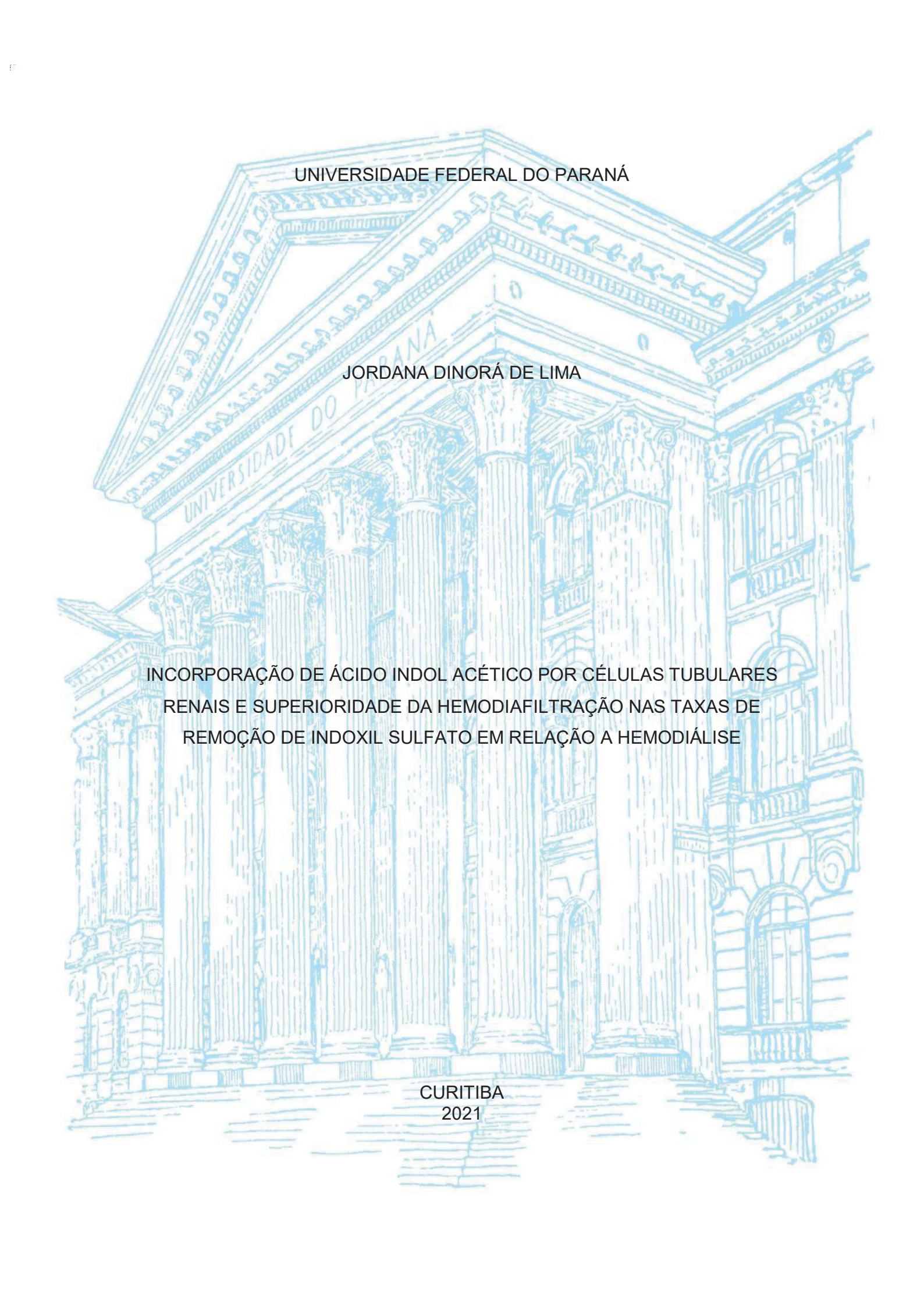




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JORDANA DINORÁ DE LIMA

INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO POR CÉLULAS TUBULARES
RENAIS E SUPERIORIDADE DA HEMODIAFILTRAÇÃO NAS TAXAS DE
REMOÇÃO DE INDOXIL SULFATO EM RELAÇÃO A HEMODIÁLISE

CURITIBA
2021

JORDANA DINORÁ DE LIMA

INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO POR CÉLULAS TUBULARES
RENAIS E SUPERIORIDADE DA HEMODIAFILTRAÇÃO NAS TAXAS DE
REMOÇÃO DE INDOXIL SULFATO EM RELAÇÃO A HEMODIÁLISE

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e
Molecular, no Curso de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.

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

Co-orientadora: Dr^a. Silvia Daniéle Rodrigues

CURITIBA
2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Lima, Jordana Dinorá de.

Incorporação de ácido indol acético por células tubulares renais e superioridade da hemodiafiltração nas taxas de remoção de indoxil sulfato em relação a hemodiálise. / Jordana Dinorá de Lima. – Curitiba, 2021.
60 f. : il.

Orientadora: Lia Sumie Nakao.

Coorientadora: Silvia Daniéle Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Hemodiálise. 2. Uremia. 3. Toxinas. 4. Doença renal. I. Título. II. Nakao, Lia Sumie. III. Rodrigues, Silvia Daniéle. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 617.461059

ATA Nº484

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

No dia trinta de abril de dois mil e vinte e um às 08:30 horas, na sala online, defesa remota, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **JORDANA DINORÁ DE LIMA**, intitulada: **INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO POR CÉLULAS TUBULARES RENAI ESUPERIORIDADE DA HEMODIAFILTRAÇÃO NAS TAXAS DE REMOÇÃO DE INDOXILSULFATO EM RELAÇÃO A HEMODIÁLISE**, sob orientação da Profa. Dra. LIA SUMIE NAKAO. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: LIA SUMIE NAKAO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), GLAUCIA REGINA MARTINEZ (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), PATRICIA MORIEL (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós- Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LIA SUMIE NAKAO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 30 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica

05/05/2021 11:25:20.0

LIA SUMIE NAKAO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/05/2021 13:41:29.0

GLAUCIA REGINA MARTINEZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

20/05/2021 16:47:38.0

PATRICIA MORIEL

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JORDANA DINORÁ DE LIMA** intitulada: **INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO POR CÉLULAS TUBULARES RENAIS ESUPERIORIDADE DA HEMODIAFILTRAÇÃO NAS TAXAS DE REMOÇÃO DE INDOXILSULFATO EM RELAÇÃO A HEMODIÁLISE**, sob orientação da Profa. Dra. LIA SUMIE NAKAO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica

05/05/2021 11:25:20.0

LIA SUMIE NAKAO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/05/2021 13:41:29.0

GLAUCIA REGINA MARTINEZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

20/05/2021 16:47:38.0

PATRICIA MORIEL

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)

Dedico este trabalho à minha mãe, Márcia e
minha irmã, Thaiza. Pelo apoio inesgotável e amor
sem igual ao qual tenho o prazer de compartilhar todos os dias.

Sem vocês, nada disso seria possível!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Lia Sumie Nakao, pelo acompanhamento, orientação e oportunidade em adentrar o mundo científico.

Ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná pelo apoio recebido.

Ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela compreensão e auxílio dedicados.

Aos Professores Dr. Silvio Zanata, Dr^a. Adriana Mercadante e Dr. Breno Beirão, pelo uso dos equipamentos, convívio amistoso e inspiração como profissionais.

Ao Professor Dr. Marcel Ramirez, pelas conversas, pelo apoio e exemplo de humanidade em pessoa.

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Lucas Menezes, por ser sempre muito prestativo e me salvar em inúmeras situações.

À minha coorientadora, Dr^a. Silvia Daniéle Rodrigues, por ser meu braço direito e absolutamente todas as práticas de bancada e pelo exemplo de ser humano.

Aos colegas de laboratório, Pierina, Sze, Soraia, Ingrid, Natália, Eduardo, Fernanda, Lana e Carla pelo convívio sempre amistoso e colaborações inúmeras científicas e humanas.

Aos ICs do laboratório, Gisele, Emily, Tassiana, Sabrina, Heitor e Júlia, pelo companheirismo, amizade e oportunidades de experiências docentes e discentes.

As amigas que fiz nesse período, Izadora, Bruna, Maria Alice e Roberta, pelas melhores conversas, risadas e conselhos da vida.

À minha família, mamãe e Thata, pelo apoio e parceria eternos, mesmo em tempos de *home office* pesados durante a pandemia. Que essa Santíssima Trindade seja abençoada!

Finalmente, mas não menos importante, aos meus filhos de quatro patas, Macchu, Picchu, Bóris, Baltazar, Bob e Baunilha, pela diversão, carinho e afagos durante as sessões de estudo e na vida.

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) possui como uma de suas principais manifestações fisiopatológicas a uremia, caracterizada pelo acúmulo de metabólitos, como as toxinas urêmicas ligadas à proteínas (PBUT). Algumas PBUT, como indoxil sulfato (IxS), p-Cresil sulfato (pCS) e o ácido indol acético (IAA) já foram associadas com maior taxa de mortalidade na DRC, além de efeitos celulares: pró-fibróticos, pró-oxidantes e pró-senescentes. Dessa forma, há a necessidade de elucidar os mecanismos de excreção destes compostos tanto de forma fisiológica, quanto de forma artificial. Quanto à excreção fisiológica, sabe-se que os transportadores de ânions orgânicos (OAT) têm papel essencial, embora os fatores bioquímicos que alteram a cinética da captação e eliminação não estejam completamente esclarecidos. Quanto à excreção artificial, a hemodiálise (HD) é pouco eficiente na remoção das PBUT, pois estas encontram-se majoritariamente associadas à albumina. A hemodiafiltração (HDF), por adicionar o processo de convecção durante a filtração das toxinas, parece ser mais eficiente em eliminar PBUT. Para investigar estes problemas, neste trabalho (i) caracterizamos a incorporação de IAA por células tubulares renais *in vitro* e o papel da albumina na viabilidade celular e (ii) comparamos HD e HDF, ao longo de 6 meses, quanto à eficiência na taxa de remoção de IxS, pCS e IAA. Os resultados mostraram que a incorporação do IAA pelas células tubulares ocorre de forma dose-dependente, e que a presença de 4% albumina garante uma maior viabilidade celular, quando comparado com 0,4% albumina. Este dado corrobora a ideia de que apenas a fração de IAA não associada à albumina é incorporada através de transportadores celulares, exercendo efeitos citotóxicos no meio intracelular. Os dados também mostraram que a terapia HDF é superior na remoção de IxS e pCS em comparação à HD, tanto após 3 quanto após 6 meses. Acredita-se que a grande associação das mesmas à albumina facilite a remoção; além disso, dentro da HDF, a remoção é ainda melhor com volumes convectivos (VC) superiores a 27.5 L por sessão. Portanto, a excreção fisiológica de IAA está associada a atividade de transportadores, provavelmente os OAT, sendo seus efeitos citotóxicos dependentes dessa incorporação. Já a excreção artificial de IxS e pCS é melhor alcançada através da técnica de HDF, sendo as toxinas mais fortemente associadas as mais eliminadas por esta técnica. A elucidação dos mecanismos de excreção das toxinas pode contribuir para um melhor entendimento da DRC, auxiliar na escolha de tratamentos dialíticos e, potencialmente, colaborar para uma maior sobrevida de pacientes acometidos pela doença.

Palavras-chave: Hemodiálise, Hemodiafiltração, Uremia, Toxinas urêmicas ligadas à proteína, Incorporação celular.

ABSTRACT

One of the main pathophysiological manifestations of chronic kidney disease (CKD) is uremia, characterized by the accumulation of metabolites, such as protein-bound uremic toxins (PBUT). Some PBUTs, such as indoxyl sulfate (IxS), p-Cresyl sulfate (pCS) and indole acetic acid (IAA) have already been associated with a higher mortality rate in CKD, in addition to cellular effects: pro-fibrotic, pro-oxidants and pro -senescent. Thus, there is a need to elucidate the mechanisms of excretion of these compounds both physiologically and artificially. As for physiological excretion, it is known that organic anion transporters (OAT) have an essential role, although the biochemical factors that alter the uptake and elimination kinetics are not completely understood. As for artificial excretion, hemodialysis (HD) is inefficient in removing PBUTs, as they are mostly associated with albumin. Hemodiafiltration (HDF), by adding the convection process during the filtration of toxins, seems to be more efficient in eliminating PBUT. To investigate these problems, in this work (i) we characterized the incorporation of IAA by renal tubular cells in vitro and the role of albumin in cell viability and (ii) we compared HD and HDF, over 6 months, regarding the efficiency in the rate of removal of IxS, pCS and IAA. The results showed that the incorporation of IAA by tubular cells occurs in a dose-dependent manner, and that the presence of 4% albumin guarantees greater cell viability, when compared to 0.4% albumin. This data corroborates the idea that only the fraction of IAA not associated with albumin is incorporated through cellular transporters, exerting cytotoxic effects in the intracellular environment. The data also showed that HDF therapy is superior in removing IxS and pCS compared to HD, both after 3 and after 6 months. It is believed that their great association with albumin facilitates removal; in addition, within the HDF, removal is even better with convective volumes (VC) greater than 27.5 L per session. Therefore, the physiological excretion of IAA is associated with the activity of transporters, probably OAT, and their cytotoxic effects are dependent on this incorporation. The artificial excretion of IxS and pCS is best achieved through the HDF technique, with the most strongly associated toxins being the most eliminated by this technique. The elucidation of the toxin excretion mechanisms can contribute to a better understanding of CKD, assist in the choice of dialysis treatments and, potentially, contribute to a longer survival of patients affected by the disease.

Keywords: Hemodialysis, Hemodiafiltration, Uremia, Protein-bound uremic toxins, Cellular incorporation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MECANISMO DE INTERNALIZAÇÃO DE ÂNIONS ORGÂNICOS.....	5
FIGURA 2. MICROGRAFIA DE CÉLULAS MM55.K EM CULTURA.....	7
FIGURA 3. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO.....	12
FIGURA 4. VIABILIDADE CELULAR.	14
FIGURA 5. VIABILIDADE CELULAR NA PRESENÇA DE ALBUMINA (0,4 e 4%)	16
FIGURA 6. DINÂMICA DE INCORPORAÇÃO DE IAA	18
FIGURA 7. ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DAS TERAPIAS DE DIÁLISE HD E HDF	22
FIGURA 8. ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO.	26
FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO DA DINÂMICA NAS CONCENTRAÇÕES DE PBUT DURANTE O TRATAMENTO DIALÍTICO EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS	28
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO DO DESENHO EXPERIMENTAL UTILIZADO NO PROJETO HDFIT.....	30
FIGURA 11. CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS ANÁLISE DE PLASMAS URÊMICOS.....	35
FIGURA 12. CONCENTRAÇÕES DAS TOXINAS AO LONGO DO TEMPO EM AMBOS OS TRATAMENTOS	38
FIGURA 13. VARIAÇÃO MÉDIA DAS TOXINAS AO LONGO DO TEMPO.	39
FIGURA 14. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE TOXINAS EM HDF E EM SEUS SUBGRUPOS (BAIXO E ALTO VOLUME CONVECTIVO – VC).....	41
FIGURA 15. RESUMO GRÁFICO DA VARIAÇÃO TOXINAS URÊMICAS DE ACORDO COM A TERAPIA DIALÍTICA EMPREGADA	42
FIGURA 16. DETALHAMENTO DOS MÉTODOS DE HPLC UTILIZADAS NESTE TRABALHO.....	57
FIGURA 17. DETALHAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZADA PARA ANÁLISES EM PLASMA.....	59
FIGURA 18. DETALHAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZADA PARA ANÁLISES EM EXTRATOS CELULARES	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. DETALHAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE INCORPORAÇÃO.....	10
TABELA 2. DETALHAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DOS PLASMAS	33
TABELA 3. DESCRITIVO DE AMOSTRAS ANALISADAS	37
TABELA 4. CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE CADA TOXINA EM AMBOS OS GRUPOS EXPERIMENTAIS	38
TABELA 5. VARIAÇÃO NAS TAXAS DE REMOÇÃO DE HDF EM RELAÇÃO À HD ENTRE TOXINAS ENTRE	40
TABELA 6. DESCRITIVO DETALHADO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE UTILIZADOS.	58

LISTA DE SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino, do inglês bovine serum albumin
Da	Dáltons
DMEM	Meio de cultivo celular, do inglês Dulbecco's modified eagle medium
DRC	Doença Renal Crônica
HD	Hemodiálise
HDF	Hemodiafiltração
HDFIT	Projeto de análise do impacto da <u>H</u> emod <u>ia</u> fil <u>tr</u> ação na atividade física de pacientes renais
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês high performance liquid chromatography
IAA	Ácido indol acético
IxS	Indoxil sulfato
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pCS	p-Cresil sulfato
Pen-Strepto	Antibiótico combinado de penicilina e estreptomicina
OAT1	Transportador de ânions orgânicos, do inglês organic anion transporter
SFB	Soro fetal bovino
TFG	Taxa de filtração glomerular
TRS	Terapias renais substitutivas
VC	Volume convectivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVO GERAL	3
1.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
2. CAPÍTULO 1: INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO POR CÉLULAS TUBULARES PROXIMAIS	4
2.1. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.2 . MATERIAL E MÉTODOS	7
2.2.1. CULTURA CELULAR.....	7
2.2.2. MTT	8
2.2.3. INCORPORAÇÃO CELULAR das PBUT	9
2.2.5. COLETA E PREPARO DOS EXTRATOS CELULARES.....	9
2.2.6. CURVA DE CALIBRAÇÃO E ANÁLISE DE EXTRATOS CELULARES.....	10
2.2.7. NORMALIZAÇÃO	12
2.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	13
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
2.3.1. IAA NÃO AFETA VIABILIDADE DE CÉLULAS TUBULARES PROXIMAIS RENAIIS.....	14
2.3.2. EFEITOS DO IAA NA VIABILIDADE SÃO INFLUENCIADOS PELA CONCENTRAÇÃO DA ALBUMINA	15
2.3.3. IAA PARECE SER INCORPORADO DE FORMA DOSE DEPENDENTE	17
3. CAPÍTULO 2: COMPARAÇÃO ENTRE HD E HDF NAS CONCENTRAÇÕES PRÉ-DIÁLISE DE IXS, PCS E IAA.....	21
3.1. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.2.1. DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
3.2.2. COLETA DE AMOSTRAS.....	31
3.2.3. PREPARO DOS PLASMAS	32
3.2.4 CURVA DE CALIBRAÇÃO E ANÁLISE DOS PLASMAS.....	32

3.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	SUMÁRIO	36
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		37
3.3.1 DESCRIÇÃO DO GRUPO TESTADO		37
3.3.2 HDF PERMITE UMA RETIRADA MAIS EFICIENTE DE IXS		38
3.3.3. EFICIÊNCIA DE HDF PARECE ESTAR ASSOCIADA AO VOLUME CONVECTIVO.		40
4. CONCLUSÕES.....		44
REFERÊNCIAS.....		46
ANEXO 1 – DETALHAMENTO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS 57		
ANEXO 2 – DETALHAMENTO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS.....		59

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) tem como um de seus fenômenos fisiopatológicos o acúmulo de metabólitos, também chamada de uremia ou síndrome urêmica (Meyer and Hostetter, 2007), caracterizada pelo acúmulo de substâncias tóxicas que não são eficientemente removidas pelos rins, as quais podem atingir mais de 20 vezes as concentrações de um indivíduo saudável (Duranton, Cohen, De Smet, *et al.*, 2012). Essas substâncias são chamadas de toxinas urêmicas. Entre elas as toxinas urêmicas ligadas à proteínas (PBUT) tais como indoxil sulfato (IxS), p-Cresil sulfato (pCS) e o ácido indol acético (IAA) são de maior interesse de estudo. Estas substâncias possuem tamanhos pequenos (<500 Da - Vanholder *et al.*, 2004) e grande afinidade por proteínas plasmáticas (60-98%) (Meert *et al.*, 2010; Itoh *et al.*, 2012; Snauwaert, Holvoet, *et al.*, 2019), principalmente albumina (Sirich *et al.*, 2014), adquirindo tamanhos muito maiores, quando associadas. Também, ao serem acumulados, as PBUT possuem diversos efeitos deletérios para as células e tecidos, tais como disfunção vascular (Brunet *et al.*, 2011) aumento do estresse oxidativo (Dou *et al.*, 2007), e prejuízos ao funcionamento mitocondrial (Mutsaers *et al.*, 2013). Finalmente, o próprio acúmulo de toxinas promove o incremento da fibrose renal, contribuindo para a progressão da doença renal (Niwa and Shimizu, 2012).

