

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO, DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

PAULO ROBERTO AVELES

**ANÁLISE DE MARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

CURITIBA

2008

PAULO ROBERTO AVELES

**ANÁLISE DE MARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

**Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre, ao Curso de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho

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

CURITIBA

2008

PAULO ROBERTO AVELES

**ANÁLISE DE MARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:

Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho
(Pontifícia Universidade Católica do Paraná)

Membros:

Prof. Dr. Vinícius Delfino
(Universidade Estadual de Londrina)

Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira
(Pontifícia Universidade Católica do Paraná)

Suplente:

Prof. Dr. Carlos Aita
(Pontifícia Universidade Católica do Paraná)

Curitiba

2008

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

A948a Aveles, Paulo Roberto
2008 Análise de marcadores plasmáticos de estresse oxidativo em pacientes com
doença renal crônica / Paulo Roberto Aveles ; orientador, Roberto Pecoits-Filho
; co-orientadora, Lja Sumie Nakao. -- 2008.
viii, 60 f. ; il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2008
Bibliografia: 43-44

1. Insuficiência renal crônica. 2. Stress oxidativo. 3. Rins - Transplante.
I. Pecoits Filho, Roberto. II. Nakao, Lja Sumie. III. Pontifícia Universidade
Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDD 20. ed. – 610

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Roberto Pecoits, meu orientador, por sua confiança, disposição, inteligência e capacidade de pesquisa. Provavelmente não teria conseguido sem "você". Meu muito obrigado.

À minha mãe Maria que nunca mediu esforços me apoiando e incentivando na minha formação. Amo você.

À minha namorada Tatiana Gariba, minha companheira de todas as horas, que esta sempre ao meu lado. Obrigado pelo carinho, apoio e compreensão. Amo você.

Às minhas irmãs Cristina e Jeovana por sempre me apoiarem. Amo vocês.

À Professora Dr.^a Lia Nakao, minha co-orientadora, que deu todo apoio e embasamento teórico e técnico para o desenvolvimento da metodologia aplicada. Meu muito obrigado.

Ao Mestre Ciro Criminácio que me ajudou no desenvolvimento da metodologia e deu dicas importantes.

Aos Mestres Dr.^a Simone Gonçalves e Dr. Alexandre Bignelli que colheram as amostras dos pacientes com DRC, e Transplante, valeu pela força.

Ao Dr. Paulo Fortes que sempre me ajudou com os programas Endnote e JMP.

À Dr.^a Glaci Zancan, professora da graduação, que me inspirou e despertou o interesse pela pesquisa.

A todos os amigos e colegas do laboratório de pesquisa, que colaboraram direta ou indiretamente, pela força e companheirismo. Obrigado.

