PR), analisamos 98 amostras soro de pacientes DRC.

Para todos os grupos foi possível identificar e quantificar as 3 toxinas urêmicas estudadas neste trabalho. Os resultados foram entregues em concentrações μM , como mostrado nas tabelas representativas (tabelas 11 a 14).

TABELA 11 – RESULTADOS REPRESENTATIVOS DE AMOSTRAS SORO E PLASMA (COLABORAÇÃO 1)

Amostras Plasma			
Nome	IS [μ M]	pCS [μ M]	IAA [μ M]
1	3,87	111,61	0,84
2	76,59	213,96	1,67
3	23,14	70,89	0,85
4	40,26	183,88	1,83
5	9,09	72,74	0,50
Amostras Soro			
Nome	IS [μ M]	pCS [μ M]	IAA [μ M]
6	11,57	233,32	1,32
7	11,94	64,20	0,33
8	12,07	68,40	0,71
9	11,27	53,69	0,81
10	7,33	29,85	0,94

Nota: Alguns resultados do grupo de pesquisa do Dr. Roberto Pecoits-Filho (PUC-PR). 130 amostras foram analisadas no total. FONTE: O autor.

TABELA 12 – RESULTADOS REPRESENTATIVOS DE AMOSTRAS PLASMA (COLABORAÇÃO 2)

Amostras Plasma			
Nome	IS [μ M]	pCS [μ M]	IAA [μ M]
1	44,90	203,36	0,53
2	14,77	144,61	0,99
3	16,38	49,05	1,05
4	5,68	112,09	1,53
5	14,01	173,35	2,26

Nota: Alguns resultados do grupo de pesquisa da Dra. Denise Mafra (UFF). 120 amostras foram analisadas até o momento. FONTE: O autor.

TABELA 13 – RESULTADOS REPRESENTATIVOS DE AMOSTRAS SORO (COLABORAÇÃO 3)

Amostras Soro			
Nome	IS [μ M]	pCS [μ M]	IAA [μ M]
1	9,32	144,65	0,80
2	26,76	21,29	1,48
3	22,79	90,19	0,47
4	8,45	107,97	0,75
5	6,86	47,03	0,65

Nota: Alguns resultados do grupo de pesquisa da Prof^a. Dra. Andrea Moreno (PUC-PR). 98 amostras foram analisadas no total. FONTE: O autor.

TABELA 14 – RESULTADOS REPRESENTATIVOS DE AMOSTRAS SORO (COLABORAÇÃO 4)

Amostras Soro			
Nome	IS [μ M]	pCS [μ M]	IAA [μ M]
1	263,90	413,87	6,02
2	156,77	538,88	12,95
3	39,92	347,23	8,64
4	137,47	130,09	14,42
5	31,99	194,74	6,41

Nota: Alguns resultados do grupo de pesquisa da Prof^a. Fabíola Maniglia (USP-Ribeirão Preto/SP). 138 amostras foram analisadas no total. FONTE: O autor.

5 DISCUSSÃO

A busca por um método que permita estas análises é importante no atual estágio das pesquisas na área de toxicidade urêmica, uma vez que permitirá analisar os impactos de diferentes concentrações de cada toxina em inúmeros parâmetros (como mortalidade, doenças cardiovasculares entre outras complicações da DRC) e avaliar os efeitos de intervenções farmacológicas, microbiológicas e dietéticas nos níveis circulantes das toxinas. Estudos recentes têm conseguido fazer tais correlações. Lin e colaboradores (2015) apresentaram um estudo relacionando os elevados níveis de IS e PCS com doenças cardiovasculares e outras causas de mortalidade de pacientes DRC, e concluíram que ambas toxinas estão associadas com mortalidade de pacientes DRC, mas apenas PCS está associada com risco cardiovascular. Barreto e colaboradores (2010) em seu estudo associaram a mortalidade de pacientes ao nível elevado de IS em soro, pois além de contribuir para a progressão da DRC ele pode atuar como uma toxina vascular, promovendo calcificação aórtica e rigidez vascular. Alguns estudos apontam que níveis elevados de PCS livre, mas não os níveis totais de PCS circulantes, estão associados com maior mortalidade (LIABEUF *et al.*, 2010). Isso demonstra a importância de incluirmos em nosso método também a determinação das toxinas livres. Dou e colaboradores (2014) em um estudo que relacionou 3-IAA com efeitos cardiovasculares, mostraram que a mortalidade foi significativamente maior devido a esses efeitos em pacientes DRC com níveis dessa toxina superiores a 3.73 μM .