. As PBUT vêm sendo associadas ao desenvolvimento da doença cardiovascular (Lekawanvijit *et al.*, 2012; Tonelli, Karumanchi and Thadhani, 2016), desde a aterosclerose até eventos trombóticos (Da Cunha *et al.*, 2020). Essa associação é importante já que a taxa de acometimento cardiovascular é 3 vezes maior em pessoas com DRC em comparação a pessoas que não possuem a doença (Provenzano *et al.*, 2019), sendo a principal causa de morte nestes pacientes. Portanto, é de interesse clínico a elucidação dos mecanismos de remoção das PBUT, tanto de maneira natural ou fisiológica, quanto de maneira artificial, através das terapias renais substitutivas (TRS).

A excreção fisiológica é comprometida na DRC, pois há a formação de um tecido fibrótico em resposta à injúria – tanto crônica, quanto aguda - ao tecido renal (Liu, 2004),

que se torna, conseqüentemente, afuncional. Essa fibrose compromete, entre outros, o funcionamento dos transportadores responsáveis pela excreção das PBUT, os transportadores de ânions orgânicos (OAT), já apontados como fundamentais para a excreção de IxS (Favretto *et al.*, 2017), pCS (Miyamoto *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2014; Favretto *et al.*, 2017), o ácido hipúrico (Deguchi *et al.*, 2004, 2005) e até mesmo do IAA em experimentos com hemácias (Deltombe *et al.*, 2019). O IAA, em especial, é responsável por efeitos adversos relacionados ao comprometimento cardiovascular, já descrito para células endoteliais (Dou *et al.*, 2015), ativação de vias pró-inflamatórias (Brito *et al.*, 2019), comprometendo significativamente a produção energética celular (Mutsaers *et al.*, 2013). Embora estes estudos sugerem uma participação ativa dos OAT na excreção do IAA, a captação do IAA por células tubulares proximais renais, onde efetivamente é excretado, ainda não está elucidada.

Após o comprometimento da função renal, as TRS são prescritas para mimetizar a função filtradora dos rins. Nesse sentido, a hemodiálise (HD) é a mais conhecida e utilizada em larga escala no Brasil, sendo responsável pelo tratamento de 92,3% dos pacientes renais no país e financiada majoritariamente (80 %) pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Neves *et al.*, 2020). Apesar da popularidade da HD, uma técnica mais recente, a hemodiafiltração (HDF) tem se mostrado mais eficiente em filtrar moléculas maiores, como a β 2-microglobulina. Também, HDF já foi associada a maiores taxas de sobrevida (Canaud *et al.*, 2006; Grooteman *et al.*, 2012; Ok *et al.*, 2013; Nubé *et al.*, 2017) e maior disposição física de pacientes (Pecoits-Filho *et al.*, 2019) em comparação com a HD. Há a especulação de que os efeitos clínicos observados são resultantes de uma melhor remoção das PBUT pela HDF.

HD e HDF são técnicas ligeiramente diferentes. Brevemente, enquanto que HD utiliza da difusão para retirada dos metabólitos do sangue, a HDF utiliza além dessa última, a ultrafiltração, proporcionando um fluxo convectivo, que promete ser mais eficiente para retirada de moléculas maiores. Realmente, a HDF já se mostrou eficiente quanto à remoção de moléculas de tamanho médio (>500 Da) em comparação à HD (Lornoy *et al.*, 2000; Patrier *et al.*, 2013), no entanto, não ofereceu grandes vantagens na remoção de moléculas pequenas (Gonzalez-Parra *et al.*, 2014). Nesse âmbito, há

dúvidas sobre a eficiência da HDF na remoção de moléculas de comportamento variável (Meert *et al.*, 2011; Pedrini *et al.*, 2011; Snauwaert, Van Biesen, *et al.*, 2019; van Gelder *et al.*, 2020), como as PBUT, ora livres, ora associadas a proteínas, em comparação à HD. Além disso, estudos que buscam descrever este fenômeno são frequentemente pequenos em número de pacientes ou curtos em seguimento (sessões ou semanas) (Krieter *et al.*, 2010, 2019; Meert *et al.*, 2010). Também, as populações acompanhadas são de idades diferentes dos geralmente afetados – população idosa (Snauwaert, Van Biesen, *et al.*, 2019) e/ou os desenhos experimentais não incluem a alocação aleatória dos pacientes nos respectivos tratamentos (Shroff *et al.*, 2019; Snauwaert, Van Biesen, *et al.*, 2019).

1.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho se propôs a investigar as PBUT no contexto da DRC a partir de duas frentes principais:

- (i) investigar os mecanismos de excreção de forma fisiológica de IAA em células tubulares renais proximais e;
- (ii) comparar as estratégias para a remoção artificial HD e HDF para a remoção de IxS, pCS e IAA.

1.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para tanto, pretendemos:

- (i) A. investigar a incorporação de IAA em células tubulares proximais renais;
B. avaliar o efeito da albumina durante a exposição a IAA sobre a viabilidade celular
- (ii) A. comparar os métodos dialíticos HD e HDF quanto à eficiência de remoção de IxS, pCS e IAA de 195 pacientes randomizados ao longo de 6 meses;
B. Dentro de HDF, comparar o impacto do volume convectivo na eficiência de remoção.

2. CAPÍTULO 1: INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO POR CÉLULAS TUBULARES PROXIMAIS

2.1. REVISÃO DE LITERATURA

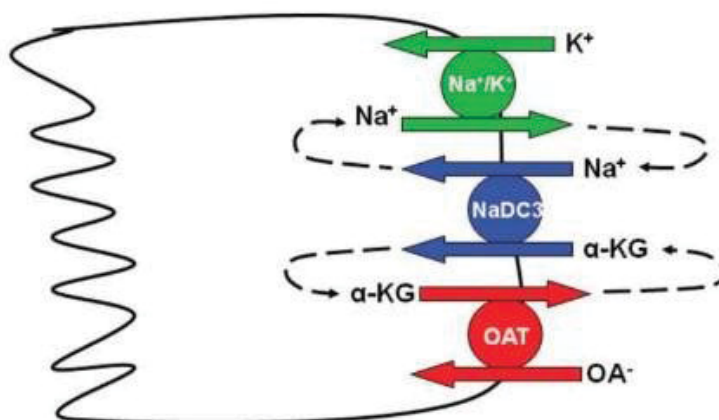
Os rins fazem parte do sistema excretor, responsável majoritariamente pela retirada dos metabólitos presentes no sangue através da produção da urina. Pacientes portadores da DRC possuem os tecidos renais afuncionais, porém parte dos pacientes possuem função renal residual, ou seja, ainda produzem urina (Lowenstein and Grantham, 2017). Mesmo com a filtração de alguns metabólitos de forma desorganizada após o diagnóstico da DRC, ainda há a acumulação de diversos metabólitos, incluindo as toxinas urêmicas (Vanholder *et al.*, 2003b). Estas compõem o grupo de substâncias advindas do metabolismo de aminoácidos pela microbiota intestinal. Dessa forma, a concentração e diversidade de toxinas urêmicas num dado indivíduo depende tanto da riqueza de proteínas na dieta, quanto da diversidade bacteriana da microbiota individual (Joossens *et al.*, 2018), o que contribui para a grande variabilidade entre os compostos e também dificulta o estabelecimento de intervalos considerados normais nas análises clínicas. Reciprocamente, a uremia é apontada como grande alteradora da diversidade da microbiota, principalmente diminuindo a abundância de famílias bacterianas (Vaziri *et al.*, 2013).

A excreção dos metabólitos conta com a participação importante de transportadores de membrana presentes na membrana das células tubulares proximais renais (Nawata and Pannabecker, 2018). O transporte de cátions e ânions orgânicos, sejam eles endo ou exógenos, é realizado por transportadores de duas grandes famílias: os carregadores de soluto (SLC) e os cassetes ligadores de ATP (ABC) (Roth, Obaidat and Hagenbuch, 2012). Para o transporte das toxinas urêmicas, a família gênica SLC é de extrema importância, principalmente no que se refere aos transportadores de ânions orgânicos (OAT) (Sekine, Miyazaki and Endou, 2006).

A partir de análises metabolômicas, os transportadores OAT1 (codificado pelo gene SLC22A6) (Wikoff *et al.*, 2012) e OAT3 (codificado pelo gene SLC22A8) (Bush *et al.*, 2017) foram apontados como responsáveis pela internalização de metabólitos da

microbiota intestinal, tais como as toxinas urêmicas. Os transportadores OAT1 e OAT3 estão localizados na membrana basolateral das células nos túbulos proximais renais (Cha et al. (2001) e Kojima et al. (2002). No entanto, a entrada de toxinas nas células tubulares proximais não depende exclusivamente da atividade dos OATs. É sugerido que a entrada das TU ocorra através da ativação de um sistema em tríade (Fig. 1). Primeiramente, a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ forma um gradiente de sódio que é utilizado para a internalização do α -cetoglutariado (α -KG) pelos transportadores simporte Na/dicarboxilatos (Steffgen *et al.*, 1999); a formação do gradiente de α -KG permite a entrada dos ânions orgânicos por transporte antiporte nos OAT (Race *et al.*, 1999).

FIGURA 1. MECANISMO DE INTERNALIZAÇÃO DE ÂNIONS ORGÂNICOS. Os OAT são chamados de “tertiary active” já que necessitam da atividade de outros dois transportadores para serem ativados



FONTE: Modificada de Roth et. al, 2012.

A expressão gênica de OAT1 e OAT3 é diminuída em estado diabético; consequentemente, uma menor quantidade de metabólitos foi encontrada na urina de doentes renais que apresentavam diagnóstico prévio de diabetes mellitus (Sharma et al., 2013), o que corrobora o desenvolvimento da síndrome urêmica. Também, a administração de p-aminohipurato (PAH) causa deterioração, observada por imunohistoquímica, dos transportadores OAT1, OAT3 e $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ nas células dos túbulos proximais renais (Crljen et al., 2005).

Já foi demonstrado que o IxS é internalizado através dos transportadores OAT (Favretto *et al.*, 2017). Outros parceiros moleculares já foram descritos como ligantes dos transportadores OAT, em especial OAT1, principalmente substâncias ligados ao metabolismo de fase II (realizado primeiramente no intestino e após no fígado) tais como: fenil sulfato, p-aminocresol sulfato e phenilacetilglicine (Wikoff *et al.*, 2012). Em experimentos com camundongos *knockout* para receptores OAT, outros compostos semelhantes estruturalmente ao IAA (como por exemplo: indol acetato, indol lactato e 2-oxindol-3-acetato) foram apontados como possíveis ligantes de OAT, dessa vez OAT3, (Wu, Bush and Nigam, 2017). Embora os transportadores OAT, em especial a isoforma OAT3, tenha sido apontada como intermediador da internalização da IAA em eritrócitos, até o momento, nenhum estudo demonstrou a participação dos transportadores OAT na internalização do IAA em células tubulares renais.

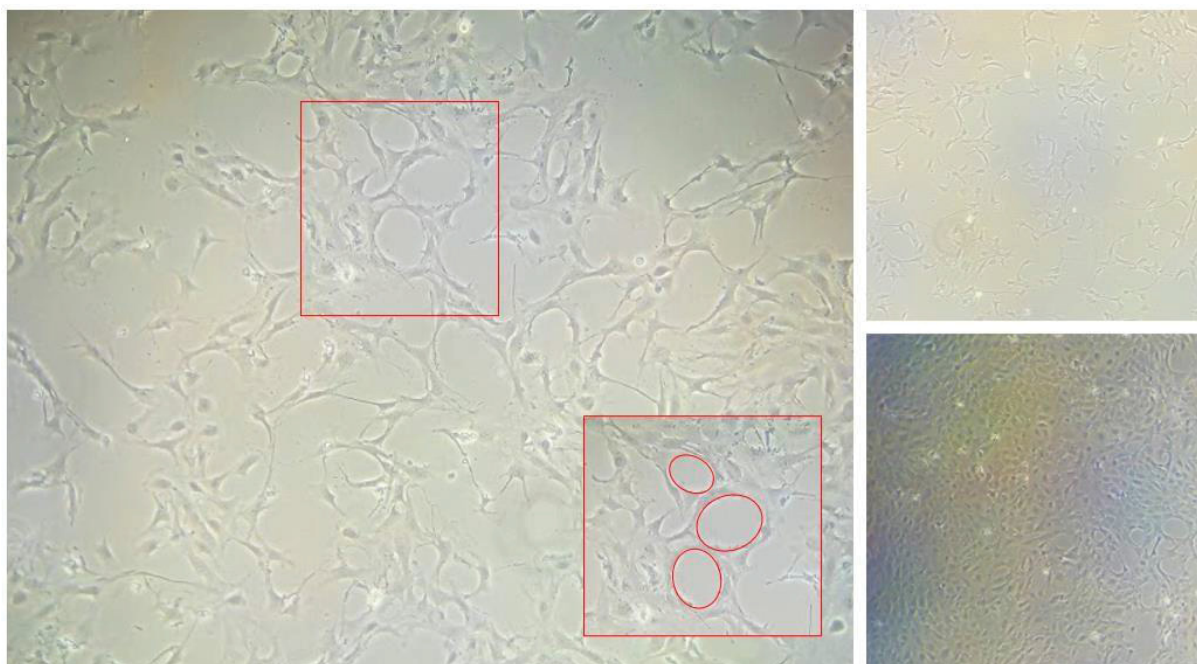
Após a incorporação, as toxinas urêmicas são capazes de se ligarem a outros compostos intracelulares para exercerem seus efeitos intracelulares (Addi *et al.*, 2019). A exposição in vitro de toxinas urêmicas já foi associada a efeitos pro-inflamatório e pro-apoptótico intracelularmente (Poveda *et al.*, 2014). Muitos efeitos relacionados ao estresse oxidativo já foram associados com a presença de toxinas urêmicas. Desde ativação de vias oxidativas, como a NF-KB, como a inibição de vias antioxidantes, como a Nrf2 (Stockler-Pinto *et al.*, 2018). Nesse sentido, já foi descrito que a exposição prévia a toxinas urêmicas aumenta a sensibilidade celular a estímulos oxidantes (Rodrigues *et al.*, 2020). Dessa forma, a participação do estresse oxidativo na DRC (Ling and Kuo, 2018) aponta para a necessidade de avaliação, especialmente, da função mitocondrial (Ratliff *et al.*, 2016). Além disso, as mitocôndrias já foram associadas tanto à produção de toxinas urêmicas quanto a alvos dos efeitos destas toxinas (Popkov *et al.*, 2019).

2.2. . MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. CULTURA CELULAR

Células MM55.K, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Tércio Teodoro Braga (Fig. 2), foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂. Foi utilizado meio DMEM alta glicose contendo 10 % de SFB e 1 % de penicilina-estreptomicina (pen-strepto, sendo pen: 10.000 unidades/ml; strepto 10,000ug/ml). Para manutenção da cultura foram utilizadas pipetas sorológicas e placas estéreis, PBS e Tripsina 0,25 %.

FIGURA 2. MICROGRAFIA DE CÉLULAS MM55.K EM CULTURA. Densidade celular próxima $1,5 \times 10^6$ células/mL e confluência próxima de 80% (esquerda). Em destaque em vermelho, canalículos formados. Estas estruturas lembram túbulos e são características da memória celular em cultura da estrutura prévia tridimensional nos túbulos proximais renais. Quadros menores mostram densidade baixa (superior direita) e alta (inferior direita).



FONTE: O autor (2021)

Células MM55.k fazem parte do tecido tubular proximal renal, são relativamente pequenas, de formato estrelado e apresentam memória celular, dessa forma a estrutura

organizacional das células apresenta pequenos canalículos lembrando túbulos. A confluência celular em 80% em p100, por exemplo, apresentava cerca de $1,5 \times 10^6$ células/mL. Assim, nos ensaios que se seguiram, a confluência de 80% foi escolhida como padrão, sendo a mesma adaptada para placas de áreas menores.

2.2.2. MTT

O ensaio de 3-(4,5 difenil) tetrazólio de brometo (MTT) foi realizado para a análise da viabilidade celular frente a exposição a toxinas urêmicas. Para tal, células MM55K foram cultivadas em placas de 96 poços em densidade próxima a 8×10^3 células/poço. No dia seguinte, as células foram tratadas, em sextuplicata, com duas concentrações de IAA (5 e 50 μ M) em meio DMEM completo e incubadas por 24 ou 48 h. Após o período determinado, as culturas tiveram seus meios substituídos por uma solução contendo 90 μ L de meio DMEM completo e 10 μ L de solução de MTT 5mg/mL em cada poço, na qual foram mantidas por 2h. Ao final, cada poço teve o meio substituído por 100 μ L de solvente DMSO, o qual foi homogeneizado por pipetagem de 2 a 3x por poço para a completa dissolução dos cristais. Os resultados de absorbância foram obtidos em leitor de microplaca à 570 nm (BioTek® synergy 2). O mesmo ensaio foi realizado na presença de BSA adicionado para comparação dos efeitos entre diferentes níveis de disponibilidade de albumina, sendo DMEM completo, já contendo 0,4% de albumina advinda do SFB (0,4%) e DMEM completo adicionado de 3,6% de BSA, totalizando 4 % (4%), visto que o IAA interage com essa proteína.

Para a melhor homogeneidade entre as replicadas, foram necessários ajustes finos neste protocolo. O protocolo utilizado normalmente para o ensaio de MTT incluía a incubação da solução de MTT em PBS e a revelação através do uso de 100 μ L uma solução mista de HCl/isopropanol (1:1000), este protocolo foi testado e substituído pela incubação em DMEM – realizado através da produção de uma solução mãe e administração por pipetagem reversa - e a dissolução dos cristais com DMSO; o novo protocolo trouxe mais homogeneidade aos dados. Também, muitos ensaios foram realizados com IxS como controle positivo de perda de viabilidade. No entanto, foi

diagnosticado posteriormente que as células só perdiam viabilidade com H₂O₂, testado inicialmente a 100 µM administrado em meio DMEM completo (10 % SFB e 1 % pen-strepto), o qual foi substituído como controle positivo do ensaio.