RESUMO

Introdução: A doença renal crônica (DRC) é caracterizada por uma progressiva perda de função renal, que é acompanhada por acúmulo de toxinas urêmicas e um potencial desequilíbrio redox com geração de pró-oxidantes. Este estresse oxidativo, juntamente com a inflamação crônica resultam em complicações nesta população. O objetivo deste estudo foi analisar os níveis de tióis (indicador da capacidade de anti-oxidante) e carbonilas (um marcador de estresse oxidativo) no plasma e sua associação com a função renal e sinais de inflamação em pacientes com DRC. **Pacientes e métodos:** Um grupo de 68 pacientes com DRC em fase pré-dialítica (estágios 2-5; idade média 57 ± 12 anos, 46% do sexo masculino, 34% diabéticos) e um outro grupo de 21 pacientes submetidos ao transplante renal (idade média de 36 ± 17 anos, 50% do sexo masculino, 10% diabéticos e 9 ± 2 meses após o transplante renal) foram incluídos no estudo. Níveis plasmáticos de tióis e carbonilas foram determinados no plasma pelos métodos DTNB e DNPH, respectivamente, e as concentrações foram ajustadas pela albumina plasmática. Níveis de fibrinogênio (Fib) e proteína C reativa (PRC) foram calculados por métodos de rotina e usados como marcadores da inflamação. **Resultados:** A média de TFG no grupo pré-diálise foi de 48ml/min, e houve uma correlação positiva entre TFG e tiol ($r=0,25$, $p < 0,05$) e uma correlação negativa entre TFG e carbonila ($r=0,26$, $p < 0,05$), fibrinogênio ($r = -0,45$, $p < 0,0001$) e CRP ($r = -0,14$, $p = ns$). A concentração de carbonilas se correlacionou com os níveis de CRP ($r=0,49$, $p < 0,0001$) e de fibrinogênio ($r=0,30$, $p < 0,01$). Quanto ao segundo grupo de pacientes, houve uma significativa redução das carbonilas no plasma após o transplante renal ($1,4 \pm 0,4$ nmol/mg de albumina) comparado com os níveis antes do procedimento ($2,0 \pm 1,4$ nmol/mg de albumina, $p < 0,05$). Em paralelo, os níveis de tiol caíram após o transplante (15 ± 4 nmol/mg de albumina), comparados aos níveis no período basal (21 ± 5 nmol/mg de albumina, $p < 0,001$). Além disso, houve uma significativa correlação entre CRP e carbonila após o transplante ($r=0,65$, $p < 0,005$). **Conclusão:** Foi observado que pacientes com DRC apresentam estado redox alterado e sinais de estresse oxidativo aumentado, de forma proporcional à disfunção renal, o que foi parcialmente corrigido após transplante renal. Estes achados indicam a potencial importância da função renal nas complicações de DRC relacionadas ao estresse oxidativo e inflamação.

ABSTRACT

Background: Chronic kidney disease (CKD) is characterized by a progressive kidney dysfunction, which is accompanied by uremic toxin accumulation and a potential disequilibrium between the redox status and the generation of pro-oxidants, generating oxidative stress and chronic inflammation, which is associated with complications (particularly cardiovascular) in this population. We aimed to analyze the concentration of total plasma thiols (indicator of anti-oxidant capacity) and the protein carbonyl content (a marker of oxidative stress) in relation to kidney function and signs of inflammation in a group of patients with CKD. **Patients and methods:** A group of 68 patients with CKD (stages 2-5; mean age of 57 ± 12 year, 46% male, 34% diabetics) and another group of 21 patients who underwent a living donor kidney transplant (mean age of 36 ± 17 year 50% male, 10% diabetics and 9 ± 2 months after renal transplant) were included in the study. Total plasma thiols and protein carbonyl levels were determined by the DTNB and DNPH methods, respectively and were adjusted to the plasma albumin concentrations. Plasma levels of fibrinogen (Fib) and C-reactive protein (CRP) were measured by routine methods and used as markers of inflammation. **Results:** Mean GFR was 48mL/min, and there was a positive correlation between GFR and Th ($r=0.25$, $p<0.05$) and a negative correlation between GFR and Carbonyl ($r=-0.26$, $p<0.05$), Fibrinogen ($r=-0.45$, $p<0.0001$) and CRP ($r=-0.14$, $p=ns$). Carbonyl strongly correlated to CRP (0.49, $p<0.0001$) and to Fibrinogen (0.30, $p<0.01$). There was a significant reduction in plasma Carbonyl after renal transplant (1.4 ± 0.4 nmol/mg de alb.), compared with the levels before the procedure (2.0 ± 1.4 nmol/mg de alb., $p<0.05$), which parallel a improvement in thiol levels (15 ± 4 μ M /g de alb., vs 21 ± 5 μ M /g de alb., $p<0.001$). In addition, there was a significant correlation between CRP and Carb after the transplant ($r=0.65$; $p<0.005$). **Conclusion:** In conclusion, we observed that patients with CKD present an altered redox status and increased signs of oxidative stress and inflammatory activity as kidney function deteriorates, which was partially but significantly improved after renal transplant. These findings indicate the importance of renal function in the complications of CKD related to oxidative stress and inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