Em relação a determinação analítica das toxinas em fluidos do sangue, Boelaert e colaboradores (2013) desenvolveram um método de UPLC-MS-MS que permite a quantificação de sete toxinas simultaneamente em soro de pacientes com DRC e voluntários saudáveis, mostrando em seu estudo uma combinação de instrumentos para possibilitar tal metodologia; Kikuchi e colaboradores (2010) também realizaram uma análise de toxinas urêmicas combinando instrumentos de cromatografia líquida e espectrômetro de massa. Tais métodos, entretanto, requerem instrumentação de detecção de alto custo. Para padronizar nosso método, nós adaptamos os protocolos descritos por Calaf e colaboradores (2011) e Meert e colaboradores (2012), os quais empregam a detecção por fluorescência, que é uma solução de baixo custo.

A validação de um método é uma etapa muito importante de qualquer metodologia que envolva amostras biológicas, medicamentos, terapias, sendo um dos principais elementos em um sistema de qualidade. A validação visa assegurar que o método está adequado ao que se propõe identificar e quantificar. Estudos envolvendo HPLC propõem diferentes validações (MEERT *et al.*, 2012; CALAF *et al.*, 2011) e nosso método foi construído com base nesses estudos e também na RDC 27/2012 (ANVISA). Para curvas de calibração, a RDC 27/2012 traz os requisitos mínimos para validação, no qual as mesmas devem ser feitas na matriz de estudo (soro ou plasma) e a variação entre as curvas deve ser menor que 15%. Para preparo das curvas em matrizes biológicas (soro e plasma) utilizamos as concentrações: IS (2, 10, 20, 50, 100, 250 e 280 μM), PCS (6, 25, 50, 100, 200, 400 e 700 μM) e 3-IAA (0,2, 1, 2, 5, 10, 20 e 30 μM) e calculamos os valores em picomols injetados. Meert e colaboradores (2012) na análise de PCS e *p*-cresil glucoronidato obtiveram uma variação inferior a 7,1% para ambos analitos através da análise das inclinações das curvas de calibração, como feito em nosso estudo. Para todas as toxinas a nossa variação foi menor que 2% para soro e menor que 7,1% para plasma, dados estes apresentados na tabela de variação da inclinação das curvas de calibração (tabela 8). Todas as curvas de calibração utilizadas apresentaram um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99.

Za'abi *et al* e colaboradores (2012) avaliaram a seletividade do método comparando cromatogramas de controle de plasma em branco de diversas fontes e plasma enriquecido com IS (*spikes*). Nossos resultados foram obtidos da mesma forma, mas com *spikes* individuais das 3 toxinas estudadas. Nesta etapa da validação, nosso método se mostrou eficaz na separação e identificação dos analitos, independente da matriz testada. Com os *spikes* confirmamos a identidade dos analitos.

A precisão de um método reflete parâmetros de repetibilidade (análise usando o mesmo método para a mesma amostra no mesmo laboratório) e reprodutibilidade (análise usando o mesmo método para a mesma amostra em laboratório, equipamento e operador diferentes (CHASIN *et al*, 1998), sendo que a precisão *intraday* aponta possíveis variações do instrumento durante o dia de injeções de amostras, devendo ser determinada no mesmo dia, enquanto que a precisão *interday* aponta erros do operador no momento do preparo das amostras. Boelaert e

colaboradores (2013) durante a validação do método utilizado no estudo publicado, obtiveram as precisões *intraday* e *interday* inferior a 15%; Calaf e colaboradores (2011) obtiveram as precisões *intraday* inferior a 7% e *interday* inferior a 4%; Za'abi e colaboradores (2012), obtiveram as variações das precisões *intraday* e *interday* inferior a 15%. A RDC nº 27/2012 no seu artigo 27 recomenda que essa variação seja inferior a 15%. Nós fizemos a precisão *intraday* e *interday* e para ambas obtivemos uma variação inferior a 5%, o que nos mostra que nosso instrumento respondeu ao método com estabilidade e o operador estava bem treinado para seu trabalho. O teste de recuperação avalia a eficiência do método durante o processamento da amostra. Nestas análises obtivemos recuperação das amostras com variação inferior a 13%, porém esta etapa não tem recomendação pela RDC 27/2012, mas Calaf e colaboradores (2011) obtiveram recuperação com variação inferior a 10% para concentrações normais e urêmicas; Meert e colaboradores (2012) obtiveram variação inferior a 6%; Za'abi e colaboradores (2012), obtiveram variação da recuperação inferior a 20%.