2.2.3. INCORPORAÇÃO CELULAR das PBUT

Células MM55.k foram plaqueadas em placas p60 na densidade 5×10^5 células por placa em meio DMEM completo (10 % SFB e 1 % pen-strepto). Em todos os experimentos a seguir, as células foram tratadas 24 h após plaqueamento, assegurando completa adesão celular.

2.2.4. VARIAÇÃO NAS CONCENTRAÇÕES DE IAA

Para avaliar a dinâmica de incorporação do IAA, primeiramente foi realizada a exposição a diferentes concentrações de IAA durante 1 hora. Dessa forma, no dia seguinte ao plaqueamento, o meio de cultivo foi substituído por meio completo contendo IAA em diferentes concentrações (0 µM, 5 µM, 50 µM, 500 µM e 1mM) ou uma única concentração de IxS (400 µM), nos quais foram mantidas por 1h.

2.2.5. COLETA E PREPARO DOS EXTRATOS CELULARES

Após o período de incubação das células com as toxinas, as placas foram lavadas 2x com PBS, e coletadas em 300 µl de PBS com o auxílio de scraper. Foi adicionado novamente mais 300 µl de PBS para coleta completa das células restantes. Após, o volume resultante de 600 µl foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos (min) para a separação do pellet celular. O sobrenadante foi aspirado e o pellet ressuspensionado em 150 µl de PBS. Essa suspensão sofreu 2 ciclos de congelamento de 30 min: -80°C por 15 min e em gelo (4°C) por 15 min. Após, foi mantido em banho seco a 96°C por 30 min, resfriado em gelo por 10 min e centrifugadas a 13000 rpm por 20 min, do qual o

sobrenadante foi filtrado com seringa de 1 ml e filtros de 0,22 mm manualmente. Os sobrenadantes filtrados foram injetados no mesmo dia, sendo que 10 uL foram separados para dosagem de proteínas.

2.2.6. CURVA DE CALIBRAÇÃO E ANÁLISE DE EXTRATOS CELULARES

Para a dosagem de toxinas nas células, foram produzidos calibradores contendo toxinas puras em água (Fig. 3 A). Algumas características desta curva incluem: a presença de duas toxinas padrão – IxS e IAA, as concentrações de IxS usadas na curva de células eram cerca de 10x mais diluída que as da curva de plasma, e similares às concentrações de IAA, para abranger melhor o intervalo nos quais as concentrações intracelulares seriam dosadas. Também, a matriz utilizada para diluição das toxinas foi água MilliQ. O padrão misto foi preparado com 6 ul de uma solução estoque 5 mM de IxS e 15 uL de uma solução estoque 200 uM de IAA, e 39 ul de água MilliQ, completando 60 ul (volume final da solução). Esta solução foi então diluída seriadamente (30 ul da solução com mais 40 ul de água) para o preparo das soluções calibradoras. As concentrações finais de IxS e IAA nas soluções calibradoras estão mostradas na tabela 1.

TABELA 1. DETALHAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE INCORPORAÇÃO. Os estoques, aqui citados, foram posteriormente diluídos 10x para produção dos “cal mix”. A produção dos “calibradores” foi realizada a partir da diluição dos cal mix em matriz de água, ou seja, os cal mix foram diluídos duas vezes em água, primeiramente em diluição seriada, e novamente em frações iguais entre os calibradores.

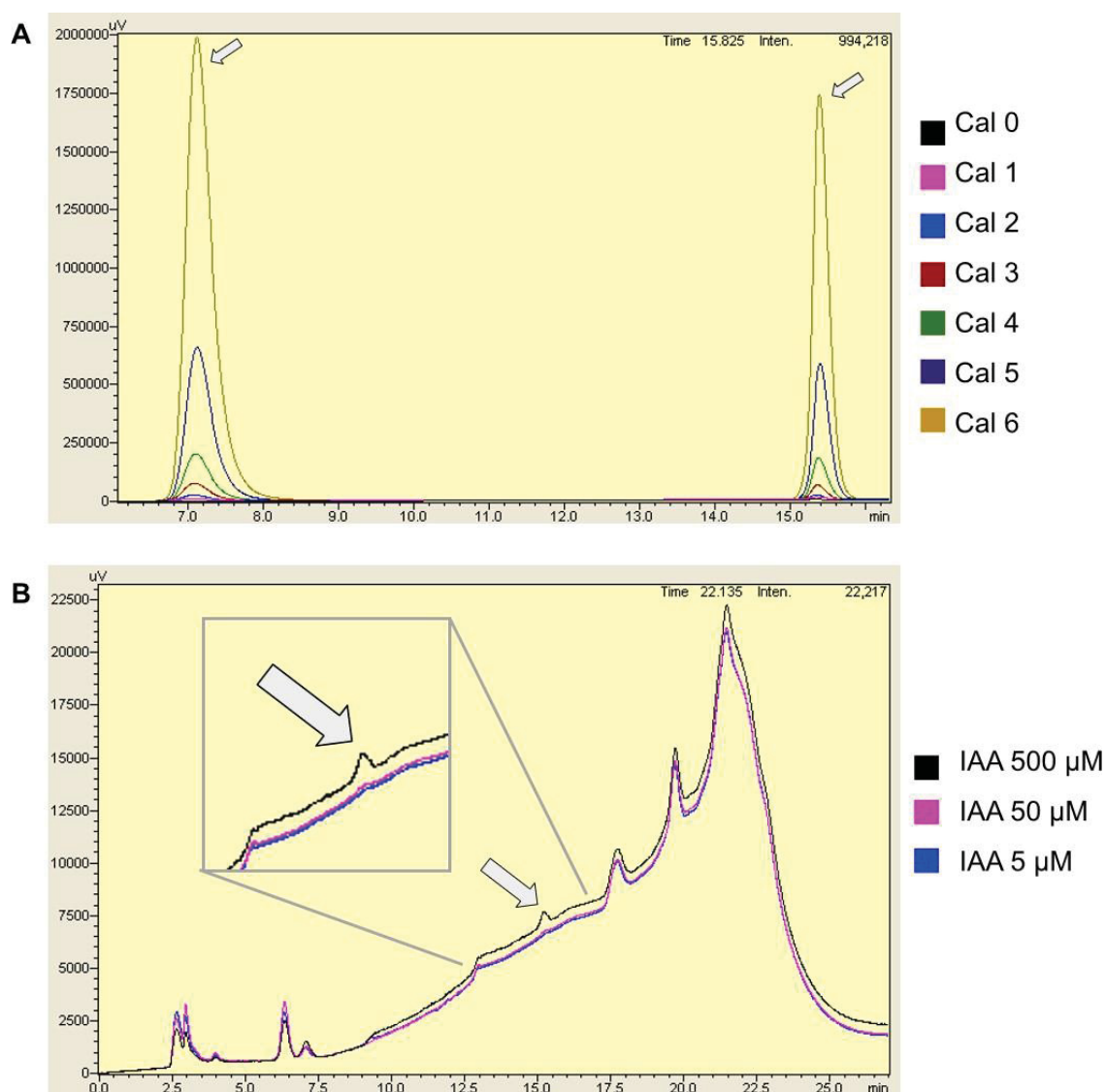
	Cal 6	Cal 5	Cal 4	Cal 3	Cal 2	Cal 1
IxS (uM)	100	33,3	11,1	3,7	1,23	0,41
IAA (uM)	100	33,3	11,1	3,7	1,23	0,41

FONTE: O autor (2020)

As dosagens de toxinas nas células também foram realizadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – Fig. 3 B). Neste caso, foi utilizado o método chamado Cell V1, previamente descrito (Dolenga, 2016). Sucintamente, a corrida leva

em torno de 27 minutos, no qual se estabelece uma rampa de concentração da fase móvel, sendo a porcentagem de metanol sendo gradativamente substituída por formiato de amônio de forma ascendente, estacionária e descendente, em sequência (ANEXO 1). Neste método, proporção inicial de fase móvel mais concentrada corresponde a formiato de amônio (75%), a qual é complementada com e metanol (25%).

FIGURA 3. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO Dos padrões autênticos e dos EXTRATOS CELULARES. A. Curva de calibração: Todos os calibradores são mistos e contém IxS e IAA, sendo que o calibrador 6 representa a quantidade injetada de 100 pmol cada. Cada calibrador subsequente possui um terço da quantidade de toxinas do anterior. A corrida completa tem duração de 27 minutos, o trecho representado é referente ao intervalo de 6 a 16 minutos B. Exemplo de análise de extrato celular após a exposição em cultura à 5, 50 e 500 μM de IAA. As setas representam os picos relativos a IxS e IAA, da esquerda para a direita, sendo em B representado apenas o IAA.



FONTE: O autor (2021)

2.2.7. NORMALIZAÇÃO

Após o processamento de todos os tratamentos citados anteriormente, as amostras (soluções analisadas pelo HPLC) tiveram as proteínas quantificadas pelo método adaptado de Bradford (1976). Especificamente, foram adicionados 100 µl de solução reagente de Bradford diluída (volume final de 1:5) em triplicada em placa de 96 poços, nas dosagens foram adicionadas 10 µl de amostra. Posteriormente a placa foi lida através de leitor de placas em 595nm. As quantidades de proteínas das amostras foram calculadas com base numa curva de calibração de quantidade de proteína conhecida (0,23; 0,46; 0,93; 1,86; 2,79 µg de BSA).

2.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

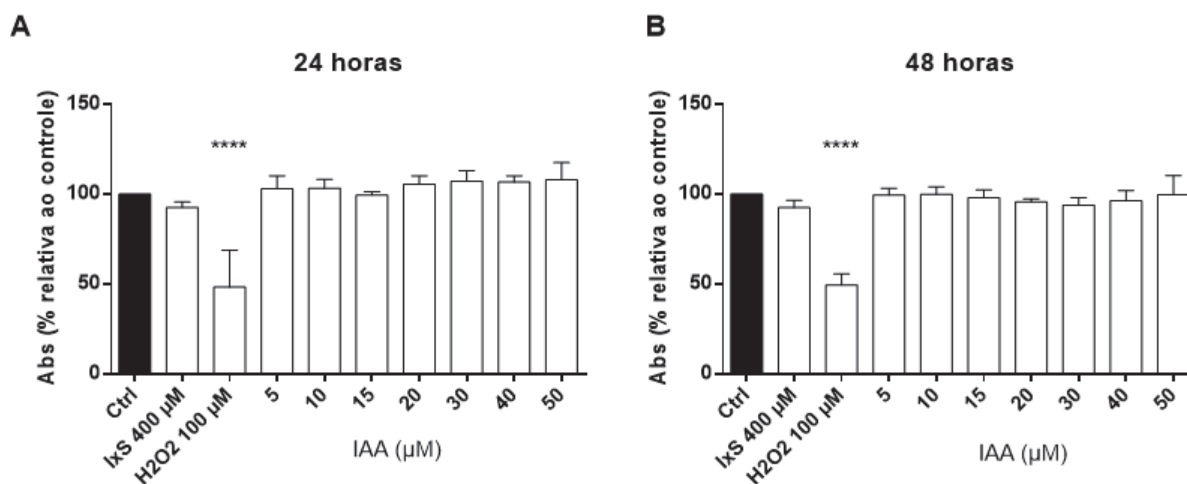
Foram empregados os testes ANOVA de uma e duas vias, juntamente com teste Tukey (também chamado de comparações múltiplas) para avaliar diferenças entre os grupos experimentais. Todas as análises foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 6.01.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. IAA NÃO AFETA VIABILIDADE DE CÉLULAS TUBULARES PROXIMAIS RENAIIS

Embora espere-se que as células proximais tubulares renais sejam resistentes a toxinas, como o IAA, já que estas células desempenham um papel fundamental na eliminação destes metabólitos, foi necessário assegurar isso para as células em cultura. Dessa forma, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo ensaio de MTT mediante exposição por 24 e 48 horas e, como esperado, nenhuma das concentrações testadas (de 0 a 50 μM de IAA) foram prejudiciais para a viabilidade das células (Fig. 4). Este resultado concorda com resultados anteriores mensurados na mesma faixa de concentração, porém com células HUVEC (Dou *et al.*, 2015).

FIGURA 4. VIABILIDADE CELULAR. Exposição a diferentes concentrações de IAA no intervalo de 5 a 50 μM , durante 24 (A) e 48 horas (B). Todos os ensaios foram realizados em DMEM completo (10% SFB, o que equivale a 0,4% BSA). A figura reúne 3 ensaios independentes ($n=3$).



FONTE: O autor (2021)

Nos gráficos é possível notar uma sutil diferença (7,12 % em média) entre os tratamentos expostos ao IAA em 24 horas e em 48 horas. Enquanto que em 24 horas, a exposição ao IAA tende a resultar num comportamento mais proliferativo (os tratamentos

de 5 a 50 μM de IAA correspondem a 104,69 % do controle), em 48 horas (os mesmos tratamentos correspondem a 97,57 % relativo ao controle), esse efeito parece ser convertido num padrão citotóxico. Esse padrão se apresenta de forma mais expressiva, embora ainda não estatisticamente significativa, na figura 5. Claro que, ensaios complementares devem ser realizados para confirmação dessas suposições. Contudo, ensaios em células HeLa apontam que a combinação de IAA com citocinas parece aumentar a morte celular e impedir a continuidade do ciclo celular (Zhao *et al.*, 2015). Em células renais, foi mostrada inibição da proliferação celular (Motojima *et al.*, 2002). Mas deve-se notar que em ambos os trabalhos, a concentração de IAA foi superior a 1 mM. Portanto, espera-se que, dentro da faixa de concentração testada, a exposição ao IAA não prejudique significativamente a viabilidade das células testadas. Como controle do ensaio, observa-se que a exposição das células a 100 μM H_2O_2 tanto por 24 e 48 horas induziu uma perda significativa da viabilidade celular.

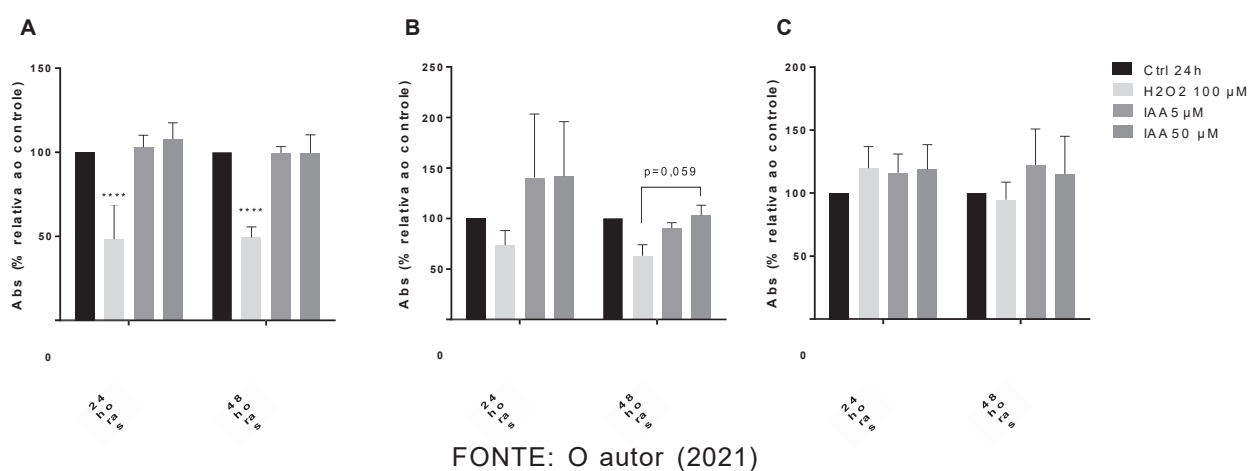
2.3.2. EFEITOS DO IAA NA VIABILIDADE SÃO INFLUENCIADOS PELA CONCENTRAÇÃO DA ALBUMINA

Devido a tendência das toxinas em associarem-se à albumina, o efeito do IAA na viabilidade celular foi analisado em duas concentrações de BSA: condições de cultura (0,4%) e condições fisiológicas (4%). Neste ensaio espera-se que a maior quantidade de albumina limite ou impeça a entrada de IAA na célula e, portanto, diminua efeitos que o IAA intracelular poderia causar. Analisando a viabilidade celular, observa-se que esta não foi significativamente alterada em 24h pela presença de mais BSA. Mas após 48h, a viabilidade das células incubadas com 4% BSA foi maior que a das células incubadas com 0.4%.

A figura 5 B, sugere efeitos opostos da exposição ao IAA, sendo proliferativos em 24 horas e citotóxicos em 48 horas, os quais não são observados em 5 C, ou seja, a presença de maior quantidade de albumina parece inibir esses efeitos. De formabastante incipiente, os mesmos efeitos podem ser observados nos painéis A e B (Figura4), ou seja, levemente proliferativos em 24 horas e levemente citotóxicos em 48 horas. Essa diferença pode ser decorrente da variabilidade experimental (replicatas técnicas:

sextuplicata – Fig. 4 vs. triplicata – Fig. 5), o menor número de replicatas diminuiu o poder estatístico das análises.

FIGURA 5. VIABILIDADE CELULAR NA PRESENÇA DE ALBUMINA (0,4 e 4%). Exposição a diferentes concentrações de IAA a 5 ou 50 μM em concomitância com 0,4% (B) ou 4% (C) de albumina. Também, uma versão resumida da figura 4 foi inserida em A, para facilitar comparações. Os tempos de exposição foram de 24 e 48 horas, representados no eixo X. Os tratamentos expostos a 0,4% de albumina, correspondem ao meio DMEM completo contendo 10% SFB. Embora os tratamentos sejam os mesmos que os expostos na figura 4, anteriormente, as replicatas biológicas não são as mesmas em B e C. A ausência de diferença estatística entre os tratamentos 0,4% BSA em 24 e 48 horas se mantém, exceto para o controle de H_2O_2 100 μM . A figura reúne 3 ensaios independentes ($n=3$). A. Repetição da fig. 4. B. 0,4% BSA C. 4% BSA.



FONTE: O autor (2021)

É possível observar uma mudança no comportamento do controle positivo (H_2O_2) na presença de maior quantidade de albumina (Fig. 5 C), acreditamos que a albumina disponível diminua os efeitos oxidativos de H_2O_2 . Nesse sentido, a carbonilação é uma modificação estrutural conhecida como uma consequência da exposição ao meio oxidativo (Fedorova, Bollineni and Hoffmann, 2013; Rodrigues *et al.*, 2020). No contexto da DRC, as PBUT já foram associadas a ativação de vias pró-oxidantes (Motojima *et al.*, 2003), sendo que o ambiente urêmico contribui para que a albumina de pacientes renais seja diferente da albumina em indivíduos saudáveis (Pieniazek *et al.*, 2018) e que este estado redox alterado e aumento da carbonilação se incrementa ao longo da progressão da DRC (Aveles *et al.*, 2010). Neste experimento não foi possível observar um efeito oxidativo das PBUT, e, portanto, nenhuma alteração deste efeito após a exposição à maior concentração de albumina.