DCV	- Doença cardiovascular (<i>cardiovascular disease</i>)
DNPH	- (2,4-Dinitrofenilhidrazina)
DRC	- Doença renal crônica (<i>chronic kidney disease</i>)
DTNB	- (5,5´ - Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid))
ERN	- Espécies reativas de nitrogênio
ERO	- Espécies reativas de oxigênio
EO	- Estresse oxidativo
GSH-Px	- Glutaciona-peroxidase
GSH-Rd	- Glutaciona-redutase
GSH	- Glutaciona reduzida
HAS	- Hipertensão arterial sistêmica
MPO	- Mieloperoxidase
PCR	- Proteína C-reativa (<i>C-reactive protein</i>)
RLs	- Radicais livres
SOD	- Superóxido-dismutase
TFG/GFR	- Taxa de filtração glomerular (<i>glomerular filtration rate</i>)
Tx	- Transplante renal (<i>Kidney transplant</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS	3
2.2	SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE	5
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO	6
2.4	BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	8
2.5	EFEITOS BIOLÓGICOS DO ESTRESSE OXIDATIVO	10
3	OBJETIVOS	13
4	DESENVOLVIMENTO	14
4.1.	POPULAÇÃO E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	14
4.1.1.	<i>Análise de marcadores de estresse oxidativo em diversas fases da DRC</i>	14
4.1.2.	<i>Análise de marcadores de estresse oxidativo em pacientes no estágio 5 da DRC antes e após o transplante renal</i>	14
4.2.	MÉTODOS LABORATORIAIS PARA MENSURAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO(32)	15
4.2.1.	<i>Determinação de tióis no plasma</i>	15
4.2.2.	<i>Dosagem de carbonilas no plasma</i>	17
5	ARTIGO	19
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
7	CONCLUSÕES	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível das funções (glomerular, tubular e endócrina) dos rins. Segundo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Nefrologia⁽¹⁾, a DRC pode ser classificada em estágios de 1 a 5, de acordo com a estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG). Em sua fase mais avançada, os rins não conseguem mais manter a homeostasia do organismo, gerando consequências clínicas deletérias para os pacientes, decorrentes da toxicidade dos compostos acumulados pela queda da TFG. Neste momento, as opções terapêuticas de reposição da função renal são os métodos de depuração artificial do sangue (diálise peritoneal ou hemodiálise) ou o transplante renal.

Pacientes com DRC, quando comparados a população geral, apresentam uma elevada mortalidade, especialmente em decorrência da doença cardiovascular (DCV)⁽²⁾. Uma potencial justificativa para esta observação seria a alta prevalência de fatores de risco tradicionais para DCV como a idade avançada, obesidade, diabetes, hipertensão arterial, hipertrofia de ventrículo esquerdo e dislipidemia. Porém, esses fatores de risco não são suficientes para justificar a elevada mortalidade por DCV⁽²⁾, e fatores de risco não-tradicionais e fatores de risco peculiares à uremia vem se tornando importantes ferramentas para a identificação dos mecanismos específicos da DCV na DRC, o que potencialmente gera interessantes alvos para intervenções no futuro.

A prevalência destes fatores de risco não-tradicionais aumenta à medida que a função renal diminui. Dentre eles, a anemia, os distúrbios do metabolismo mineral, a sobrecarga de volume, a dislipidemia, a desnutrição, a inflamação crônica e especialmente o estresse oxidativo têm sido associados a uma maior mortalidade cardiovascular⁽³⁾. Nos últimos anos tem sido grande o interesse no estresse oxidativo como fator associado à patogênese de doenças degenerativas, desencadeado por uma série de eventos em resposta a estímulos pró-inflamatórios e pró-oxidantes ou da redução da capacidade antioxidante⁽⁴⁾. Para um claro entendimento da importância do estresse oxidativo na fisiopatologia de doenças degenerativas (e especialmente das complicações da

DRC) é necessário que se definam conceitos de geração de espécies reativas, defesas antioxidantes e estresse oxidativo, bem como seus potenciais efeitos biológicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS

A presença de elétrons não-pareados em átomos ou moléculas aumenta a sua reatividade química, por tenderem a acoplar o elétron não-pareado com um outro que esteja presente em estruturas próximas a sua formação. Desta forma, tais átomos ou moléculas podem compartilhar-se como receptores (*oxidantes*) ou como doadores (*redutores*) de elétrons⁽⁵⁾. Esse fenômeno ocorre especialmente em átomos de oxigênio, nitrogênio, carbono, hidrogênio, enxofre ou átomos de metais de transição, gerando espécies reativas. As espécies reativas de maior relevância biológica são as de oxigênio e de nitrogênio, ocorrendo tanto de forma contínua a partir do metabolismo mitocondrial quanto de forma induzida como componente do sistema imune inato. Estas reações são catalisadas principalmente por quatro vias enzimáticas (NADPH oxidase, superóxido dismutase, óxido nítrico sintase e mieloperoxidase) para produzir as espécies intermediárias no processo de defesa do organismo contra agressões. Os principais indutores da produção de espécie reativas são os microrganismos fagocitados, porém qualquer agressão ao organismo é capaz de desencadear a produção de espécies reativas⁽⁴⁾.

O oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas de oxigênio (ERO) em qualquer sistema biológico, seja por absorção de energia, seja por transferência de elétrons. Pelo fato de a molécula de oxigênio possuir dois elétrons livres nos orbitais, o oxigênio reage preferencialmente com moléculas de configuração eletrônica semelhante. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. Durante esse processo de quatro etapas (figura 1), são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons^(4, 6). Uma outra

via de formação de ERO de importância biológica consiste na redução unieletrônica do oxigênio à água, na qual a entrada de quatro elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento de EROs⁽⁴⁾.

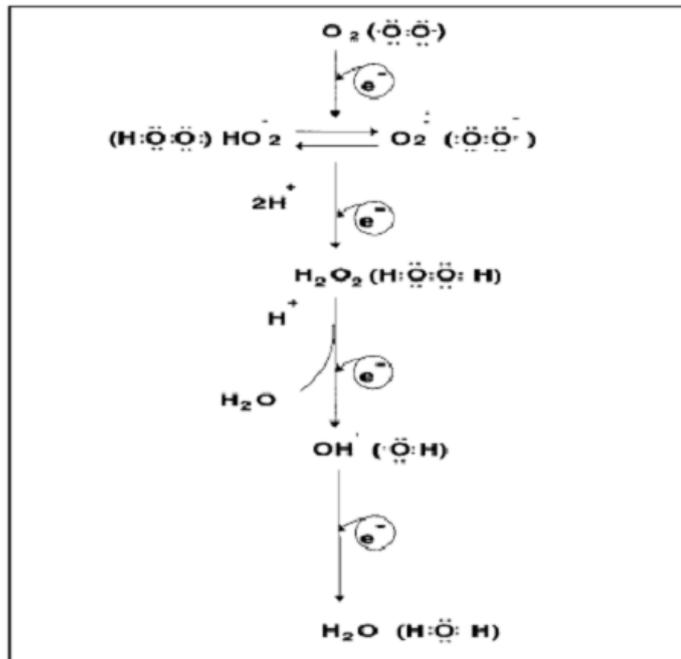


Figura 1 - Redução tetraeletrônica do oxigênio molecular (O_2) até a formação da água (H_2O)⁽⁷⁾

O radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) é formado após a primeira redução do oxigênio. O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas sendo produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (seja enzimático, fagocítico ou químico). Já o radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) representa a forma protonada do radical superóxido. Existem evidências de que a hidroperoxila é mais reativa que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas. Porém, o radical hidroxila (OH^{\cdot}) é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do OH^{\cdot} com metais, moléculas ou outros radicais no próprio local onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Apesar do peróxido de hidrogênio não ser um radical livre, é um metabólito deletério, porque é precursora do radical OH^{\cdot} (4, 6, 8).