A estabilidade das amostras pré-processamento visa determinar se as amostras armazenadas em freezer -80°C não sofrem alterações durante determinado período. Este ensaio foi realizado em soro e plasma, em amostras armazenadas durante 6 meses após coleta, e estas não apresentaram grandes diferenças em relação às áreas dos analitos estudados. A estabilidade pós-processamento determina se as concentrações dos analitos permanecem inalterados após estocagem das amostras processadas. Este ensaio foi realizado em soro e plasma. As amostras de soro processadas permaneceram pelo menos 2,5 meses em temperatura -20°C e foram injetadas em 3 intervalos de aproximadamente 1 mês, e as amostras de plasma processadas permaneceram pelo menos 5 meses em temperatura -20°C e também foram injetadas em 3 intervalos de tempo de aproximadamente 1,5 meses. As toxinas presentes nas amostras de soro não apresentaram alterações importantes, porém as amostras de plasma tiveram uma diminuição das áreas das toxinas após 5 meses de armazenamento, o que nos mostra que houve alguma degradação durante o tempo de armazenamento e que com segurança podemos analisar amostras processadas em até 2,5 meses.

Quanto as determinações realizadas em amostras biológicas, conseguimos quantificar as toxinas totais em várias amostras humanas. As amostras de voluntários

sem DRC apresentaram valores semelhantes para IS e PCS com os descritos na literatura, apenas 3-IAA apresentou valores abaixo da faixa descrita por Vanholder e colaboradores (2012) e Boelaert e colaboradores (2013). Não sabemos ainda a causa desta diferença no momento. Há a possibilidade de haver diferença na microbiota das populações brasileiras com as europeias e japonesas, levando a uma diferente metabolização de triptofano. Em um trabalho de nosso grupo, determinamos níveis de cisteína plasmática mais altos que de outros estudos em populações norte-americanas (RODRIGUES *et al.*, 2012). Atribuímos esta diferença a uma provável diferença na dieta. Entretanto, mais importante foi a demonstração de que os níveis determinados em amostras de soro ou plasma do mesmo indivíduo apresentam valores muito semelhantes, o que nos mostra que o nosso método é adequado para as 2 matrizes de amostras.

Portanto, nossos dados demonstram que o método aqui descrito está adequado para análise das concentrações totais (somatório de toxinas livres e conjugadas) de IS, PCS e 3-IAA em amostras de soro e plasma, de pessoas saudáveis e de pacientes DRC. Alguns parâmetros ainda serão incluídos em nossa validação como o efeito de diferentes agentes anticoagulantes.

O outro método aqui estabelecido foi a determinação dos níveis intracelulares de IS, em células em cultura. Este método foi desenvolvido para avaliar a incorporação de IS em células e correlacionar os diferentes níveis de toxina com perda de viabilidade e interferência em vias de sinalização. Nossos dados mostraram que células mesangiais incorporaram em tempo relativamente curto (60 minutos) o IS do meio de cultura, e que esta incorporação foi dependente dos transportadores de ânions orgânicos. Este resultado está de acordo com os dados apresentados por Miyamoto e colaboradores (2011), que realizou o estudo com PCS em células HK-2, e com Watanabe e colaboradores (2013), com o estudo com PCS em células HEK-293, ambos utilizando o mesmo inibidor e ambos analisando a toxina pelo método de HPLC com detecção por fluorescência. Entretanto, a alta concentração de inibidor necessária para inibir o transportador pode sugerir que outra proteína não inibível por probenecid também realize este transporte. Neste contexto, embora tenhamos utilizado como modelo a célula mesangial, padronizamos um método de análise de IS intracelular que pode ser estendido a qualquer outro tipo celular em cultura.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho:

Estabelecemos um método baseado em HPLC para identificação e quantificação dos níveis totais (livre e conjugado) de 3 toxinas urêmicas de grande relevância clínica: indoxil sulfato, *p*-cresilsulfato e ácido indol-3 acético.