Molecularmente, os efeitos do IAA já foram associados ao prejuízo das atividades mitocondriais, no que diz respeito à atividade diminuída da succinato desidrogenase (complexo mitocondrial II) (Mutsaers *et al.*, 2013), o que certamente prejudica a viabilidade celular. De forma complementar, o acúmulo de proteínas carboniladas decorrentes do prejuízo aos mecanismos de autofagia, também refletem os efeitos danosos da exposição de toxinas urêmicas *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 2020). Segundo Rodrigues e colaboradores (2020), a exposição do IAA em combinação com outras duas toxinas urêmicas (IxS e pCS) durante 4 horas, já é suficiente para a percepção de danos à viabilidade celular em células endoteliais humanas. Em células tubulares renais, estudadas aqui, é esperado que a fisiologia celular justifique uma resistência maior destas células em comparação com células endoteliais.

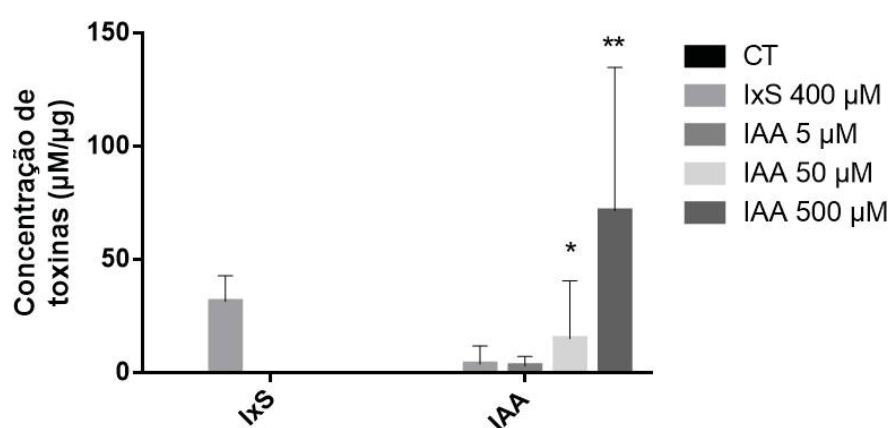
Curiosamente, a exposição ao IAA a curto prazo (24 horas) resulta em um aumento expressivo, embora não significativo, na viabilidade. Análises em células tubulares renais em linhagens primárias de origem suína descreveram que o IAA contribui para a proliferação celular (Cernaro *et al.*, 2015). Neste sentido, análises *in silico* apontam que o essa contribuição do IAA nas vias de proliferação celular (Wu *et al.*, 2020) estaria associada positivamente com a produção de fatores de células tronco. Embora não se pudesse notar uma diferença significativa da incubação da toxina com o BSA 4% ou 0,4%; resultados sugerem efeitos opostos e 24 horas e 48 horas, mesmo assim, estes achados devem ser confirmados por ensaios complementares. Dessa forma, a atuação do IAA possivelmente depende da internalização, impedida pela concentração maior de albumina. Neste cenário, a necessidade de interação com parceiros intracelulares, hipotetizado por Wu e colaboradores (2020) como o fator de transdução de sinal Janus kinase, reforça a necessidade de internalização do IAA para a efetiva atividade do mesmo.

2.3.3. IAA PARECE SER INCORPORADO DE FORMA DOSE DEPENDENTE

Após, testamos quanto ao mecanismo de incorporação do IAA. Dessa forma, hipotetizamos a entrada por receptores de membrana que promoveriam o influxo, o que retornaria um padrão de incorporação dose dependente. Para tal, expusemos as células

a concentrações de 0 a 500 μM , o que resultou num comportamento exponencial de incorporação (Fig. 6).

FIGURA 6. DINÂMICA DE INCORPORAÇÃO DE IAA. Concentração de IxS ou IAA ($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$) em extratos de células incubadas por 1h com 400 μM IxS, 5-500 μM IAA ou com veículo (CT). Todas as toxinas foram previamente diluídas em meio DMEM (10% SFB, o que equivale a 0,4% BSA) para diminuir erros relativos a pipetagem. Os valores representam média $\pm$ DP de 4 ensaios independentes ($n=4$). Sendo * $p<0,05$ ** $p<0,001$ representativo da diferença do tratamento identificado em relação a todos os demais.



FONTE: O autor (2021)

Em ensaios prévios *in vitro*, realizados em células endoteliais, a incorporação do IAA também apresentava um padrão dose-dependente (Rodrigues *et al.*, 2020). No entanto, neste caso, as quantidades incorporadas eram consideravelmente menores, sendo que a exposição a 10, 20 e 40 μM de IAA durante 4 horas resultou na incorporação de 0,51, 0,60 e 0,89 $\text{pmol}/\mu\text{g}$, respectivamente. Em células HeLa, os níveis de incorporação são ainda menores – 56,4, 89,8 e 150,4 $\text{fmol}/\mu\text{g}$ – frente a mesma exposição (dados não publicados). Comparativamente, as quantidades incorporadas aqui, em células tubulares proximais renais, mediante a exposição de 5 e 50 μM de IAA durante 1 hora foram em média 3,29 e 15,32 $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$.

De forma complementar, o IAA já foi associado com o aumento de expressão de um fator tecidual, envolvido no processo de cicatrização, através da interação com o receptor AHR – receptor aril-carbono (Addi *et al.*, 2019). O AHR é um receptor citosólico,

dessa forma, há um indicativo de que as atividades de IAA necessitam da incorporação para serem efetivas, suportando a hipótese de que a associação com a albumina suavize os efeitos intracelulares do IAA. Sendo que os efeitos observados em outros estudos decorrentes da internalização do IAA, sendo sugerido como um marcador preditor de morte decorrente de complicações cardiovasculares (Dou *et al.*, 2015).

A exposição às PBUT retroalimenta a acumulação de metabólitos, contribuindo para a progressão da doença. Nesse sentido, ensaios *in vitro* apontam para a redução nas quantidades de dois tipos de transportadores OAT (P1B1 e P2B1) em exposições de células a soros urêmicos durante 48 horas (Tsujimoto *et al.*, 2012). É importante notar que, no estudo de Tsujimoto e colaboradores (2012), as dosagens de IAA no soro eram cerca de 2 uM, e que as células foram incubadas com concentrações de 1, 5 e 10% de soro juntamente com meio de cultivo. Nesse sentido, é possível que nas concentrações testadas aqui, muito mais altas, os transportadores já estejam sofrendo algum comprometimento em suas funções de incorporação, o que pode justificar a grande variação nos ensaios.

Quanto à incorporação por transportadores, neste experimento é possível observar que o intervalo de tempo nas concentrações utilizadas expressa um comportamento exponencial, ou seja, nestas condições não foi possível observar um padrão de incorporação dose dependente, no qual uma concentração limítrofe é atingida para a saturação do receptor (platô), como observado para o ácido hipúrico já em torno de 150 uM de exposição nos primeiros 10 minutos (Motojima *et al.*, 2002) . Isso pode argumentar contra a incorporação do IAA através dos receptores hipotetizados anteriormente. No entanto, ensaios de competição, realizados em células HeLa, apontam a redução progressiva na incorporação de IAA frente à exposição concomitante de ácido hipúrico, já apontado como ligante de OAT1 (Motojima *et al.*, 2002); o mesmo fenômeno ocorria com IxS. Nesse sentido, estudos feitos com oócitos de sapos (Wikoff *et al.*, 2012) e células endoteliais (Favretto *et al.*, 2017) suportam o papel dos OAT na internalização de IxS. Além disso, estudos já demonstraram que a expressão do promotor do inibidor 1 do ativador de plasminogênio (PAI-1) ocorre de modo dose-dependente de IAA (Motojima *et al.*, 2003); neste estudo, o mesmo comportamento dose-dependente

ocorreu na ativação de vias pró-oxidantes (NF- κ B), avaliadas através do gene repórter luciferase. Esse conjunto de dados aponta para a internalização do IAA como sendo dependente de transportadores de membrana; complementarmente, segundo dados da literatura, o maior candidato para esta internalização é o OAT1; para tal, sugere-se o uso de inibidores, como o probenecid, para a confirmação desta suspeita.

3. CAPÍTULO 2: COMPARAÇÃO ENTRE HD E HDF NAS CONCENTRAÇÕES PRÉ-DIÁLISE DE IXS, PCS E IAA

3.1. REVISÃO DE LITERATURA

Clinicamente, a DRC é classificada como a perda progressiva e irreversível da função renal. O diagnóstico preciso baseia-se na aferição da taxa de filtração glomerular (TFG), a qual utiliza 6 estágios para classificação do agravamento da doença, sendo o último estágio caracterizado pela falência renal (Webster *et al.*, 2017). A perda da filtração ocorre devido a injúrias sofridas pelo tecido que, devido à urgência em manter o tecido epitelial íntegro, se recupera rapidamente formando um tecido fibrótico (Liu, 2004), portanto com função prejudicada. As injúrias podem ser de naturezas diversas, tais como medicamentos tóxicos aos rins, contato com substâncias venenosas produzidas por animais ou insetos, ou até mesmo uma injúria física; nestes casos, o paciente desenvolve a chamada doença renal aguda (Petejova *et al.*, 2019). No caso da DRC, as injúrias são lentas e constantes, sendo a hipertensão e a diabetes as duas principais causas (Webster *et al.*, 2017).

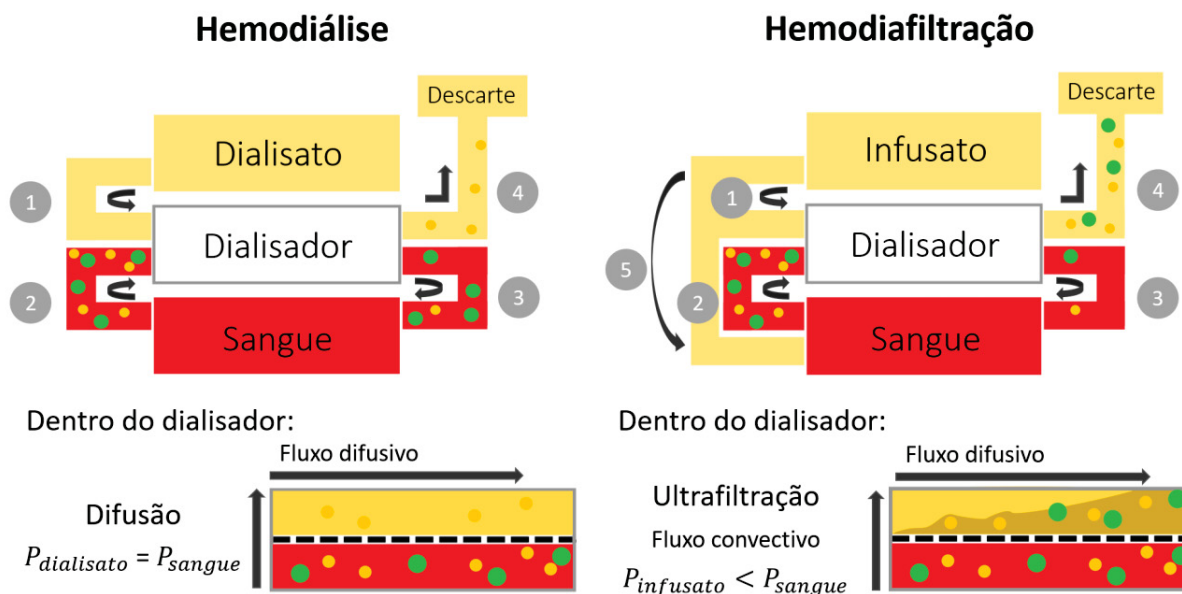
Após o comprometimento completo da função renal, seja por causa aguda ou crônica, os pacientes acometidos são encaminhados para terapias renais substitutivas, as quais baseiam-se principalmente na substituição da função de filtração dos rins, podendo auxiliar também na correção do pH sanguíneo e, principalmente, no balanço volêmico (Pastan and Bailey, 1998). Essas terapias são chamadas diálises e possuem diversas especificações, as mais comuns no Brasil são HD e diálise peritoneal (Neves *et al.*, 2020). Em ambas, os metabólitos presentes no sangue entram em contato com um líquido ultrafiltrado através de uma membrana semipermeável, os quais caminham em direções opostas e; por difusão, estes metabólitos passam para este líquido e são descartados. Dentre estes tratamentos, a diálise peritoneal pode ser realizada em casa diariamente, na qual o paciente utiliza a membrana do peritônio, presente na cavidade abdominal, como membrana semipermeável para a limpeza do sangue. No entanto, a diálise peritoneal exige diversos cuidados no manuseio dos aparatos para que não haja

contaminação dos fluidos durante o estoque e a administração. Já a HD, utiliza equipamentos especiais para filtragem sanguínea e deve ser realizada em clínicas especializadas, exigindo o deslocamento do paciente pelo menos três vezes no intervalo de uma semana, visitas nas quais o paciente permanece durante, pelo menos, 5 horas. Estes equipamentos promovem uma circulação extracorpórea, ou seja, o sangue do paciente é retirado através de uma via venosa, limpo e retornado à corrente sanguínea através de outra via venosa. Neste intervalo, o sangue passa por uma porção do equipamento chamada dialisador, o qual abriga a membrana que permitirá a filtração do sangue.

Embora a HD seja a terapia de substituição renal mais utilizada no Brasil (92,3%) (Neves *et al.*, 2020), ela ainda não é a melhor opção disponível no mercado para os pacientes renais. A emergência de uma outra técnica de diálise, chamada hemodiafiltração (HDF), vem sendo classificada como um tratamento mais eficiente em diversos aspectos (Maduell, 2005). Diferente da HD, a HDF não possui somente o fluxo difuso contínuo, responsável pela remoção dos metabólitos através da difusão. A HDF também possui um fluxo convectivo, pois incide uma pressão negativa dentro do dialisador, que é responsável pela ultrafiltração do plasma sanguíneo. O volume retirado após a ultrafiltração é repostado pela infusão de um líquido ultrafiltrado. Estas últimas duas etapas podem ser invertidas, ou seja, tanto pode ocorrer a ultrafiltração seguida da reposição de líquido (pós-diluição), quanto pode ocorrer a infusão de líquido seguida pela ultrafiltração (pré-diluição). Dessa forma, o volume de fluido dialítico é muito maior na HD – 500 a 800 ml/min (Pastan and Bailey, 1998) se comparado com o volume de fluido utilizado na HDF – 50 a 200 ml/min (Maduell, 2005). Detalhes sobre as etapas estão descritas no diagrama a seguir (Fig. 7):

FIGURA 7. ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DAS TERAPIAS DE DIÁLISE HD E HDF. É importante observar que o dialisador é uma estrutura formada por diversos canalículos circundados por uma estrutura maior e única. Neste caso, o sangue transita por dentro destes pequenos canudos, enquanto que o fluido dialítico caminha por fora. Portanto, os esquemas dos painéis inferiores representam apenas uma intersecção entre os meios interno e externo destes canalículos presentes dentro do dialisador. À esquerda: HD, (1) fluido dialítico (dialisato) é inserido no dialisador por fora dos canalículos, (2) o sangue do paciente é inserido também no dialisador por dentro dos canalículos, (3) sangue filtrado, mas ainda com alguns metabólitos remanescentes volta para a corrente sanguínea do paciente e (4) fluido dialítico ainda contendo alguns metabólitos é descartado. À direita: HDF, (1) o fluido é inserido no dialisador por

fora dos canalículos, (2) o sangue do paciente é inserido também no dialisador por dentro dos canalículos, (3) sangue filtrado, mas ainda com alguns metabólitos remanescentes volta para a corrente sanguínea do paciente (4) fluido dialítico contendo alguns metabólitos é descartado (5) nas modalidades pós-diluição, fluido dialítico (infusato) é infundido na corrente sanguínea do paciente; nos casos pós-diluição essa etapa é a anterior à todas as demais. Estas representações correspondem a um único ciclo de diálise de cada técnica; diversos ciclos são realizados durante a sessão no período de 4 a 5 horas. Note que na HDF, moléculas de tamanho maiores são retiradas com maior eficiência devido à pressão negativa estabelecida no interior do dialisador. Enquanto que na HD, não há diferença expressiva nas pressões dentro e fora dos canalículos, e o trânsito de metabólitos depende da difusão somente.



LEGENDA

- Sangue
- Fluido dialítico (dialisato ou infusato)
- Fluido plasmático
- Moléculas de tamanho médio
- Moléculas de tamanho pequeno
- Membrana do dialisador

FONTE: O autor (2020)

A eficiência de uma terapia renal substitutiva pode ser avaliada de diferentes pontos de vista, principalmente de natureza clínica e diagnóstica. No tocante à natureza clínica, são avaliados parâmetros como taxa de sobrevivência após o diagnóstico, taxa de mortalidade e disposição física dos pacientes, por exemplo; enquanto que os parâmetros

diagnósticos estão relacionados à eficiência de remoção das substâncias acumuladas; é estimada, por exemplo, a eficiência de remoção de metabólitos nitrogenados, como a creatinina e a ureia. Durante a prática clínica, a duração das sessões de diálise é ajustada de acordo com a taxa necessária de depuração da ureia (Kt/V) acompanhada mensalmente, utilizada como substância base (Breitsameter, Figueiredo and Kochhann, 2012). Entretanto, estudos defendem que somente a Kt/V não é suficiente para uma avaliação rígida da efetividade das técnicas de diálise (Depner, 1996; Jones and Bargman, 2018).

A acumulação de metabólitos, principalmente da ureia, denominou este fenômeno fisiopatológico clássico da DRC de uremia, ou síndrome urêmica (Meyer and Hostetter, 2007). Além da ureia e de outros compostos de tamanho pequeno (<500 Da), a uremia também é caracterizada pela acumulação de compostos de tamanho médio (>500 nm). Nesse cenário, a HDF se mostrou mais eficiente que a HD na remoção de moléculas de tamanho médio, tais como beta-2-microglobulina (Lin *et al.*, 2001; Brunati *et al.*, 2019; Snauwaert, Van Biesen, *et al.*, 2019), mas não apresentou grandes vantagens quanto à remoção das moléculas menores, como a creatinina, nesta mesma comparação. Há ainda, um terceiro grupo de substâncias acumuladas que atuam no intervalo de tamanho destes dois grupos citados anteriormente, são as chamadas toxinas urêmicas ligadas a proteínas. Estas toxinas são advindas do metabolismo de proteínas realizado pela microbiota intestinal e, apesar de terem tamanho pequeno (<500 Da) elas se associam facilmente com proteínas plasmáticas, como a albumina, atingindo tamanhos muito maiores após esta ligação, o que justifica o nome comum de toxinas urêmicas ligadas a proteínas (ou PBUT, no termo em inglês).

Esse comportamento dúbio, ora de tamanho pequeno quando livres, ora de tamanho médio devido à associação a proteínas, traz dúvidas em relação à superioridade da HDF em comparação à HD no tocante à eficiência de remoção das toxinas urêmicas. Além disso, diferentes compostos possuem diferentes taxas de afinidades com a albumina. Enquanto alguns compostos, como IxS e pCS possuem altas taxas de afinidade à albumina – próximos a 90 % (Itoh *et al.*, 2012), outros, como o IAA possuem taxas menores - em torno de 60 % (Meert *et al.*, 2010; Snauwaert, Holvoet, *et*

al., 2019). Da mesma forma, estes compostos tem origens variadas. Enquanto que IxS e IAA são indóis derivados do metabolismo do triptofano, pCS é proveniente do metabolismo da tirosina. Dessa forma, espera-se que as quantidades de cada um destes compostos variem grandemente entre os pacientes e que também a eficiência de remoção de cada uma delas seja diferente de acordo com a porcentagem de associação à albumina.