Outro grupo de espécies reativas importante no processo de geração de estresse oxidativo com conseqüências biológicas são as espécies reativas de nitrogênio (ERN), que incluem o óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O), ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peroxinitrito (ONOO^-). O NO^{\bullet} pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase a partir da L-arginina e oxigênio. Esse radical também pode ser produzido em maiores quantidades através dos fagócitos estimulados. O nitrato pode transformar-se em nitrito, gerando o HNO_2 . O N_2O_3 também é precursor do HNO_2 por meio da sua reação com a água. O HNO_2 promove a desaminação das bases do DNA que contêm grupos $-\text{NH}_2$ livres (citosina, adenina e guanina), formando uracila, hipoxantina e xantina, respectivamente⁽³⁾. Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios⁽⁹⁾.

2.2 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

As defesas antioxidantes derivam principalmente da dieta (vitaminas E e C, zinco, cobre e selênio), de sistemas enzimáticos como a superóxido desmutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e de sistemas não-enzimáticos como ácido úrico, albumina, transferrina e tióis^{(10), (8)}. Outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana celular, a maior parte dos agentes antioxidantes está solubilizada no meio⁽¹¹⁾.

A glutathiona reduzida (GSH) está presente em todas as células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento tiol, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz

ultravioleta. Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão tissular decorrente da isquemia e reperfusão e participa da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Após a exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Habitualmente, a reserva intracelular de GSH-Rd é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos. A GSH-Px catalisa a redução do peróxido de H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH a GSSG^(3, 11, 12).

A superóxido-dismutase (SOD) corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma Cu/ZnSOD está presente principalmente no citosol, enquanto Mn-SOD está localizada primariamente na mitocôndria. Essa enzima também tem papel antioxidante, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ ⁽¹²⁾.

Finalmente, a enzima catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . É encontrada em células do sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. A suplementação de catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo H_2O_2 em eritrócitos normais⁽⁷⁾.

Além dos antioxidantes citados, outros sistemas não enzimáticos são importantes. O β -caroteno interage com as ERO especialmente quando ocorrem baixas tensões de O_2 , enquanto a vitamina E se mostra mais eficiente quando há altas tensões de O_2 no meio. A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as EROs; porém, pode funcionar como pró-oxidante quando em dose elevada.

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Aos efeitos nocivos induzidos pelas espécies reativas e capazes de lesar as estruturas dos sistemas biológicos dá-se o nome de estresse oxidativo. O estresse oxidativo

pode resultar do excesso na produção oxidante ou da depleção das defesas antioxidantes⁽¹⁰⁾. O estresse oxidativo pode ser benéfico nos casos de infecção, quando ocorre produção de espécies reativas por células fagocitárias para eliminar microrganismos invasores. Passa a ser prejudicial quando a agressão se torna sistêmica, descontrolada e não-resolvida. As espécies reativas lesam a célula de modo direto ou danificam os ácidos nucleicos e as proteínas, tornando-os mais suscetíveis à degradação. Além de seu efeito citotóxico, atuam como mensageiros das vias de sinalização intracelular das células inflamatórias⁽⁶⁾. Um exemplo é a ativação do fator nuclear *kappa B* (*NF kappa B*), induzida por diversos oxidantes e bloqueada por vários antioxidantes. O *NF kappa B* é um fator central de transcrição, envolvido na regulação de numerosos genes pró-inflamatórios, incluindo muitas citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão e a enzima óxido nítrico sintetase⁽¹³⁾. Desta forma, a geração de espécies reativas está intimamente associada a uma ativação de resposta inflamatória. Por outro lado o sistema imune ativado representa fonte adicional de geração de espécies reativas.