Estabelecemos um método baseado em HPLC para análise da incorporação de indoxil sulfato em células mesangiais.

Estabelecemos colaborações com outros grupos de pesquisas em toxicidade urêmica e entregamos 486 análises cromatográficas realizadas em amostras de soro e plasma.

REFERÊNCIAS

ALBERTONI, G.; MAQUIGUSSA, E., PESSOA, E., BARRETO, J. A.; BORGES, F.; SCHOR, N. Soluble uric acid increases intracellular calcium through an angiotensin II-dependent mechanism in immortalized human mesangial cells. **Experimental Biology and Medicine** 235: 825-832, 2010.

ALPERS, C. E. O rim. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. **Robins & Cotran: Bases patológicas das doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap.20, p.915-977, 2010.

BANAS, B.; LUCKOW, B.; MOLLER, M.; KLIER, C.; NELSON, P. J.; SCHADDE, E.; BRIGL, M.; HALEVY, D.; HOLTHOFER, H.; REINHARTD, B.; SCHLONDORFF, D. Chemokine and chemokine receptor expression in a novel human mesangial cell line. **J Am Soc Nephrol** 10: 2314-2322, 1999.

BARRETO, F. C.; BARRETO, D. V.; LIABEUF, S.; MEERT, N.; GLORIEUX, G.; TEMMAR, M.; CHOUKROUN, G.; VANHOLDER, R.; MASSY, Z. A.; EUROPEAN UREMIC TOXIN WORK GROUP (EUTox). Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. **Clin J Am Soc Nephrol**. Oct;4(10):1551-8, 2009.

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**. 36(2):221-235, 2014.

BASTOS, M. G.; BREGMAN, R.; KIRSTAJN, G. M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também tratável. **Rev Assoc Med Bras**. 56(2): 248-53, 2010.

BASTOS, M. G.; BREGMAN, R.; KIRSTAJN, 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**. 33(1):93-108, 2011.

BERTUZZI, A.; MINGRONE, G.; GANDOLF, A.; GRECO, A. V.; RINGOIR, S.; VANHOLDER, R. Binding of indole-3-acetic acid to human serum albumin and competition with L-tryptophan. **Clinica Chimica Acta**. 265: 183-192, 1997.

BOELAERT, J.; LYNEN, F.; GLORIEUX, G.; ELLOT, S.; LANDSCHOOT, M. V.; WATERLOOS, M. A.; SANDRA, P.; VANHOLDER, R. A novel UPLC-MS-MS method for simultaneous determination of seven uremic retention toxins with cardiovascular relevance in chronic kidney disease patients. **Anal Bioanal Chem**. 405:1937–1947, 2013.

BRASIL. **Anvisa**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012 – Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>>, acesso em 06/10/2014.

CALAF, R.; CERINI, C.; GÉNOVÉSIO, C. VERHAEGHE, P.; JOURDE-CHICHE, N.; BERGÉ-LEFRANC, D.; GONDOUIN, B.; DOU, L.; MORANGE, S.; ARGILÉS, A.; RATHELOT, P.; DIGNAT-GEORGE, F.; BRUNET, P.; CHARPIOT, P. Determination of uremic solutes in biological fluids of chronic kidney disease patients by HPLC assay. **J Chromatogr B**. Aug 879(23):2281-6, 2011.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNICOLA, N. A., G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Bras Toxicologia**. 11(1) 1-6, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo: Editora Unicamp, cap. 9, p. 273-398, 2006.

DE SMET, R.; DAVID, F.; SANDRA, P.; VAN KAER, J.; LESAFFER, G.; DHONDT, A.; LAMEIRE, N.; VANHOLDER, R. A sensitive HPLC method for the quantification of free and total p-cresol in patients with chronic renal failure. **Clinica Chimica Acta**. 278: 1-21, 1998.

DOU, L.; JOURDE-CHICHE, N.; FAURE, V.; CERINI, C.; BERLAND, Y.; DIGNAT-GEORGE, F.; BRUNET, P. The uremic solute indoxil sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. **J Thromb Haemost**. 5: 1302-1308, 2007.

DOU, L.; SALLE, M.; CERINI, C.; POITEVIN, S.; GONDOUIN, B.; JOURDE-CHICHE, N.; FALLAGUE, K.; BRUNET, P.; CALAF, R.; DUSSOL, B.; MALLETT, B.; DIGNAT-GEORGE, F.; BURTEY, S. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. **J Am Soc Nephrol**. 26: 876-887, 2014.