Embora as toxinas urêmicas circulem parcialmente associadas a albumina, seus efeitos celulares parecem ser resultantes apenas da fração livre. A associação das toxinas à albumina é dinâmica, ou seja, a mesma molécula de toxina pode estar ora associada, ora livre. Já foi descrito que IxS, ácido fenil acético (Yu *et al.*, 2017), pCS, IAA e ácido hipúrico (Deltombe *et al.*, 2017) interagem com albumina em dois sítios de ligação. No entanto, ainda não se sabe se a albumina oferece outros sítios de ligação para outras toxinas. As toxinas podem exercer efeitos celulares dos mais variados, muitos dos quais contribuem para o agravamento da doença, tais como efeitos celulares macroscópicos como: a fibrose renal (Niwa and Shimizu, 2012), a calcificação das células musculares lisas (Zhang *et al.*, 2018) ou o rompimento das células mesangiais - mesangiólise (Ichii *et al.*, 2014). Também já foram descritos efeitos subcelulares, tais como: produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e aumento no estresse oxidativo (Sirich *et al.*, 2014; Stockler-Pinto *et al.*, 2018) e menor defesa antioxidante (Aminzadeh *et al.*, 2013). Neste último caso, acredita-se que parte desses efeitos seja resultante ou incrementado pela inibição de enzimas mitocondriais (Mutsaers *et al.*, 2013).

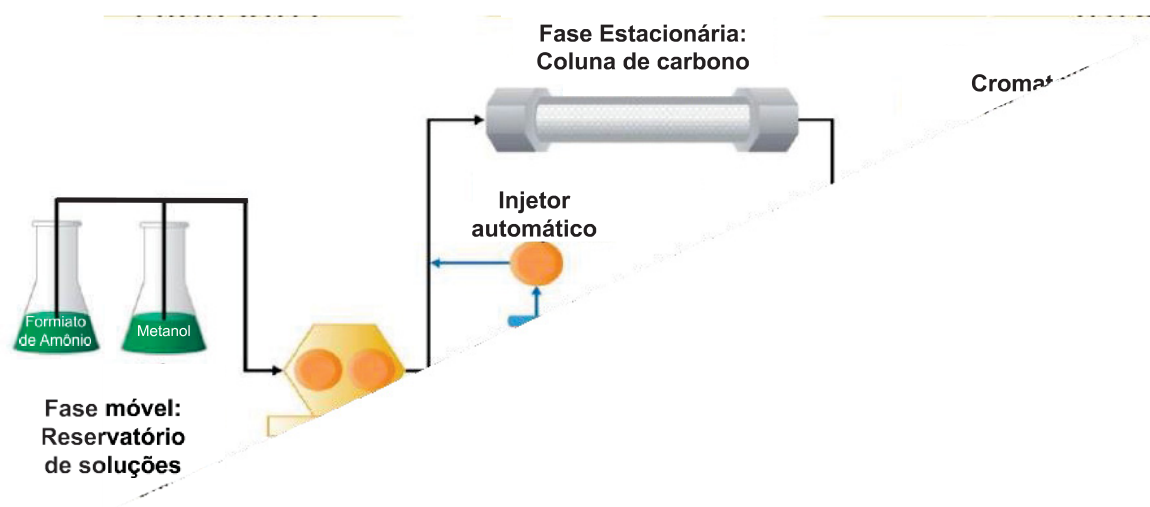
Muitos estudos têm se dedicado a pontuar diferenças entre a eficiência da HD a HDF quanto a capacidade de remover as toxinas urêmicas, e consequente mitigação dos efeitos das mesmas (Meert *et al.*, 2011; Pedrini *et al.*, 2011; Snauwaert, Van Biesen, *et al.*, 2019; van Gelder *et al.*, 2020). No entanto, há uma grande variabilidade dentro de cada uma dessas terapias e das diversas abordagens dentro de cada estudo, o que dificulta a comparação entre os achados e o estabelecimento de uma resposta final nesta comparação. Dentro da HD, há diferenças na velocidade do fluxo dentro do dialisador; enquanto algumas técnicas utilizam o fluxo baixo, outras utilizam fluxo alto. Já na HDF,

há variações quanto ao volume de fluido infundido (alto ou baixo) e quanto à ordem das etapas de ultrafiltração e reposição volêmica. Dentre elas, estudos indicam que a modalidade de alto fluxo na HD e a modalidade alto volume com pós-diluição na HDF sejam as mais eficientes de cada modalidade.

Além da variedade nas especificações de cada terapia, os desenhos experimentais de cada estudo também variam, impedindo uma comparação adequada. Nesse sentido, as condições ideais para obtenção de resultados mais robustos são: grande número amostral, pacientes randomizados, e acompanhamento por um tempo longo. Quando essas características são atendidas pelos estudos, os componentes dosados raramente são toxinas urêmicas. Isso ocorre, pois, a forma ideal de dosagem das toxinas urêmicas é feita através da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, em inglês – Fig. 7), uma técnica relativamente cara na qual cada dosagem ultrapassa R\$ 100. A técnica também exige recursos humanos treinados. Um esquema representativo do funcionamento desta técnica pode ser consultado abaixo (Fig. 8):

FIGURA 8. ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO. O fluxo é estabelecido da esquerda para a direita, iniciado e mantido através da bomba. A coluna promove a separação dos compostos (picos amarelo, vermelho e azul, em Cromatograma) de forma diferencial, de acordo com a afinidade dos mesmos aos componentes da coluna. Após a detecção, há a emissão de um sinal (em volts), representado no cromatograma, que relaciona basicamente a intensidade deste sinal com seu tempo de retenção. Sucintamente, a identificação dos compostos depende da interação diferencial dos compostos com a coluna, dessa forma, enquanto alguns compostos interagem fortemente, e permanecem associados por mais tempo durante a passagem do fluxo, outros interagem fracamente e caminham para o detector mais rapidamente. A diferença do tempo no qual os compostos

são retidos na coluna é utilizada para detecção de diferentes compostos em intervalos de tempos diferentes.



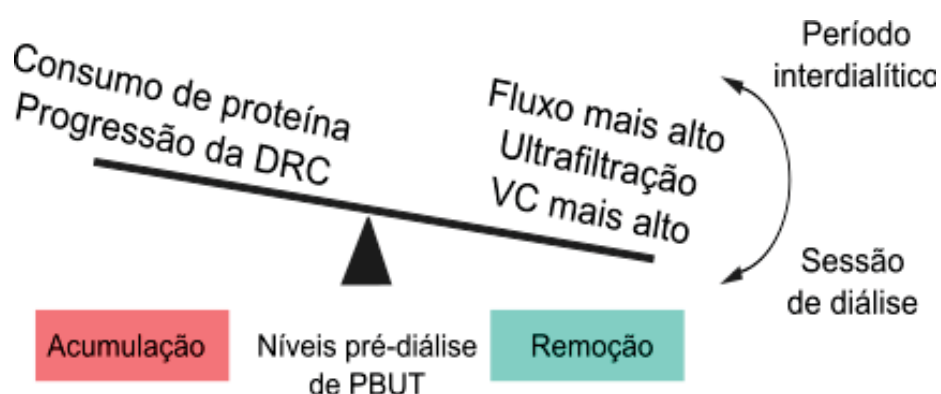
FONTE: Modificado de (Blum, 2014)

As concentrações encontradas das toxinas irão depender do tipo de amostra analisada. Por exemplo, num indivíduo saudável é natural que amostras de urina contenham maiores níveis de creatinina do que amostras de soro ou plasma, já que a mesma é preferencialmente excretada. Essa diferença ocorre com pacientes renais, em amostras colhidas antes e após as sessões de diálise, ou seja, amostras pré-diálise são mais concentradas que amostras pós-diálise (Itoh *et al.*, 2012; Brunati *et al.*, 2019). Portanto, é esperado que amostras pré-diálise sejam mais concentradas que amostras pós-diálise, já que a diálise retiraria grande parte destes metabólitos. Nesse sentido, a dosagem de amostras pós-diálise refletiria diretamente a eficiência do método utilizado em uma única sessão. Por outro lado, a dosagem de amostras pré-diálise refletiria as concentrações dos níveis de metabólitos a longo prazo, em outras palavras, dosagens pré-diálise representam efetivamente os níveis de toxina nos quais os pacientes estão expostos ao longo dos dias, refletindo efetivamente o impacto do tratamento dialítico na manifestação dos efeitos celulares e clínicos citados anteriormente.

De forma ilustrativa, o diagrama a seguir (Fig. 9) resume a dinâmica sofrida pelas toxinas urêmicas ao longo do tratamento dialítico. Neste cenário, períodos interdialíticos

representam os 1 ou 2 dias de intervalo entre as sessões de diálise. O objetivo dos tratamentos é manter essa balança mais tempo tendendo à níveis mais baixos de toxinas no plasma e, portanto, tendendo à remoção ao longo do tempo.

FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO DA DINÂMICA NAS CONCENTRAÇÕES DE PBUT DURANTE O TRATAMENTO DIALÍTICO EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS. Enquanto que uma dieta rica em proteínas e a progressão natural da doença contribuem para a acumulação destes compostos, características dos métodos de diálise como alto fluxo ou alto volume convectivo (VC) contribuem para que estes níveis sejam reduzidos e manifestam seus efeitos imediatamente após as sessões de diálise.



FONTE: O autor (2021)

Este trabalho é uma análise *post hoc* do projeto multicêntrico HDFIT (Pecoits-Filho *et al.*, 2019). Sucintamente, o projeto buscou comparar a disposição física (medida em passos em 24 horas) de 195 pacientes renais crônicos randomizados entre os tratamentos de HD e HDF. Juntamente a este estudo, foram coletadas amostras de materiais biológicos diversos dos pacientes (soro, plasma, etc) que seriam utilizados para análises posteriores. Análises provenientes do projeto HDFIT já puderam observar benefícios superiores aos pacientes alocados no tratamento de HDF, em comparação com HD, tais como: aumento na taxa de Kt/V já a curto prazo (até 3 meses), ou seja, melhor remoção de ureia, também, redução nos níveis de fosfato, (Guedes *et al.*, 2021) que também são marcadores clássicos do comprometimento renal. Quanto às PBUT, diversos estudos apontam para uma superioridade da HDF, quanto à eficiência de remoção (Meert *et al.*, 2011; Panichi *et al.*, 2017; van Gelder *et al.*, 2020). Dessa forma, pretendemos investigar a eficiência da HDF em relação a HD nos níveis pré-diálise de

PBUT entre as técnicas de HD e HDF, nos moldes utilizados previamente no projeto HDFIT.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. DESENHO EXPERIMENTAL

Pacientes de 13 clínicas das regiões Sul e Sudeste do Brasil foram alocados aleatoriamente em dois tratamentos dialíticos (Fig. 10): HD de alto fluxo (HD) e HDF em linha de alto volume e pós-diluição (HDF). Os 195 pacientes participantes eram maiores de 18 anos, sendo a grande maioria adulta (média: 53 ± 15 anos), além disso, todos já estavam alocados ao tratamento de HD por pelo menos 3 meses. Também, como critério de inclusão, estabeleceu-se o limite máximo em HD por até 24 meses, já que se estima que a DRC estaria estabilizada neste período (entre 3 e 24 meses). A coleta de amostras pré-diálise – ao invés de pós-diálise – se baseou na melhor avaliação do impacto do tratamento ao longo do tempo; dessa forma a análise pós-diálise traria resultados mais precisos em relação à eficiência do tratamento em uma única sessão, enquanto que, análises pré-diálise refletiria o impacto da técnica a longo prazo.

Esta etapa do projeto contou com a colaboração do Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho coordenador do projeto HDFIT (ClinicalTrials.gov: NCT02787161), responsável pelo desenho experimental inicial, aquisição de parcerias com clínicas e treinamento técnico especializado para a coleta de material biológico dos pacientes envolvidos. Para serem incluídos no estudo, foram selecionados pacientes com diagnóstico de DRC entre 3 e 24 meses, pois neste estágio a doença é considerada estável e, portanto, contribuiria para a diminuição de fatores de confusão.

FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO DO DESENHO EXPERIMENTAL UTILIZADO NO PROJETO HDFIT. Inicialmente, houve a alocação aleatória de pacientes doentes renais crônicos já em tratamento prévio por HD de alto fluxo, também chamada HD convencional, nos dois tratamentos investigados: HD de alto fluxo (HD) e HDF em linha de pós-diluição (HDF). Os pacientes foram mantidos nos respectivos tratamentos durante 6 meses, nos quais foram coletadas amostras de plasma em 3 momentos distintos (T0= baseline/imediatamente após a alocação ao tratamento, T3= 3 meses e T6= 6 meses após a alocação).

Todas as amostras foram retiradas imediatamente antes de cada sessão de diálise correspondente aos momentos escolhidos para coleta.



FONTE: O autor (2021)

Dentro da modalidade de HDF, os pacientes receberam volumes convectivos diferentes, de acordo com especificações médicas. Essa variedade possibilitou a estratificação do grupo entre os que receberam baixos volumes convectivos (<27,5 L) dos que receberam altos volumes convectivos (>27,5 L). Embora houvesse variação, todos os pacientes de HDF receberam um volume mínimo de 22 L por sessão.

3.2.2. COLETA DE AMOSTRAS

Após serem coletadas nos centros de diálise das regiões Sul e Sudeste do Brasil, os materiais biológicos (plasmas, soros, etc) foram encaminhados ao banco de amostras da Universidade Pontifícia Católica do Paraná (PUC-PR). Neste estudo solicitamos as alíquotas de plasma pré-diálise de todos os pacientes contidos no banco. Esta seleção totalizou 494 amostras provenientes de 98 dos pacientes designados à HD e 95 à HDF. Dos 195 pacientes presentes no estudo, 193 possuíam amostras para serem analisadas; destes 130 pacientes continham amostras nos três tempos (0, 3 e 6 meses), 43 em dois dos três tempos (0 e 3 meses / 0 e 6 meses / 3 e 6 meses) e 20 pacientes somente em um dos três tempos (0, 3 ou 6 meses).

3.2.3. PREPARO DOS PLASMAS

Primeiramente 100 µl de cada amostra foi diluído em 260 µl de água MilliQ, estas foram mantidas em banho seco a 95°C por 30 min, centrifugadas a 13000 rpm por 20 min, do qual o sobrenadante foi transferido para filtros AMICON ULTRA 0,5mL 30kDa e centrifugados novamente, dessa vez, a 11000rpm por 30 min. O conteúdo filtrado foi armazenado a -80°C até o momento de análise, realizada em até 2 dias após o armazenamento.

3.2.4 CURVA DE CALIBRAÇÃO E ANÁLISE DOS PLASMAS.

Para a mensuração de toxinas nos plasmas analisados foi necessário o preparo de padrões mistos de concentrações conhecidas. Primeiramente, as soluções-estoque foram preparadas pela dissolução de IxS (213,21 g/mol), pCS (188,2 g/mol) e IAA (175,184 g/mol), comercializados em pó, em água MilliQ, nas concentrações de 4,0, 7,34 e 2 mM, respectivamente. Os estoques foram quantitativamente aliquotados, liofilizados e armazenados a -80°C. Posteriormente, os estoques liofilizados foram reconstituídos nos mesmos volumes das aliquotas e usados para a preparo dos padrões mistos. Para o preparo do padrão mais concentrado, foram pipetados 30 µl de uma solução estoque 4 mM de IxS e 27 µL de uma solução estoque 7,34 mM de pCS e 6 µl de IAA 2 mM de IAA, completando 63 µl de volume final. Esta solução foi então diluída seriadamente (20 µl da solução com mais 40 µl de água MilliQ) para o preparo das soluções calibradoras, formando uma sequência de 7 calibradores (Tabela 2 - Fig. 11 A e ANEXO 2).

Para a construção da curva de calibração, um volume de 20 µl de cada um destes padrões mistos foi diluído em 240 µl de água MilliQ e 100 µl de plasma saudável, chamados agora de calibradores. Dessa forma, cada calibrador continha: padrões mistos 0 a 6, água e a matriz da amostra, no caso plasma saudável.

TABELA 2. DETALHAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DOS PLASMAS. Importante diferenciar os “cal mix” dos “calibradores”. Os “cal mix” são feitos a partir de uma mistura das toxinas puras em água, já os “calibradores” são advindos da mistura dos cal mix numa matriz de plasma saudável diluído. A tabela cita as informações somente sobre os cal mix e calibradores de maior concentração (os de posição 6); os demais cal mix foram diluídos seriadamente e adicionados às matrizes de plasma em quantidades iguais para produção dos calibradores. Dessa forma, o calibrador 0 não representa ausência de toxinas adicionadas, e sim, a menor diluição utilizada aqui.

	Cal 6	Cal 5	Cal 4	Cal 3	Cal 2	Cal 1	Cal 0
IxS (µM)	110.00	36.67	12.22	4.07	1.36	0.45	0.15
pCS (µM)	183.00	61.00	20.33	6.78	2.26	0.75	0.25
IAA (µM)	11.00	3.67	1.22	0.41	0.14	0.05	0.02

FONTE: O autor (2020)

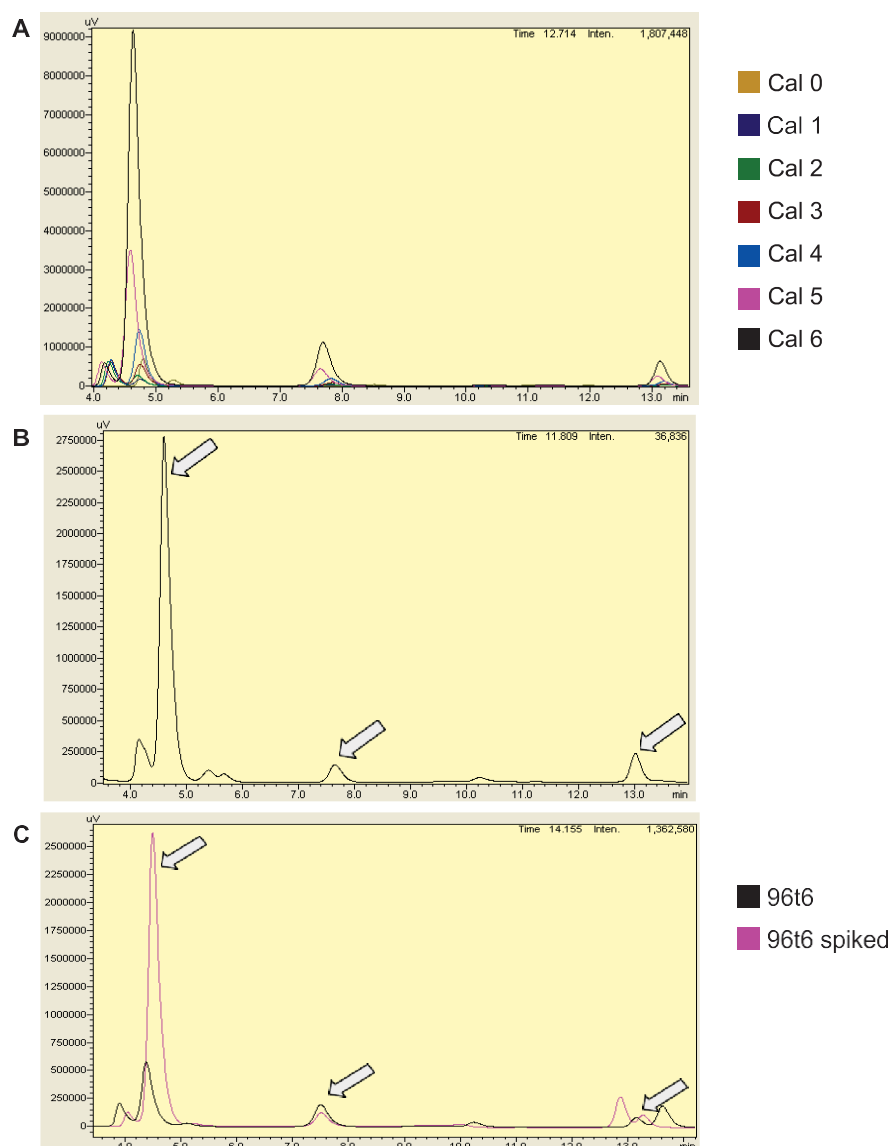
Os plasmas urêmicos foram analisados através do Método 24.1 Meert 2011 em Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), considerada padrão ouro para dosagens dessa natureza. O método utilizado foi o método para soro e plasma descrito por Dolenga (2016). Brevemente, o método continha especificações tais como: 33 min de corrida, proporção de fase móvel 65% de formiato de amônio 50 mM pH 3,5 e 35% metanol, sendo as proporções alteradas de forma gradiente (ANEXO 1).