O estresse oxidativo é uma situação em que a homeostase celular é alterada por causa da produção excessiva de ERO ou ERN e (ou) da depleção de defesas antioxidantes celulares^(5, 14). Por outro lado, os mecanismos de sinalização por ERO envolvem fenômenos oxidativos brandos, com aumentos transitórios e controlados de tais espécies. Uma vez cessado o estímulo, a maquinaria antioxidante celular restabelece o estado redox original, sem a ocorrência e (ou) acúmulo de danos oxidativos celulares. As ERO são consideradas espécies químicas muito pequenas e simples para que sejam reconhecidas por características conformacionais numa clássica interação agonista-receptor. Logo, sua habilidade de transmitir sinais químicos estaria relacionada principalmente a suas propriedades reativas, ou seja, sua capacidade de reagir especificamente com grupamentos químicos na superfície de proteínas que possam ser prontamente oxidadas por baixas concentrações de ERO⁽¹⁵⁾.

2.4 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Um biomarcador deve ser um composto estável do ponto de vista biológico, de fácil mensuração e que traduza de forma sensível e específica um processo patológico. Especificamente em relação ao estresse oxidativo, existem vários biomarcadores de interesse para avaliação do estado de estresse oxidativo em DRC, muitos deles já avaliados anteriormente⁽³⁾. De particular interesse prático são compostos que podem ser medidos *in vivo*, de preferência a partir de amostras de plasma ou soro.

Primeiramente, lipídeos modificados (entre eles o malondialdeído, lipoproteínas oxidadas e os produtos finais da lipoxidação avançada) foram identificados como interessantes marcadores de estresse oxidativo e se associam claramente à fisiopatologia de diversas doenças. Derivados do ácido araquidônico também podem ser mensurados e têm sido utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo. Entre eles, destacam-se os F₂ isoprostanos, que podem ser medidos tanto no plasma como na urina. Carboidratos como aldeídos reativos e produtos finais da glicação avançada representam produtos estáveis consequentes do estresse oxidativo. Alguns ensaios identificando alterações estruturais do DNA decorrentes do estresse oxidativo também são promissores pois representam forma estável de avaliar o dano celular. A detecção da oxidação do resíduo de tirosina constitui atualmente uma das formas mais sensíveis e específicas disponível para se detectar produtos de vias oxidativas. A oxidação de resíduos de tirosina induz a formação de 3-clorotirosina, 3-nitrotirosina, ou ditirosina, dependendo da espécie de oxidação predominante (ácido hipocloroso, espécie reativa do nitrogênio ou um radical livre, respectivamente). Estudos demonstram que pacientes em hemodiálise, possuem níveis elevados de 3-clorotirosina no plasma, o que não ocorre com 3-nitrotirosina ou de ditirosina. Dado que a 3-clorotirosina é um produto específico da reação catalisada pela mieloperoxidase, reações oxidativas iniciadas por fagócitos podem ser consideradas como principal causa do estresse oxidativo na DRC⁽³⁾.

Finalmente, proteínas plasmáticas modificadas pelo processo de oxidação, como os produtos da oxidação protéica avançada e as carbonilas (particularmente relevante no contexto do presente trabalho), têm se mostrado biomarcadores interessantes para detectar o estresse oxidativo e monitorar os resultados de intervenções. Proteínas carboniladas podem ser detectadas na DRC em concentrações elevadas quando comparadas com indivíduos saudáveis^(16, 17). Como carbonila é também um dos produtos da reação de fagócitos, a concentração da carbonila pode ser também um marcador da ativação do fagócito e da inflamação⁽³⁾.

Por outro lado, biomarcadores da capacidade antioxidante também são importantes na identificação de pacientes sob risco de complicações. Um antioxidante importante é mantido no plasma pelos grupos tióis. A albumina contém um tiol livre, representado assim um importante antioxidante plasmático. Além de seus efeitos antioxidantes ativos, a albumina parece ser oxidada seletivamente por uma variedade de oxidantes, que impede a injúria oxidativa vascular⁽¹⁸⁾.