DUMMER, C. D.; THOMÉ, F. S.; VERONESE, F. V. Doença renal crônica, inflamação e aterosclerose: novos conceitos de um velho problema. **Rev Assoc Med Bras**. 53(5): 446-50, 2007.

DURANTON, F.; COHEN, G.; DE SMET, R.; RODRIGUEZ, M.; JANKOWSKI, J.; VANHOLDER, R.; ARGILES, A.; EUTox. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. **J Am Nephrol**. 23: 1258-1270, 2012.

GELASCO, A. K.; RAYMOND, J. R. Indoxyl sulfate induces complex redox alterations in mesangial cells. **Am J Physiol Renal**. 290: F1551-F1558, 2006.

HSU, H. J.; YEN, C. H.; WU, I. W.; HSU, K. H.; CHEN, C. K.; SUN, C. Y.; CHOU, C. C.; CHEN, C. Y.; TSAI, C. J.; WU, M. S.; LEE, C. C. The association of uremic toxins and inflammation in hemodialysis patients. 2014. **Plos One**. 9(7): 1-14, 2014.

ITO, S.; YOSHIDA, M. Protein-bound uremic toxins: new culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients. **Toxins**. 6: 665-678, 2014.

JENNETE, J. C. O rim. In: GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D.; RUBIN, E. **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, cap.16, 2013.

KIKUCHI, K.; ITOH, Y.; TATEOKA, R. EZAWA, A.; MURAKAMI, K.; NIWA, T. Metabolomic analysis of uremic toxins by liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B**. 879:1662-1668, 2010.

LIABEU, S.; BARRETO, D. V.; BARRETO, F. C.; MEERT, N.; GLORIEUX, G.; SCHEPERS, E.; TEMMAR, M.; CHOUKRON, G.; VANHOLDER, R.; MASSY, Z. A.; EUROPEAN UREAMIC TOXIN WORK GROUP (EUTox). Free *p*-cresylsulfate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**. 25:1183–1191, 2010.

LIN, C-J.; WU, V.; WU, P-C.; WU, C-J. Meta-analysis of the associations of *p*-cresyl sulfate (PCS) and indoxil sulfate (IS) with cardiovascular events and all-cause mortality in patients with chronic renal failure. **Plos One**. 10 (7): e0132589, 2015.

MEERT, N.; SCHEPERS, E.; GLORIEUX, G.; VAN LANDSCHOOT, M.; GOEMAN, J. L.; WATERLOOS, M. A.; DHONDT, A.; VAN DER EYCKEN, J.; VANHOLDER, R. Novel method for simultaneous determination of *p*-cresylsulphate and *p*-cresylglucuronide: clinical data and pathophysiological implications. **Nephrol Dial Transplant**. Jun; 27(6):2388-2396, 2011.

MEYER, T. W.; HOSTETTER, T. H. Uremia. **N Engl J Med**. 357:1316-25, 2007.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 2ed. Editora Wiley, cap. 10, p. 144-157, 1993.

MENDHAM, J. **Vogel: Análise Química Quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, cap. 8, p. 144-159, 2011.

MIYAMOTO, Y.; WATANABE, H.; NOGUCHI, T.; KOTANI, S.; NAKAJIMA, M.; KADOWAKI, D.; OTAGIRI, M.; MARUYAMA, T. Organic anion transporters play an important role in the uptake of *p*-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney. **Nephrol Dial Transplant**. 26: 2498-2502, 2011.

National Kidney Foundation. Disponível em <<https://www.kidney.org/>>. Acesso em 20/06/2015.

NIWA, T. Indoxyl sulfate is a nefro-vascular toxin. **J Renal Nutrition**. 5(20): s2-s6, 2010.

NIWA, T. Targeting protein-bound uremic toxins in chronic kidney disease: Review. **Healthcare Info UK**. 1287-1301, 2013.

PINTO, L. M. O. Revisão/Atualização em nefrologia clínica: células mesangiais e matriz mesangial: sua interação mediando o processo de cronificação da lesão glomerular. **J Bras Nefrol**. 20(2):178-185, 1998.