O equipamento possui injetor automático Shimadzu SIL-10AF, mantido a 7°C, o qual inseria 20 µl das amostras previamente diluídas 1:2 em água MilliQ. Os compostos injetados interagem em diferentes intensidades com uma coluna de fase reversa C8; esta interação determina o tempo no qual a substância leva para eluir da coluna, após a qual é mensurada por um fluorímetro. As variáveis: corrente elétrica (mV) e tempo de retenção (min) são relacionadas no cromatograma.

As toxinas utilizadas neste trabalho possuem tempos de retenção em torno de IxS: 4 minutos e 30 segundos, pCS: 7 minutos e 30 segundos e IAA: 12 minutos e 30 segundos para a análise no plasma (Fig. 11 B). Os tempos de retenção são estimados e podem variar sensivelmente conforme a temperatura do ambiente ou dos solventes e o método utilizado, e variam consideravelmente de acordo com o método utilizado (Calaf *et al.*, 2011; de Loor *et al.*, 2016). Para assegurar a identificação do composto correto, eventualmente, soluções puras de toxinas eram adicionadas às amostras (chamadas de

spiked), e os picos corretos eram confirmados (Fig. 11 C). A partir da identificação dos picos dos calibradores, os dados expostos no cromatograma das amostras podem ser convertidos em concentração através da integração das áreas dos picos apresentados nos tempos determinados.

FIGURA 11. CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS ANÁLISE DE PLASMAS URÊMICOS. A. Curva de calibração: Todos os calibradores são mistos e contém todas as toxinas analisadas: IxS, pCS e IAA, sendo que o calibrador 6 representa a quantidade injeta de 1100, 1830 e 110 pmol respectivamente. Cada calibrador subsequente possui um terço da quantidade de toxinas do anterior. B. Exemplo de análise de plasma com um paciente da coorte, paciente 100t0. C. Exemplo de análise com spike. O spike é realizado para confirmação de picos dúbios, neste caso a amostra em rosa representa a mesma amostra em preto, porém com uma quantidade a mais de toxina adicionada, no caso IxS, a qual buscava-se ilustrar o spike. As setas representam os picos relativos a IxS, pCS e IAA, em sequência da esquerda para a direita.



FONTE: O autor (2021)

3.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, os dados foram avaliados quanto à distribuição normal, seguidos pelo cálculo das médias e desvios padrão (DP) ou medianas e intervalos inter-quartis (IQR). Foram utilizados teste-t ou Mann-Whitney para análise dos dados, sendo teste-t pareados utilizados para análise ao longo dos períodos. Após, para avaliar as diferentes contribuições dos tratamentos, os dados foram inseridos no modelo linear de efeito misto, no qual as taxas e interceptos foram considerados aleatórios, da mesma forma que dados ausentes também foram considerados aleatórios. De forma complementar, o grupo HDF foi subdividido de acordo com o volume convectivo (VC) atingido, no qual foi adotado 27,5L (mediana) por sessão para estratificar o grupo entre baixo e alto VC. Da mesma forma, taxas e interceptos foram considerados aleatórios. Todas as análises foram realizadas no software R versão 3.5.1.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 DESCRIÇÃO DO GRUPO TESTADO

Nossa análise contou com a participação de 193 pacientes de clínicas da região sul e sudeste do Brasil, alocados de forma randomizada nos dois tratamentos dialíticos testados HD e HDF. Cada um deles dispunha de 1 a 3 amostras de plasma nos tempos de coleta determinados (Tabela 3), pois alguns pacientes não compareceram às visitas nos dias determinados e, então, não puderam ter suas amostras coletadas. Dessa forma, HD teve 8,54 % de desistência em detrimento de 8,65 % em HDF. Nenhum parâmetro bioquímico ou clínico apresentou diferença entre os grupos acompanhados em T=0; no caso das toxinas, as concentrações médias gerais em T=0 foram: IxS = 98,86 μ M; pCS = 190,83 μ M e IAA = 12,58 μ M, considerando ambos os grupos.

TABELA 3. DESCRITIVO DE AMOSTRAS ANALISADAS. Contabilização de amostras analisadas nos diferentes tempos (0, 3 e 6 meses) em ambos os tratamentos dialíticos HD e HDF. A tabela traz também o número de pacientes alocados em cada grupo; dos 195 pacientes iniciais, 2 não foram analisados devido à quantidade insuficiente de amostra, totalizando 193. É importante salientar que alguns pacientes não continham os três tempos de coleta completos. Dessa forma, 130 pacientes continham coletas nos 3 tempos; 43 pacientes continham somente em 2 tempos e 20 pacientes possuíam amostras em somente 1 tempo.

	HD (n=96)	HDF (n=97)	Total (n=193)
T= 0 meses	86	88	174
T= 3 meses	79	83	162
T= 6 meses	81	81	162
Total	246	252	498

FONTE: O autor (2020)

Concentrações gerais de todas as toxinas analisadas são menores em HDF quando somados todos os tempos de dosagem (Tabela 4). As variações ao longo dos tempos de coleta apontam para uma tendência clara de remoção em HDF, enquanto que em HD as concentrações de toxinas tendem a incrementar ao longo do tempo (Fig. 12).

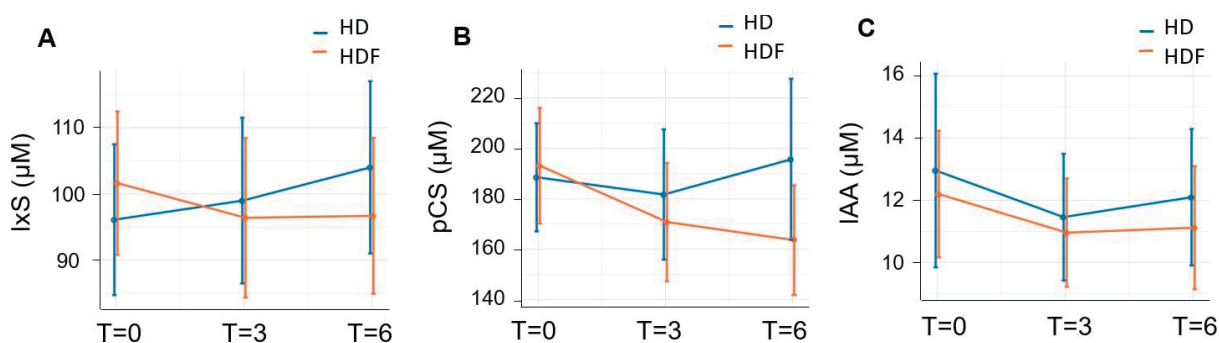
Neste ponto é importante citar que a dinâmica de acumulação de toxinas depende de dois fatores, o primeiro é o acúmulo natural desses metabólitos resultante da dieta proteica do indivíduo, o segundo é a capacidade de remoção pela técnica de diálise utilizada. Dessa forma, os resultados apontam para um balanço positivo de HDF, indicando que nesta técnica, a remoção de toxinas supera a acumulação natural decorrente da doença.

TABELA 4. CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE CADA TOXINA EM AMBOS OS GRUPOS EXPERIMENTAIS. Os valores são resultantes da média das dosagens de todos os tempos e representam a tendência geral em valores brutos. *Dados convertidos de (Duranton, Cohen, Smet, *et al.*, 2012).

	IxS (μM)	pCS (μM)	IAA (μM)
HD (média (DP))	99.75 (56.77)	188.91 (122.78)	12.22 (11.74)
HDF (média (DP))	98.16 (53.58)	176.03 (106.31)	11.41 (8.96)
População saudável (média (DP)) *	2.48 (1.36)	10.09 (6.9)	0.00285 (0.00171)

FONTE: O autor (2021)

FIGURA 12. CONCENTRAÇÕES DAS TOXINAS AO LONGO DO TEMPO EM AMBOS OS TRATAMENTOS. Os pontos centrais nas hastes representam a média dos pacientes no tempo e tratamento representados. T=0, T=3 e T=6 são relativos aos momentos de coleta das amostras de plasma analisadas, em meses após a alocação ao tratamento. Diferenças entre os tratamentos foram observadas somente no IxS após o período de 6 meses ($p < 0,05$). Embora pCS também aparente uma diferença entre os tratamentos, a grande variação nas concentrações entre os pacientes impossibilitou diferença estatística.

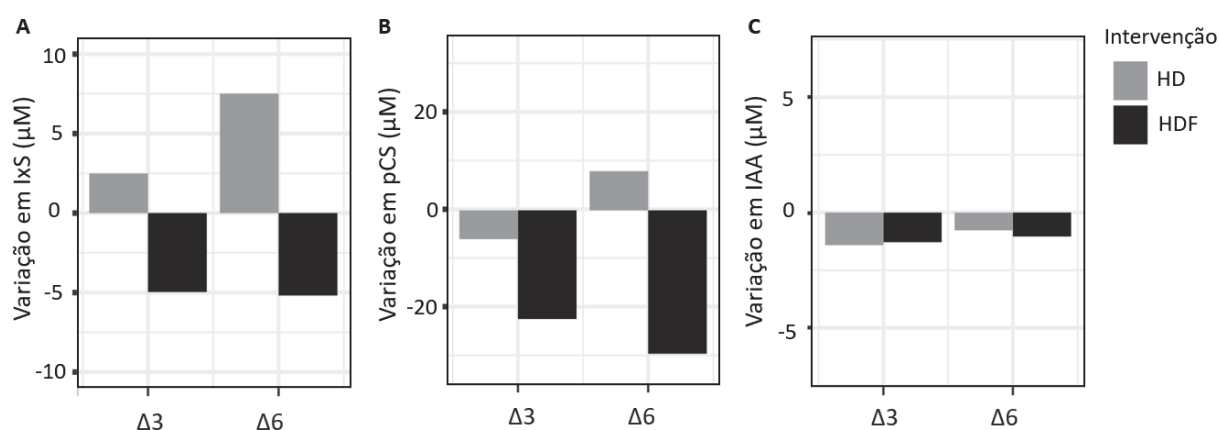


FONTE: Modificado de Murilo Guedes - colaborador (2021)

3.3.2 HDF PERMITE UMA RETIRADA MAIS EFICIENTE DE IXS

Após a mensuração das toxinas em plasma através do método de HPLC, os grupos foram inicialmente comparados em relação à eficiência de remoção das toxinas em cada tratamento (Fig. 13). Dessa forma, para cada toxina analisada, foram calculadas as variações a curto prazo (de 0 a 3 meses) e a longo prazo (de 0 a 6 meses). Em todas as toxinas, HDF apresentou taxas de remoção maiores em relação às taxas obtidas em HD (Tabela 5).

FIGURA 13. VARIAÇÃO MÉDIA DAS TOXINAS AO LONGO DO TEMPO. As variações médias foram calculadas a curto ($\Delta 3$) e a longo ($\Delta 6$) prazo, sendo $\Delta 3$ de 0 a 3 meses e $\Delta 6$ de 0 a 6 meses. Valores negativos indicam remoção, enquanto que valores positivos indicam acumulação de toxinas no período especificado.



FONTE: Modificado de Murilo Guedes - colaborador (2021)

Frequentemente na literatura, a comparação entre métodos dialíticos varia enormemente em relação às especificidades de cada técnica. Previamente, a HD de alto fluxo já se mostrou mais eficiente do que a de baixo fluxo quanto a remoção de IxS e pCS (Camacho *et al.*, 2016). As mesmas toxinas tiveram melhor desempenho na HDF. HDF, especialmente na modalidade pós-diluição (Meert *et al.*, 2011), que já era previsto, uma vez que a vantagem da modalidade em pós diluição foi sustentada, anteriormente, também pela melhor remoção de moléculas médias, como a $\beta 2$ -microglobulin (Meert *et al.*, 2009). De forma complementar, análises testando a HDF contra a HD de baixo fluxo, pontuaram novamente a vantagem da primeira (van Gelder *et al.*, 2020) (Panichi *et al.*, 2017).

No acompanhamento de pacientes durante 6 meses também, Meert *et al.* (2011) apontou resultado muito semelhantes aos aqui descritos – benefícios para IxS e pCS, mas nenhuma vantagem da terapia de HDF para os níveis de IAA. Embora a melhor remoção do IAA tenha sido reportada posteriormente, em comparação com HD de alto fluxo (Cornelis *et al.*, 2015).

Embora a vantagem da HDF pareça ser bem estabelecida, alguns estudos discordam. Semelhanças na remoção de IxS e pCS (Krieter *et al.*, 2010) foram confirmadas em estudos de curto – 6 semanas (Krieter *et al.*, 2019) e de longo prazo – 12 meses (Snauwaert, Van Biesen, *et al.*, 2019). Dessa forma, mesmo que a comparação de técnicas seja comparável ao presente estudo, outras características podem contribuir para a diversidade de resultado; por exemplo, um dos estudos analisava um número amostral bastante menor (n=14) que o nosso (Krieter *et al.*, 2019), enquanto que o outro estudava populações pediátricas não randomizadas (Snauwaert, Van Biesen, *et al.*, 2019).

3.3.3. EFICIÊNCIA DE HDF PARECE ESTAR ASSOCIADA AO VOLUME CONVECTIVO.

Já que o fluxo convectivo é apontado como uma característica fundamental para a eficiência superior de HDF, subdividimos os dados obtidos para pacientes que dispuseram de fluxos convectivos mais altos e mais baixos (Fig. 14). O limite estabelecido para a divisão foi de 27.5L administrados por sessão. Dessa forma, pode-se observar que as taxas de remoção em alto volume convectivo (VC) são tanto superiores em comparação ao subgrupo geral em HDF quanto em comparação aos valores obtidos em HD (Tabela 5).

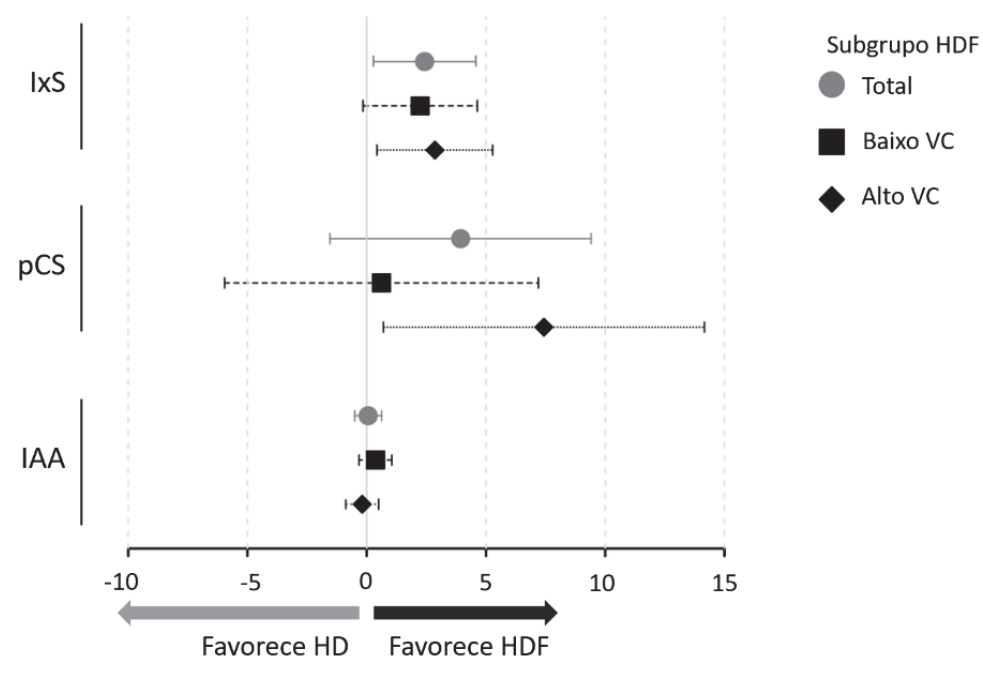
TABELA 5. VARIAÇÃO NAS TAXAS DE REMOÇÃO DE HDF EM RELAÇÃO À HD ENTRE TOXINAS ENTRE. Em todos os casos HDF apresentou maiores taxas de remoção, as quais são ainda maiores quando comparamos o HD com a modalidade com maior volume convectivo (VC) do tratamento de HDF. Dessa forma, todas as taxas, sendo positivas, representam melhor remoção por HDF. A variação geral traz a vantagem da HDF, em todas os volumes convectivos utilizados neste estudo, é maior do que as

taxas obtidas com HD. A vantagem de HDF é ainda maior quando isolamos somente os pacientes que obtiveram alto VC (<27.5 L) em comparação ao HD.

	Variação geral HDF (μM/mês)	Variação alto VC HDF (μM/mês)
IxS (CI 95%)	2,40 (0.30-1.98)	2,86 (0.43 – 5.28)
pCS (CI 95%)	3,94 (9.41– -1.54)	7,43 (0.7 – 14.16)
IAA (CI 95%)	0,06 (0.5 – -0.6)	-0,19 (-0.88 – 0.50)

FONTE: O autor (2021)

FIGURA 14. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE TOXINAS EM HDF E EM SEUS SUBGRUPOS (BAIXO E ALTO VOLUME CONVECTIVO – VC). Valores negativos indicam prejuízo em HDF, portanto, favorecendo HD. O inverso ocorre para valores positivos no eixo X.