Sinais de um sistema imune cronicamente ativado são descritos em DRC⁽¹⁹⁾. Uma elevação de proteína C-reativa (PCR) no plasma é extremamente comum em pacientes com DRC, uma indicação de uma resposta inflamatória dirigida por citocinas de fase aguda. Níveis circulantes de PCR elevado representa um indicador de maior risco de mortalidade cardiovascular⁽²⁰⁾. Embora a associação entre a aterosclerose e a inflamação crônica na população de pacientes em diálise já esteja estabelecida, não se sabe se a resposta inflamatória reflete meramente um fenômeno que acompanha a doença aterosclerótica estabelecida ou se a inflamação e as reações da fase aguda estão envolvidas na iniciação e (ou) progressão da aterosclerose⁽²¹⁾. Já existem dados correlacionando a inflamação (manifestado com o aumento do PCR) e o estresse oxidativo em pacientes com DRC e em diálise^(3, 22).

2.5 EFEITOS BIOLÓGICOS DO ESTRESSE OXIDATIVO

Os efeitos da geração de espécies reativas em células e tecidos são amplos, mas algumas reações são particularmente relevantes. O estresse oxidativo causa efeitos deletérios em consequência da oxidação induzida pelos radicais livres provocando danos nas macromoléculas, interagindo diretamente com as proteínas e as membranas, causando a perda significativa da função de transporte de membrana, enzimas, fatores de transcrição, microtúbulos, e outras proteínas.

A produção de radical hidroxila produzido próximo ao DNA poderá modificar bases purínicas e pirimidínicas. Além disso, o radical hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação). Na peroxidação lipídica da membrana plasmática e das organelas na presença de espécies reativas de oxigênio, a lesão oxidativa é iniciada quando as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados dos lipídeos das membranas são atacadas por ERO, especialmente pela OH⁽²³⁾.

Já nas modificações oxidativas das proteínas, as ERO promovem a oxidação da cadeia lateral dos aminoácidos, formando ligações cruzadas entre proteínas e causando fragmentação. Por exemplo, na reperfusão miocárdica após isquemia prolongada é acompanhado por um aumento da produção de radicais livres, levando a aceleração da morte da célula com a apoptose e necrose⁽⁶⁾.

Sob condições de estresse oxidativo/nitrosativo, os tióis de resíduos de cisteína em proteínas estão entre os principais alvos suscetíveis aos oxidantes e podem passar por várias alterações redox reversíveis ou irreversíveis em resposta ao aumento ou exposição às ERO/ERN⁽¹⁵⁾. Dependendo do resíduo de cisteína afetado, o estresse oxidativo pode alterar completamente a função da proteína. A cisteína está presente no sítio ativo de muitas proteínas e em domínios que funcionam na regulação e no tráfego, sinalização celular e expressão de genes.

Na DRC em estágio avançado, fica evidente que um número de fatores relacionados à diálise, como bio-incompatibilidade e de fatores não-relacionados à diálise, como infecções, podem contribuir para um estado de estresse oxidativo^(3, 24). Estudos mais recentes sugerem que este estado de inflamação e estresse oxidativo predispõe à doença cardiovascular (DCV) mesmo em estágios precoces da DRC⁽²⁵⁾. A redução da função renal por si só pode estar associada com o estresse oxidativo, já que níveis aumentados de marcadores biológicos desta situação são observados tanto em insuficiência renal leve⁽²⁶⁾, como em estados avançados da doença pré-diálise^(3, 24).

Níveis plasmáticos elevados de peroxidação lipídica, protéica e redução na atividade antioxidante são relatados em pacientes com DRC, comparados a indivíduos com função renal normal⁽²⁷⁾. Com a progressão da insuficiência renal e a conseqüente retenção de "toxinas urêmicas", o LDL oxidado, sendo posteriormente capturado por macrófagos na camada íntima dos vasos que quando ativados liberam radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e enzimas hidrolíticas. Estes produtos, além de lesar células vizinhas, estimulam a proliferação de músculo liso subendotelial. Tal oxidação estimula a internalização de colesterol nos macrófagos, os quais, se convertem em células espumosas, contribuindo para a formação da placa de ateroma^(2, 3). As espécies reativas de oxigênio podem alterar diretamente proteínas, mediante a oxidação de aminoácidos, acarretando perda progressiva de suas propriedades metabólicas, enzimáticas e imunológicas. Alternativamente, compostos reativos das carbonilas, formados pela oxidação de carboidratos e lipídios, podem indiretamente resultar em glicação ou lipoperoxidação avançadas de proteínas.