RODRIGUES, S. D.; BATISTA, G. B.; INGBERMAN, M.; PECOITS-FILHO, R.; NAKAO, L. S. Plasma cysteine/cysteine reduction potential correlates with plasma creatinine levels in chronic kidney disease. **Blood Purif**. 34:231-237, 2012.

ROMÃO JUNIOR, J. E. Doença renal crônica: definição epidemiologia e classificação. **J Bras Nefrol.** v. 26, n. 3, supl. 1, p. 1-3, 2004.

ROSSI, M.; CAMPBELL, K. L.; JOHNSON, D. W.; STANTON, T.; VESEY, D. A.; COOMBES, J. S.; WESTON, K. S.; HAWLEY, C. M.; MCWHINNEY, B. C.; UNGERER, J. P. J.; ISBEL, N. Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease. **Archives of Medical Research.** 45:309-317, 2014.

SBN - Sociedade Brasileira de Nefrologia. **Censo 2011.** Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/leigos/index.php?censo>>. Acesso em: 20/05/2015.

SCHULER, A. **Cromatografia à Gás e a Líquido.** 12 ed, 2010. Disponível em <<https://dl.dropboxusercontent.com/u/47159731/Cromatografia%2012.pdf>>, acesso em 20/10/2014.

STINGHEN, A. E. M.; GONÇALVES, S. M.; MARTINES, E. G.; NAKAO, L. S.; RIELLA, M. C.; AITA, C. A.; PECOITS-FILHO, R. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. **Nephron Clin Pract.** 85, 2008.

VANHOLDER, R.; DE SMET, R.; GLORIEUX, G.; ARGILÉS, A.; BAURMEISTER, U.; BRUNET, P.; CLARK, W.; COHEN, G.; DE DEYN, P. P.; DEPPISCH, R.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; HENLE, T.; JORRES, A.; LEMKE, H. D.; MASSY, Z. A.; PASSLICK-DEETJEN, J.; RODRIGUEZ, M.; STEGMAYR, B.; STENVINKEL, P.; TETTA, C.; WANNER, C.; ZIDEK, W.; EUROPEAN UREMIC TOXIN WORK GROUP (EUTox). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney Int.** 63:1934-43, 2003.

VANHOLDER, R.; HOEFLIGER, N.; DE SMET, R.; RINGOIR, S.; VOGELEERE, P. Extraction of protein bound ligands from azotemic sera: comparison of 12 deproteinization methods. **Kidney International.** Vol. 41: 1707-1712, 1992.

VANHOLDER, R.; LAECKE, S. V.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatr Nephrol.** 23:1211–1221, 2008.

VANHOLDER, R.; SCHEPERS, E.; PLETINCK, A.; NAGLER, E. V.; GLORIEUX, G. The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. **J Am Soc Nephrol.** 25:1-11, 2014.

VANHOLDER, R.; DE SMET, R. Pathophysiologic Effects of Uremic Retention Solutes: Review. **J Am Soc Nephrol.** 10:1815–1823, 1999.

WANG, W. J.; CHENG, M. H.; SUN, M. F.; HSU, S. F.; WENG, C. S. Indoxyl sulfate induces renin release and apoptosis of kidney mesangial cells. **J Toxicol Sci.** (39)4: 637-643, 2014.

WATANABE, H.; MIYAMOTO, Y.; HONDA, D.; TANAKA, H.; WU, Q.; ENDO, M.; NOGUCHI, T.; KADOWAKI, D.; ISHIMA, Y.; KOTANI, S.; NAKAJIMA, M.; KATAOKA, K.; KIM-MITSUYAMA, S.; TANAKA, M.; FUKAGAWA, M.; OTAGIRI, M.; MARUYAMA,

T. P-cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. **Kidney International**. 83: 582-592, 2013.

WATANABE, H.; SAKAGUCHI, Y.; SUGIMOTO, R.; KANEKO, K.; HIROSHI, I.; KOTANI, S.; NAKAJIMA, M.; ISHIMA, Y.; OTAGIRI, M.; MARUYAMA, T. Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for *p*-cresyl sulfate, a uremic toxin. **Clin Exp Nephrol**. 2013.

ZA'ABI, M. A.; ALI, B.; TOUBI, M. A. HPLC – Fluorescence method for measurement of the uremic toxin indoxil sulfate in plasma. **Journal of Chromatographic Science**. 51:40-43, 2012.

ZATZ, R.; SEGURO, A. C.; MALNIC, G. Bases fisiológicas da nefrologia: doença/insuficiência renal crônica. Cap. 15. **Medicina Usp**. Atheneu, 2012.