FONTE: Modificado de Murilo Guedes - colaborador (2021)

Em tratamentos de HDF, as taxas de remoção de IxS e pCS já foram correlacionadas com o volume convectivo atingido nas sessões (Abad *et al.*, 2016), o mesmo para b2-microglobulina (Brunati *et al.*, 2019). Nesse sentido parece haver um limite mínimo para que as vantagens de um maior volume convectivo sejam percebidos

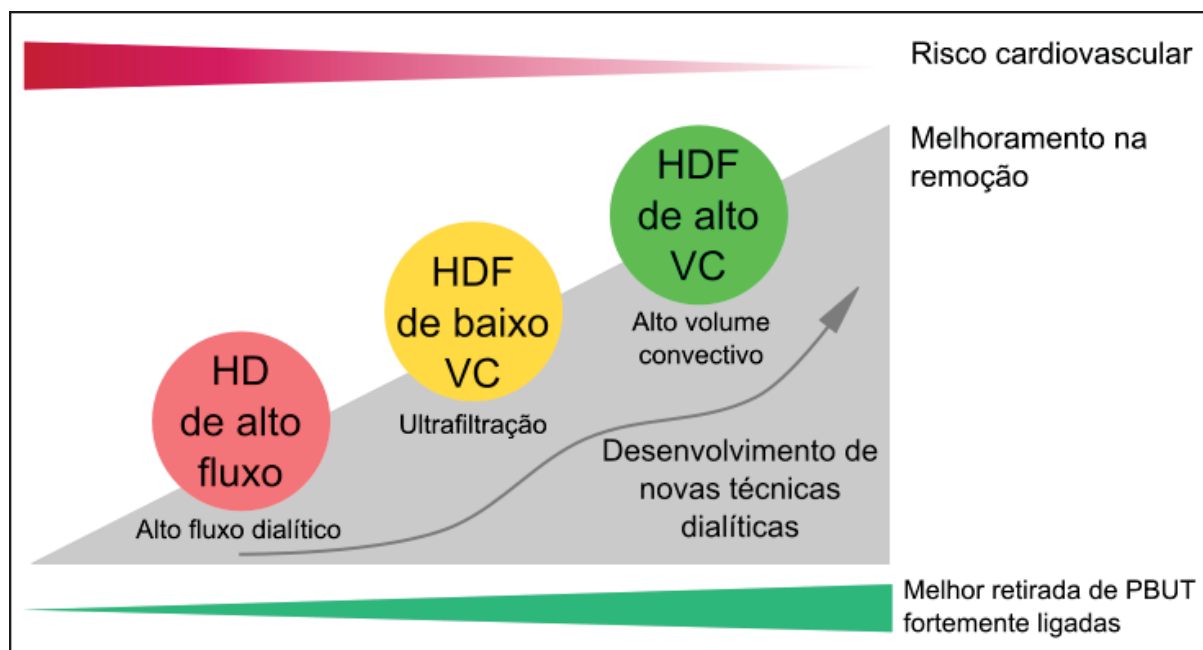
na remoção de toxinas urêmicas, por exemplo, nenhuma correlação foi observada em níveis de toxinas pré-diálise e volumes convectivos aplicados (van Gelder *et al.*, 2020), no entanto, o volume convectivo atingido (17.3 ± 4.3 L) pode ter sido insuficiente para descrever essa relação. Vantagens superiores encontradas aqui na modalidade de HDF, em comparação com demais estudos (Meert *et al.*, 2010; Panichi *et al.*, 2017; Krieter *et al.*, 2019; van Gelder *et al.*, 2020), pode ser decorrente do maior volume convectivo empregado.

Interessantemente, a modalidade de HDF parece oferecer vantagens superiores a toxinas com maiores níveis de afinidade com proteínas, como o IxS e o pCS em comparação com o IAA. Isso pode ser justificado pela menor afinidade do IAA a proteínas (<70%) em comparação aos níveis descritos para IxS e pCS (ambos <90%) (Meert *et al.*, 2010; Deltombe *et al.*, 2015).

De forma geral, a dinâmica de remoção das toxinas urêmicas nas modalidades de diálise testadas pode ser representada pelo esquema a seguir (Fig. 15):

FIGURA 15. RESUMO GRÁFICO DA VARIAÇÃO TOXINAS URÊMICAS DE ACORDO COM A TERAPIA DIALÍTICA EMPREGADA. Influência da escolha da técnica dialítica no balanço de toxinas urêmicas. A eficiência de retirada de toxinas (barra horizontal abaixo) é inversamente proporcional ao risco cardiovascular do paciente renal (barra horizontal acima). Embora pCS seja melhor removido em

comparação com as demais toxinas testadas, a variação do mesmo é muito grande, resultando na perda da significância estatística.



FONTE: O autor (2021)

4. CONCLUSÕES

Este estudo analisou dois contextos distintos dentro da DRC e especialmente quanto à atuação das toxinas urêmicas no estabelecimento, progressão e tratamento da doença. No primeiro capítulo, a incorporação do IAA foi avaliada de forma preliminar. Quanto aos efeitos celulares, pudemos concluir que IAA não afeta a viabilidade de células tubulares proximais renais na faixa de concentração analisada, mesmo após 48h. A exposição das células a 4% de BSA e 0,4% BSA provocaram mudanças de comportamento nas células somente no controle positivo (H_2O_2) não apresentando grande variedade nos efeitos frente à exposição ao IAA. Quanto à incorporação de IAA, a captação de IAA pelas células se mostrou dependente da concentração de IAA adicionado. Embora nossos experimentos suportem dados da literatura de que o IAA realmente utiliza-se de receptores para entrada na célula, outros dados de literatura, como o efeito citotóxico do IAA não puderam ser confirmados. A elucidação dos mecanismos de incorporação de toxinas urêmicas é fundamental para o entendimento do processo de progressão da DRC, auxílio à prescrição medicamentosa e possível utilidade para recomendação nutricional. Além disso, a descrição rigorosa do processo de incorporação e secreção pode oferecer alternativas para a implementação de futuras estratégias de diálise em pacientes que carregam esta doença, como ocorreu com o mecanismo de difusão, por exemplo.

Já no segundo capítulo, observamos que HDF oferece melhores taxas de remoção de IxS , especialmente em volumes convectivos maiores que 27,5 L. Possivelmente essa vantagem possa ser estendida a demais toxinas urêmicas com alta afinidade por proteínas plasmáticas, como o pCS. Dessa forma, a melhor eficiência de remoção destas, e potencialmente outras toxinas urêmicas pode contribuir para a mitigação dos efeitos celulares exercidos por estes compostos. A implementação ou expansão da HDF como tratamento dialítico pode impactar positivamente na qualidade de vida dos pacientes e na diminuição da taxa de mortalidade, principalmente decorrente da doença cardiovascular associada à progressão da DRC no Brasil. A elucidação dos mecanismos de excreção das PBUT pode contribuir para o entendimento e mitigação da progressão da DRC, auxiliar na conduta clínica de tratamento, além de descrever

mecanismos que podem ser utilizados no melhoramento e desenvolvimento de novos tratamentos para a doença.

REFERÊNCIAS

- Abad, S. *et al.* (2016) 'Protein-bound toxins: Added value in their removal with high convective volumes', *Nefrología (English Edition)*. Sociedad Española de Nefrología, 36(6), pp. 637–642. doi: 10.1016/j.nefro.2016.05.011.
- Addi, T. *et al.* (2019) 'Mechanisms of tissue factor induction by the uremic toxin indole-3 acetic acid through aryl hydrocarbon receptor/nuclear factor-kappa B signaling pathway in human endothelial cells', *Archives of Toxicology*. Springer Berlin Heidelberg, 93(1), pp. 121–136. doi: 10.1007/s00204-018-2328-3.
- Aminzadeh, M. A. *et al.* (2013) 'Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(8), pp. 2038–2045. doi: 10.1093/ndt/gft022.
- Aveles, P. R. *et al.* (2010) 'Association between biomarkers of carbonyl stress with increased systemic inflammatory response in different stages of chronic kidney disease and after renal transplantation', *Nephron - Clinical Practice*, 116(4).
- Blum, F. (2014) 'High performance liquid chromatography', *British Journal Of Hospital Medicine*, pp. 18–21. doi: 10.4324/9780203301869_chapter_4.
- Breitsameter, G., Figueiredo, A. E. and Kochhann, D. S. (2012) 'Calculation of Kt/V in haemodialysis: a comparison between the formulas.', *Jornal brasileiro de nefrologia : órgão oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*, 34(1), pp. 22–26. doi: 10.1590/S0101-28002012000100004.
- Brito, J. S. de *et al.* (2019) 'Aryl Hydrocarbon Receptor and Uremic Toxins from the Gut Microbiota in Chronic Kidney Disease Patients: Is There a Relationship between Them?', *Biochemistry*, p. acs.biochem.8b01305. doi: 10.1021/acs.biochem.8b01305.
- Brunati, C. C. M. *et al.* (2019) 'Single session and weekly beta 2-microglobulin removal with different dialytic procedures: Comparison between high-flux standard bicarbonate hemodialysis, post-dilution hemodiafiltration, short frequent hemodialysis with nxstage technology and automated p', *Blood Purification*, 48(1), pp. 86–96. doi: 10.1159/000499830.

- Brunet, P. *et al.* (2011) 'Does uremia cause vascular dysfunction?', *Kidney and Blood Pressure Research*, 34(4), pp. 284–290. doi: 10.1159/000327131.
- Bush, K. T. *et al.* (2017) 'The drug transporter OAT3 (SLC22A8) and endogenous metabolite communication via the gut–liver– kidney axis', *Journal of Biological Chemistry*, 292(38), pp. 15789–15803. doi: 10.1074/jbc.M117.796516.
- Calaf, R. *et al.* (2011) 'Determination of uremic solutes in biological fluids of chronic kidney disease patients by HPLC assay', *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(23), pp. 2281–2286. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.06.014.
- Camacho, O. *et al.* (2016) 'Effect of a sustained difference in hemodialytic clearance on the plasma levels of p-cresol sulfate and indoxyl sulfate', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 31(8), pp. 1335–1341. doi: 10.1093/ndt/gfw100.
- Canaud, B. *et al.* (2006) 'Mortality risk for patients receiving hemodiafiltration versus hemodialysis: European results from the DOPPS', *Kidney International*, pp. 2087–2093. doi: 10.1038/sj.ki.5000447.
- Cernaro, V. *et al.* (2015) 'Auxin induces cell proliferation in an experimental model of mammalian renal tubular epithelial cells', *Renal Failure*, 37(5), pp. 911–913. doi: 10.3109/0886022X.2015.1015683.
- Cha, S. H. *et al.* (2001) 'Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney.', *Molecular pharmacology*, 59(5), pp. 1277–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306713>.
- Cornelis, T. *et al.* (2015) 'Protein-bound uraemic toxins, dicarbonyl stress and advanced glycation end products in conventional and extended haemodialysis and haemodiafiltration', (1), pp. 1–8. doi: 10.1093/ndt/gfv038.
- Črljen, V. *et al.* (2005) 'Immunocytochemical characterization of the incubated rat renal cortical slices', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 450(4), pp. 269–279. doi: 10.1007/s00424-005-1412-8.
- Da Cunha, R. S. *et al.* (2020) 'How do uremic toxins affect the endothelium?', *Toxins*, 12(6), pp. 1–24. doi: 10.3390/toxins12060412.

- Deguchi, T. *et al.* (2004) 'Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney', *Kidney International*, 65(1), pp. 162–174. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00354.x.
- Deguchi, T. *et al.* (2005) 'Renal clearance of endogenous hippurate correlates with expression levels of renal organic anion transporters in uremic rats', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(2), pp. 932–938. doi: 10.1124/jpet.105.085613.
- Deltombe, O. *et al.* (2015) 'Exploring protein binding of uremic toxins in patients with different stages of chronic kidney disease and during hemodialysis', *Toxins*, 7(10), pp. 3933–3946. doi: 10.3390/toxins7103933.
- Deltombe, O. *et al.* (2017) 'Exploring binding characteristics and the related competition of different protein-bound uremic toxins', *Biochimie*, 139, pp. 20–26. doi: 10.1016/j.biochi.2017.05.010.
- Deltombe, O. *et al.* (2019) 'Selective transport of protein-bound uremic toxins in erythrocytes', *Toxins*, 11(7), pp. 1–15. doi: 10.3390/toxins11070385.
- Depner, T. A. (1996) 'Quantifying Hemodialysis', *American Journal of Nephrology*, 16(3), pp. 17–28. Available at: <http://marefateadyan.nashriyat.ir/node/150>.
- Dolenga, C. J. R. (2016) 'DETERMINAÇÃO DE TOXINAS URÊMICAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC)'.
- Dou, L. *et al.* (2007) 'The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(6), pp. 1302–1308.
- Dou, L. *et al.* (2015) 'The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid', *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(4), pp. 876–887. doi: 10.1681/ASN.2013121283.
- Durantón, F., Cohen, G., De Smet, R., *et al.* (2012) 'Normal and pathologic concentrations of uremic toxins', *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(7), pp. 1258–1270. doi: 10.1681/ASN.2011121175.
- Durantón, F., Cohen, G., Smet, R. De, *et al.* (2012) 'Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins', *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(7),

pp. 1258–1270. doi: 10.1681/ASN.2011121175.

Favretto, G. *et al.* (2017) 'Role of Organic Anion Transporters in the Uptake of Protein-Bound Uremic Toxins by Human Endothelial Cells and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression', *Journal of Vascular Research*, 54(3), pp. 170–179. doi: 10.1159/000468542.

Fedorova, M., Bollineni, R. C. and Hoffmann, R. (2013) 'PROTEIN CARBONYLATION AS A MAJOR HALLMARK OF OXIDATIVE DAMAGE: UPDATE OF ANALYTICAL STRATEGIES', *Wiley Periodicals*, (i), pp. 221–235. doi: 10.1002/mas.

van Gelder, M. K. *et al.* (2020) 'Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients relate to residual kidney function, are not influenced by convective transport, and do not relate to outcome', *Toxins*, 12(4). doi: 10.3390/toxins12040234.

Gonzalez-Parra, E. *et al.* (2014) 'Individualization of dialysate calcium concentration according to baseline pre-dialysis serum calcium', *Blood Purification*, 38(3–4), pp. 224–233. doi: 10.1159/000366126.

Grooteman, M. P. C. *et al.* (2012) 'Effect of online hemodiafiltration on all-cause mortality and cardiovascular outcomes', *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(6), pp. 1087–1096. doi: 10.1681/ASN.2011121140.

Guedes, M. *et al.* (2021) 'Achieving high convective volume in hemodiafiltration: Lessons learned after successful implementation in the HDFit trial', *Hemodialysis International*, 25(1), pp. 50–59. doi: 10.1111/hdi.12891.

Ichii, O. *et al.* (2014) 'Podocyte injury caused by indoxyl sulfate, a uremic toxin and aryl-hydrocarbon receptor ligand', *PLoS ONE*, 9(9), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0108448.

Itoh, Y. *et al.* (2012) 'Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(7), pp. 1841–1850. doi: 10.1007/s00216-012-5929-3.

Jones, C. B. and Bargman, J. M. (2018) 'Should we look beyond Kt/V urea in assessing dialysis adequacy?', *Seminars in Dialysis*, 31(4), pp. 420–429. doi: 10.1111/sdi.12684.

- Joossens, M. *et al.* (2018) 'Gut microbiota dynamics and uraemic toxins: one size does not fit all', *Gut*, 0(0), p. gutjnl-2018-317561. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317561.
- Kojima, R. *et al.* (2002) 'Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney.', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 13(4), pp. 848–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11912243>.
- Krieter, D. H. *et al.* (2010) 'Protein-bound uraemic toxin removal in haemodialysis and post-dilution haemodiafiltration', *Nephrol Dial Transplant*, pp. 212–218. doi: 10.1093/ndt/gfp437.
- Krieter, D. H. *et al.* (2019) 'Differences in dialysis efficacy have limited effects on protein-bound uremic toxins plasma levels over time', *Toxins*, 11(1). doi: 10.3390/toxins11010047.
- Lekawanvijit, S. *et al.* (2012) 'Cardiorenal syndrome: The emerging role of protein-bound uremic toxins', *Circulation Research*, 111(11), pp. 1470–1483. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.278457.
- Lin, C. L. *et al.* (2001) 'Long-term on-line hemodiafiltration reduces predialysis beta-2-microglobulin levels in chronic hemodialysis patients', *Blood Purification*, 19(3), pp. 301–307. doi: 10.1159/000046958.
- Ling, X. C. and Kuo, K. L. (2018) 'Oxidative stress in chronic kidney disease', *Renal Replacement Therapy. Pediatric Nephrology*, 4(1). doi: 10.1186/s41100-018-0195-2.
- Liu, Y. (2004) 'Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention', *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(1), pp. 1–12. doi: 10.1097/01.ASN.0000106015.29070.E7.
- de Loor, H. *et al.* (2016) 'A liquid chromatography – tandem mass spectrometry method to measure a selected panel of uremic retention solutes derived from endogenous and colonic microbial metabolism', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier Ltd, 936, pp. 149–156. doi: 10.1016/j.aca.2016.06.057.
- Lornoy, W. *et al.* (2000) 'On-line haemodiafiltration. Remarkable removal of β 2-microglobulin. Long-term clinical observations', *Nephrology Dialysis Transplantation*,

15(suppl_1), pp. 49–54. doi: 10.1093/oxfordjournals.ndt.a027964.

Lowenstein, J. and Grantham, J. J. (2017) 'Residual renal function: a paradigm shift', *Kidney International*. Elsevier Inc, 91(3), pp. 561–565. doi: 10.1016/j.kint.2016.09.052.

Maduell, F. (2005) 'Hemodiafiltration', pp. 47–55.

Meert, N. *et al.* (2009) 'Effective removal of protein-bound uraemic solutes by different convective strategies: A prospective trial', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(2), pp. 562–570. doi: 10.1093/ndt/gfn522.

Meert, N. *et al.* (2010) 'Prospective Evaluation of the Change of Predialysis Protein-Bound Uremic Solute Concentration With Postdilution Online Hemodiafiltration', *Artif Organs*, 34(7), pp. 580–585. doi: 10.1111/j.1525-1594.2010.01005.x.

Meert, N. *et al.* (2011) 'Comparison of removal capacity of two consecutive generations of high-flux dialysers during different treatment modalities', *Nephrol Dial Transplant*, (February), pp. 2624–2630. doi: 10.1093/ndt/gfq803.

Meyer, T. W. and Hostetter, T. H. (2007) 'Uremia', *The New England Journal of Medicine*, 357, pp. 1316–25. doi: 10.1056/NEJMra071313.

Miyamoto, Y. *et al.* (2011) 'Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(8), pp. 2498–2502. doi: 10.1093/ndt/gfq785.

Motojima, M. *et al.* (2002) 'Uraemic toxins induce proximal tubular injury via organic anion transporter 1-mediated uptake', *British Journal of Pharmacology*, 135(2), pp. 555–563. doi: 10.1038/sj.bjp.0704482.

Motojima, M. *et al.* (2003) 'Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF- κ B and free radical in proximal tubular cells', pp. 1671–1680.

Mutsaers, H. A. M. *et al.* (2013) 'Uremic toxins inhibit renal metabolic capacity through interference with glucuronidation and mitochondrial respiration', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1832(1), pp. 142–150. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.09.006.

Nawata, C. M. and Pannabecker, T. L. (2018) 'Mammalian urine concentration: a review

of renal medullary architecture and membrane transporters', *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. Springer Berlin Heidelberg, 188(6), pp. 899–918. doi: 10.1007/s00360-018-1164-3.

Neves, P. D. M. de M. *et al.* (2020) 'Censo Brasileiro de Diálise: análise de dados da década 2009-2018', *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 42(2), pp. 191–200. Available at: <https://doi.org/2175-8239-JBN-2019-0234>.