APÊNDICE 1 – Parecer consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Plataforma baseada em HPLC para determinação de toxinas urêmicas em amostras biológicas

Pesquisador: CARLA JULIANA RIBEIRO DOLENGA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 48291015.6.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia

Patrocinador Principal: Fundação Araucária
CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.230.688

Apresentação do Projeto:

Título - Plataforma baseada em HPLC para determinação de toxinas urêmicas em amostras biológicas.

Profa. Dra. Lia Nakao; Mestranda Carla Juliana Ribeiro Dolenga

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada por um acúmulo progressivo de solutos associado a complicações urêmicas decorrente de diversas doenças, por exemplo, diabetes mellitus lesando o parênquima renal, e hipertensão arterial que altera os tecidos devido ao impacto mecânico na parede dos vasos e distúrbios cardiovasculares . A uremia pode ser definida como a retenção ou o acúmulo de metabólitos que podem levar o paciente a morte em poucos dias . Em pacientes DRC é muito comum uma excreção urinária deficiente de metabólitos levando ao acúmulo de toxinas urêmicas no plasma , induzindo disfunção endotelial , inflamação vascular e calcificação , além de estresse oxidativo sistêmico que tende a aumentar com a progressão da doença .

Objetivo da Pesquisa:

As autoras Informam que este projeto tem por objetivo a padronização de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para identificar e quantificar toxinas urêmicas ligadas a proteínas, em amostras

Endereço: Rua Pedro岑ergo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-340

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7250

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.230.093

biológicas

como soro, plasma e urina, por se tratar de uma metodologia com alto poder de resolução, com separações rápidas e reprodutíveis.

Como objetivos específicos:

Estabelecer uma plataforma baseada em HPLC para determinação de toxinas urêmicas, tais como p-cresil sulfato e indoxil sulfato, entre outras.

Validar a metodologia em amostras biológicas, como soro, plasma e urina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo as pesquisadoras o estudo não está associado a nenhum risco para os voluntários. Quanto aos benefícios, este projeto também não traz nenhum benefício direto aos participantes.

Caso seja possível padronizar o método, um provável benefício aos pacientes DRC só ocorrerá em médio ou longo prazo.

As autoras ainda informam que a pesquisa não afetará positiva ou negativamente os indivíduos participantes, apresentando apenas o incômodo no momento da coleta do sangue, já que um pequeno desconforto poderá ser percebido pela inserção da agulha em seu antebraço.

Trata-se de estudo de padronização de técnica em que serão necessários voluntários saudáveis para avaliar a eficiência da técnica.

OS voluntários serão recrutados na comunidade do Setor de Ciências Biológicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa se reveste de relevância social pois a futura possibilidade de identificação e quantificação das toxinas urêmicas em amostras biológicas pode contribuir para o acompanhamento da progressão da doença renal crônica, bem como alterações na conduta terapêutica, visando a melhor condição de vida do paciente DRC.

As pesquisadoras já estudaram a técnica com reagentes comerciais e para a validação necessitam de amostras biológicas de pessoas saudáveis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram anexados

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento

Endereço: Rua Pedro Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -**



Continuação do Parecer: 1.230.000

da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e promoção de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de promoção de prazo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS).

Considerações Finais a critério do CEP:

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa, tanto o participante como o pesquisador deverão rubricar todas as páginas do TCLE, opondo assinaturas na última página do referido Termo (Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Ofício Encaminhamento Ata Aprovação Projeto.jpg	13/08/2015 17:11:11		Aceito
Outros	Ata de Aprovação.jpg	13/08/2015 17:11:43		Aceito
Outros	Análise de Mérito.jpg	13/08/2015 17:11:56		Aceito
Outros	Declaração de Concordância.jpg	13/08/2015 17:12:21		Aceito
Outros	Termo de Confidencialidade.jpg	13/08/2015 17:12:51		Aceito

Endereço: Rua Pedro Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.080-340

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7250

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.230.000

Outros	Declaração de Tomar Público os Resultados.jpg	13/08/2015 17:13:14		Acelto
Outros	Declaração de Uso específico de material.jpg	13/08/2015 17:13:35		Acelto
Outros	Termo de compromisso para início da pesquisa.jpg	13/08/2015 17:13:55		Acelto
Outros	Termo de guarda de material biológico.jpg	13/08/2015 17:14:13		Acelto
Outros	Termo de compromisso para utilização de dados de arquivo.jpg	13/08/2015 17:14:37		Acelto
Outros	Check List Carta.pdf	13/08/2015 17:15:23		Acelto
Outros	Ofício do Pesquisador Encaminhando Projeto.jpg	14/08/2015 15:04:50		Acelto
Outros	Concordância dos Serviços Envolvidos.jpg	14/08/2015 15:05:07		Acelto
Folha de Rosto	Folha de Rosto Carta J R Dolega.pdf	14/08/2015 15:04:25		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Corrigido_01_09_2015.docx	01/09/2015 15:17:14	CARLA JULIANA RIBEIRO DOLENGA	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Corrigido_01_09_2015.docx	01/09/2015 15:18:09	CARLA JULIANA RIBEIRO DOLENGA	Acelto
Outros	Itens_Corrigidos_01_09_15.docx	01/09/2015 15:19:00	CARLA JULIANA RIBEIRO DOLENGA	Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_567125.pdf	01/09/2015 15:19:28		Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 16 de Setembro de 2015

Assinado por:
Claudia Seely Rocco
(Coordenador)

Endereço: Rua Pedro Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-340

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3380-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

APÊNDICE 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Lia Sumie Nakao e Carla Juliana Ribeiro Dolenga, professora e aluna de pós-graduação da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, estudante, funcionário ou professor do Setor de Ciências Biológicas da UFPR para participar voluntariamente de um estudo intitulado **Plataforma baseada em HPLC para determinação de toxinas urêmicas em amostras biológicas**. Esta pesquisa pretende identificar e quantificar toxinas urêmicas em amostras biológicas simultaneamente. A importância deste estudo está relacionada a intervenções terapêuticas e acompanhamento da progressão de pacientes doentes renais crônicos.

a) O objetivo desta pesquisa é padronizar uma metodologia baseada em HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, *high-performance liquid chromatography*) para determinar toxinas urêmicas em soro, plasma e urina.

b) Caso você participe da pesquisa, será necessário possuir mais de 18 anos, não ser paciente doente renal crônico, não ser acometido de diabetes mellitus, malignidades, infecções recentes, anemia, hepatite, epilepsia, reumatismo, problemas nervosos, hepáticos, respiratórios, HIV e outras doenças.

c) Para tanto você deverá comparecer as 11 horas, na terça-feira, no Laboratório de Patologia Redox, localizado no Departamento de Patologia Básica, no Setor de Ciências Biológicas da UFPR, para coleta de sangue da veia, que será realizada pela profissional habilitada, Larissa Morato Luciani Richter, CRF/PR 21.012, o que levará aproximadamente 10 minutos.

d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado ao momento da coleta de sangue da veia. Serão coletados 8 ml de sangue de seu antebraço.

e) Os benefícios esperados com essa pesquisa são intervenções terapêuticas e acompanhamento da progressão de pacientes doentes renais crônicos. Nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

f) As pesquisadoras Lia Sumie Nakao e Carla Juliana Ribeiro Dolenga, responsáveis por este estudo poderão ser localizados no Departamento de Patologia Básica, do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, no Laboratório de Patologia Redox, localizado no campus Centro Politécnico, através dos e-mails: lia.nakao@ufpr.br e carla.vet10@gmail.com, fone (41) 3361-1760, no horário comercial, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

g) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

h) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como pesquisadores e orientadores. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que **a sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade**.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal [rubrica]
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE [rubrica]
 Orientador [rubrica]

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do Setor de Ciências da
 Saúde/UFPR.
 Parecer CEP/SD-PB.nº 1230685
 na data de 16/09/2015. *JV*

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | térreo |
 Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 | cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259

i) O material obtido – amostras biológicas como soro, plasma e urina – serão utilizados unicamente para essa pesquisa e será destruído/descartado em lixo apropriado para material de risco biológico ao término do estudo, dentro de 4 (quatro) anos.

j) As despesas necessárias para a realização da pesquisa como materiais destinados a coleta de sangue e profissional capacitado, não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação

k) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

l) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, ____ de _____ de 2015.

Assinatura do Participante de Pesquisa

Carla Juliana Ribeiro Dolenga – Mestranda

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 1230685
na data de 16/09/2015 *m*