Niwa, T. and Shimizu, H. (2012) 'Indoxyl Sulfate Induces Nephrovascular Senescence', *Journal of Renal Nutrition*. National Kidney Foundation, Inc., 22(1), pp. 102–106. doi: 10.1053/j.jrn.2011.10.032.

Nubé, M. J. *et al.* (2017) 'Mortality reduction by post-dilution online-haemodiafiltration: A cause-specific analysis', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 32(3), pp. 548–555. doi: 10.1093/ndt/gfw381.

Ok, E. *et al.* (2013) 'Mortality and cardiovascular events in online haemodiafiltration (OL-HDF) compared with high-flux dialysis: Results from the Turkish OL-HDF Study', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(1), pp. 192–202. doi: 10.1093/ndt/gfs407.

Panichi, V. *et al.* (2017) 'Long term variation of serum levels of uremic toxins in patients treated by post-dilution high volume on-line hemodiafiltration in comparison to standard low-flux bicarbonate dialysis: results from the REDERT study', *Journal of Nephrology*. Springer International Publishing, 30(4), pp. 583–591. doi: 10.1007/s40620-017-0381-2.

Pastan, S. and Bailey, J. (1998) 'The hemodialysis procedure', *The New England Journal of Medicine*, pp. 1428–1437.

Patrier, L. *et al.* (2013) 'FGF-23 removal is improved by on-line high-efficiency hemodiafiltration compared to conventional high flux hemodialysis', *Journal of Nephrology*, 26(2), pp. 342–349. doi: 10.5301/jn.5000150.

Pecoits-Filho, R. *et al.* (2019) 'Study Design and Baseline Characteristics of the Impact of HemoDiaFiltration on Physical Activity and Self-Reported Outcomes: A Randomized Controlled Trial (HDFIT Trial) in Brazil', *BMC Nephrology*, pp. 1–13.

Pedrini, L. A. *et al.* (2011) 'Long-term effects of high-efficiency on-line haemodiafiltration on uraemic toxicity . A multicentre prospective randomized study', (January), pp. 2617–

2624. doi: 10.1093/ndt/gfq761.

Petejova, N. *et al.* (2019) 'Acute toxic kidney injury', *Renal Failure*. Taylor & Francis, 41(1), pp. 576–594. doi: 10.1080/0886022X.2019.1628780.

Pieniazek, A. *et al.* (2018) 'Alterations in conformational state of albumin in plasma in chronic hemodialyzed patients', *PLoS ONE*, 13(3), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0192268.

Popkov, V. A. *et al.* (2019) 'Mitochondria as a source and a target for uremic toxins', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). doi: 10.3390/ijms20123094.

Poveda, J. *et al.* (2014) 'P-Cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(1), pp. 56–64. doi: 10.1093/ndt/gft367.

Provenzano, M. *et al.* (2019) 'Epidemiology of cardiovascular risk in chronic kidney disease patients: The real silent killer', *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 20(4), pp. 209–220. doi: 10.31083/J.RCM.2019.04.548.

Race, J. E. *et al.* (1999) 'Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3)', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255(2), pp. 508–514. doi: 10.1006/bbrc.1998.9978.

Ratliff, B. B. *et al.* (2016) 'Oxidant mechanisms in renal injury and disease', *Antioxidants and Redox Signaling*, 25(3), pp. 119–146. doi: 10.1089/ars.2016.6665.

Rodrigues, S. D. *et al.* (2020) 'Uremic toxins promote accumulation of oxidized protein and increased sensitivity to hydrogen peroxide in endothelial cells by impairing the autophagic flux', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 523(1), pp. 123–129. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.022.

Roth, M., Obaidat, A. and Hagenbuch, B. (2012) 'OATPs, OATs and OCTs: The organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies', *British Journal of Pharmacology*, 165(5), pp. 1260–1287. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x.

Sekine, T., Miyazaki, H. and Endou, H. (2006) 'Molecular physiology of renal organic anion transporters', *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 290(2), pp. 251–

261. doi: 10.1152/ajprenal.00439.2004.

Sharma, K. *et al.* (2013) 'Metabolomics Reveals Signature of Mitochondrial Dysfunction in Diabetic Kidney Disease', *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(11), pp. 1901–1912. doi: 10.1681/ASN.2013020126.

Shroff, R. *et al.* (2019) 'Effects of hemodiafiltration versus conventional hemodialysis in children with ESKD: The HDF, heart and height study', *Journal of the American Society of Nephrology*, 30(4), pp. 678–691. doi: 10.1681/ASN.2018100990.

Sirich, T. L. *et al.* (2014) 'Protein-Bound Molecules: A Large Family With a Bad Character', *Seminars in Nephrology*. Elsevier, 34(2), pp. 106–117. doi: 10.1016/j.semnephrol.2014.02.004.

Snauwaert, E., Van Biesen, W., *et al.* (2019) 'Haemodiafiltration does not lower protein-bound uraemic toxin levels compared with haemodialysis in a paediatric population', *Nephrology Dialysis Transplantation*, pp. 1–9. doi: 10.1093/ndt/gfz132.

Snauwaert, E., Holvoet, E., *et al.* (2019) 'Uremic Toxin Concentrations are Related to Residual Kidney Function in the Pediatric', (April).

Steffgen, J. *et al.* (1999) 'Expression cloning and characterization of a novel sodium-dicarboxylate cotransporter from winter flounder kidney', *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), pp. 20191–20196. doi: 10.1074/jbc.274.29.20191.

Stockler-Pinto, M. B. *et al.* (2018) 'From bench to the hemodialysis clinic: protein-bound uremic toxins modulate NF- κ B/Nrf2 expression', *International Urology and Nephrology*. Springer Netherlands, 50(2), pp. 347–354. doi: 10.1007/s11255-017-1748-y.

Tonelli, M., Karumanchi, S. A. and Thadhani, R. (2016) 'Epidemiology and mechanisms of uremia-related cardiovascular disease', *Circulation*, 133(5), pp. 518–536. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018713.

Tsujimoto, M. *et al.* (2012) 'Influence of Serum in Hemodialysis Patients on the Expression of Intestinal and Hepatic Transporters for the Excretion of Pravastatin', *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 16(6), pp. 580–587. doi: 10.1111/j.1744-9987.2012.01100.x.

Vanholder, R. *et al.* (2003a) 'Review on uremic toxins: Classification, concentration, and

interindividual variability', *Kidney International*, 63(5), pp. 1934–1943. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x.

Vanholder, R. *et al.* (2003b) 'Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability', *Kidney International*, 63(5), pp. 1934–1943. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x.

Vaziri, N. D. *et al.* (2013) 'Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 83(2), pp. 308–315. doi: 10.1038/ki.2012.345.

Watanabe, H. *et al.* (2014) 'Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p-cresyl sulfate, a uremic toxin', *Clinical and Experimental Nephrology*, 18(5), pp. 814–820. doi: 10.1007/s10157-013-0902-9.

Webster, A. C. *et al.* (2017) 'Chronic Kidney Disease', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 389(10075), pp. 1238–1252. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32064-5.

Wikoff, W. R. *et al.* (2012) 'Key structural features for substrate binding to organic anion transporter 1 (Oat1; slc22a6) identified by global untargeted metabolomics of Oat1null plasma', *J Proteome Res.*, 29(6), pp. 997–1003. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

Wu, P.-H. *et al.* (2020) 'Association between Circulation Indole-3-Acetic Acid Levels and Stem Cell Factor in Maintenance Hemodialysis Patients: A Cross-Sectional Study', *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), p. 124. doi: 10.3390/jcm9010124.

Wu, W., Bush, K. T. and Nigam, S. K. (2017) 'Key Role for the Organic Anion Transporters, OAT1 and OAT3, in the in vivo Handling of Uremic Toxins and Solutes', *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-017-04949-2.

Yu, S. *et al.* (2017) 'Interaction of human serum albumin with uremic toxins: A thermodynamic study', *RSC Advances*, 7(45), pp. 27913–27922. doi: 10.1039/c7ra02838e.

Zhang, H. *et al.* (2018) 'Indoxyl sulfate accelerates vascular smooth muscle cell calcification via microRNA-29b dependent regulation of Wnt/ β -catenin signaling', *Toxicology Letters*. Elsevier, 284(November 2017), pp. 29–36. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.11.033.

Zhao, L. *et al.* (2015) 'Combination of cytokinin and auxin induces apoptosis, cell cycle progression arrest and blockage of the Akt pathway in HeLa cells', *Molecular Medicine Reports*, 12(1), pp. 719–727. doi: 10.3892/mmr.2015.3420.

ANEXO 1 – DETALHAMENTO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS

FIGURA 16. DETALHAMENTO DOS MÉTODOS DE HPLC UTILIZADAS NESTE TRABALHO. A linha em vermelho representa a variação na porcentagem de injeção de metanol (eixo Y à direita) no sistema e os respectivos momentos (em minutos – eixo X) O formiato de amônio era injetado de forma complementar ao metanol, ou seja, quando metanol representava 35 % da fase móvel, por exemplo, o formiato representava os outros 65 %, e assim por diante ao longo das variações descritas abaixo. A. Método 24.1 meert 2011 IS PCS IAA (10.07.2015). Este método foi utilizado para a análise das amostras de plasma e da respectiva curva de calibração. B. Método Cell v1 (11.12.2018). Este método foi utilizado para a análise das amostras de extratos celulares.

FONTE: O autor (2021)

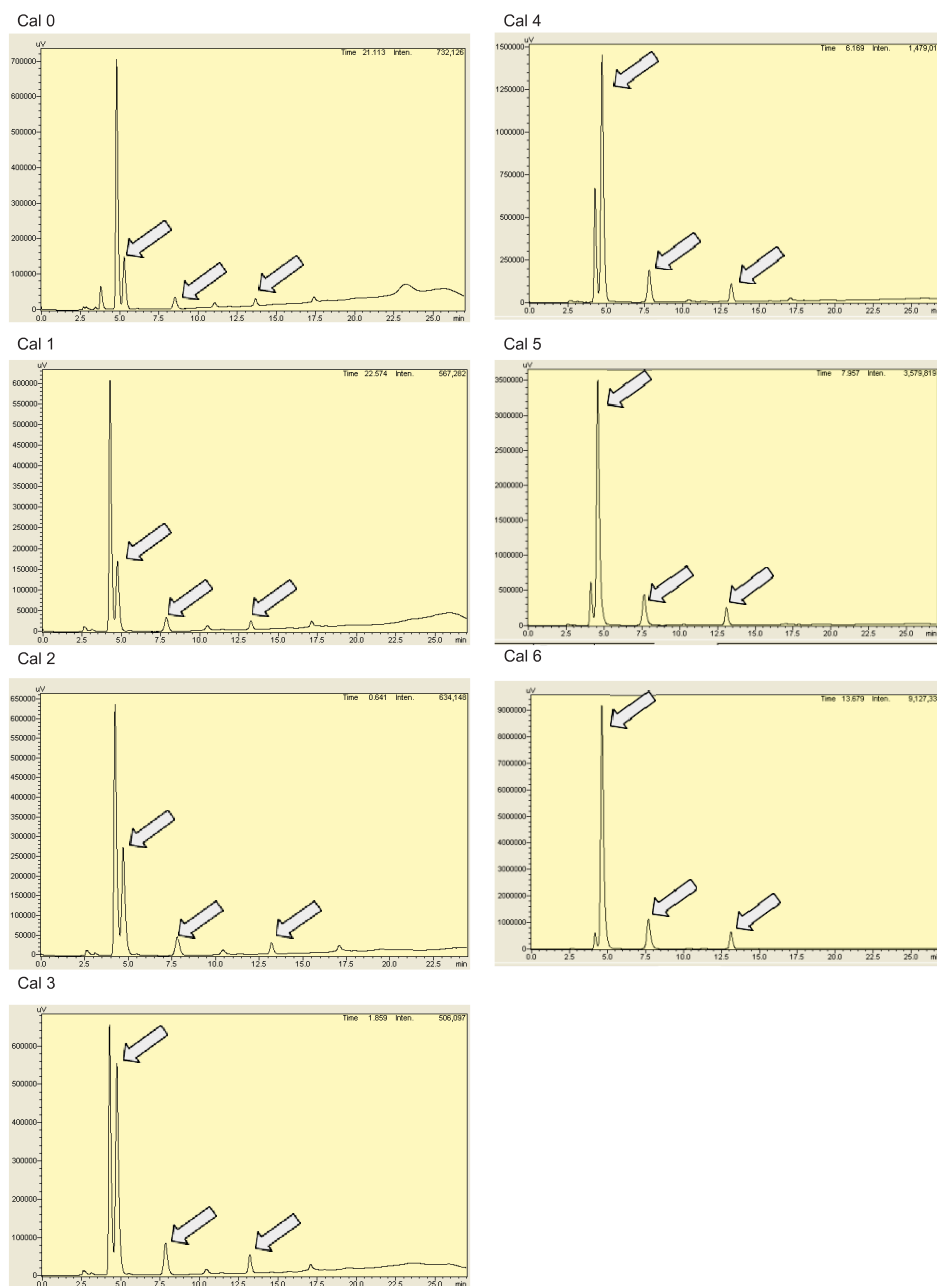
TABELA 6. DESCRITIVO DETALHADO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE UTILIZADOS. Ambos os métodos utilizados eram realizados em fluxo 0,7 ml/min em variação do tipo gradiente. Também, ambos os métodos utilizavam os mesmos tipos de fase móvel e fase estacionária, sendo formiato de amônio 50 mM pH 3,5 associado a metanol 100 % e coluna de carbono C8. A fase móvel era constituída da combinação de formiato de amônio e metanol, dessa forma, quando metanol representava 35 % da fase móvel, o formiato representava os outros 65 %, e assim por diante ao longo das variações descritas abaixo.

Método utilizado	24.1 Meert 2011 IS, PCS, IAA 10.07.2015	Cell V1 11.12.2018
Tempo de duração (min)	33	27
Variação Metanol (%)	35 – 70	25 – 70
Ciclos emissão-excitação (nm)	380-283 / 290-265 / 380-283	380-283 / 290-265 / 380-283
Tempos dos ciclos de emissão-excitação (min)	0:01 / 6:50 / 10:00	0:01 / 9:30 / 13:00
Rampa ascendente (min)	0:01 – 18:00	0:01 – 9:00
Platô intermediário (min)	x	09:00 – 13:00
Rampa descendente (min)	18:01 – 28:00	13:01 – 14:00
Platô final (min)	28:01 – 33:00	14:01 – 27:00

FONTE: O autor (2021)

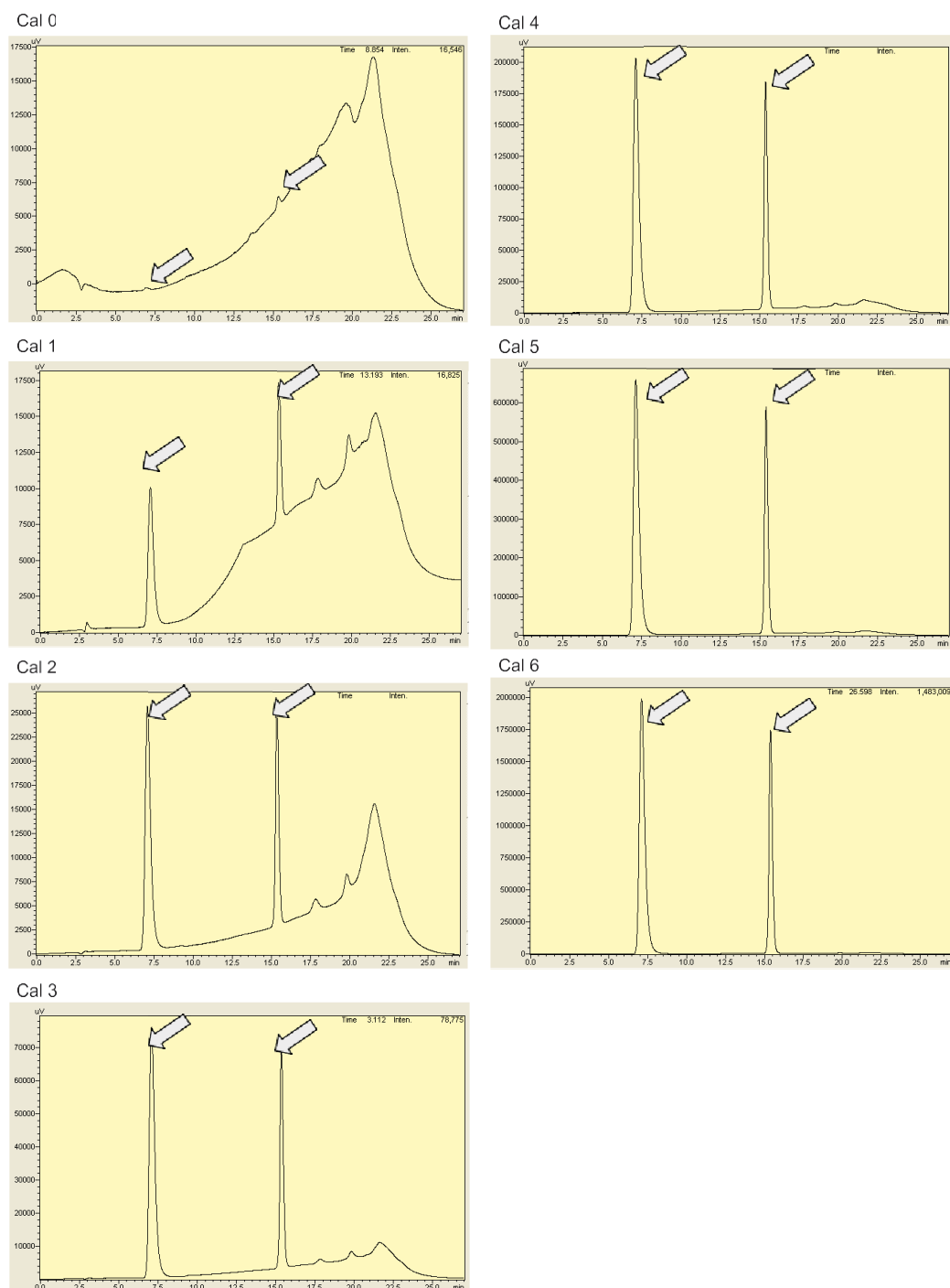
ANEXO 2 – DETALHAMENTO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS

FIGURA 17. DETALHAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZADA PARA ANÁLISES EM PLASMA. Os gráficos individualizados representam os calibradores de cada nível, sendo o calibrador 6 o mais alto e representando a injeção de 1100, 1830 e 110 pmol de cada uma das toxinas analisadas, Ixs, pCS e IAA, representados pelas setas da esquerda para a direita, respectivamente. Todos os calibradores foram analisados pelo método Cell V1, descrito anteriormente. Análises realizadas em 07/05/2019.



FONTE: O autor (2021)

FIGURA 18. DETALHAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZADA PARA ANÁLISES EM EXTRATOS CELULARES. Os gráficos individualizados representam os calibradores de cada nível, sendo o calibrador 6 o mais alto e representando a injeção de 100 pmol de cada uma das toxinas analisadas, Ixs e IAA, representados pelas setas da esquerda para a direita, respectivamente. Todos os calibradores foram analisados pelo método Cell V1, descrito anteriormente. Análises realizadas em 29/01/2021.



FONTE: O autor (2021)