A disfunção endotelial é uma das primeiras alterações que dão origem ao processo patogênico da aterosclerose, tendo como característica a redução da síntese, liberação e atividade do NO derivado do endotélio, que fisiologicamente inibe diversos componentes do processo aterogênico, como vasoconstrição, agregação plaquetária⁽²⁸⁾, proliferação do músculo liso vascular e adesão de leucócitos ao endotélio⁽²⁹⁾. O LDL oxidado, que reduz a vasodilatação dependente do endotélio, parece atuar sinergicamente com a angiotensina II, o que amplifica os seus efeitos^{(30) (31)}.

Todavia, nenhum estudo até o momento demonstrou a relação entre ambos a capacidade antioxidante e o estresse oxidativo associados ao grau de disfunção renal e à inflamação sistêmica. Da mesma forma, não existem muitos relatos do impacto da normalização da função renal (por meio do transplante renal) no estresse oxidativo observado em DRC. Neste estudo, testou-se a hipótese de que existe uma associação entre estresse oxidativo, capacidade antioxidante e função renal⁽⁶⁾.

3 OBJETIVOS

Avaliar o estresse oxidativo em relação à função renal e aos níveis de marcadores de inflamação em um grupo de pacientes com DRC:

- Em estágios diferentes da DRC.
- Antes e após o transplante renal.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1. POPULAÇÃO E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1. Análise de marcadores de estresse oxidativo em diversas fases da DRC

Foram utilizadas nesse estudo amostras congeladas (-80 °C) de plasma (EDTA) de pacientes em tratamento no ambulatório de DRC da Fundação Pró-Renal. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos pela Dra. Simone Gonçalves. O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da PUC-PR e os pacientes incluídos no estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, prontificando-se a participar do estudo. Os critérios de inclusão foram idade entre 18 e 80 anos, presença de DRC e aceite na participação do estudo. Os critérios de exclusão considerados foram sinais de inflamação aguda ou doença infecciosa, malignidade, terapia de reposição da função renal prévia ou atual, doença auto-imune, neoplasias, disfunção hepática, uso de drogas imunossupressoras no momento ou nos últimos três meses.

4.1.2. Análise de marcadores de estresse oxidativo em pacientes no estágio 5 da DRC antes e após o transplante renal

Este foi um estudo prospectivo, de observação, incluindo pacientes incidentes submetidos ao transplante renal. Foram utilizadas neste estudo amostras congeladas (-80 °C) de plasma (EDTA) de pacientes transplantados no Hospital Evangélico. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos pelo Dr. Alexandre Bignelli. Os pacientes incluídos no estudo assinaram um termo de

consentimento livre e esclarecido, prontificando-se a participar do estudo. O protocolo foi analisado e aprovado pelo comitê de ética da PUC-PR. Foi possível o recrutamento de 21 pacientes que preenchiam os requisitos para o ingresso no estudo. Os critérios de inclusão foram: idade até 65 anos e transplante com doador vivo e esquema de imunossupressão padrão. Os critérios de exclusão foram presença de infecção ativa, doenças auto-imunes, neoplasias, disfunção hepática. Os pacientes foram reavaliados após seis meses visando à investigação dos mesmos parâmetros avaliados no início do estudo.

A coleta foi feita com seringas e agulhas. Os tubos para a coleta também foram resfriados previamente. A centrifugação para obtenção do soro, que foi imediatamente estocado a - 80 °C, foi efetuada em centrífuga refrigerada. A função renal foi estimada pela taxa de filtração glomerular, a partir da média dos clearances de uréia e creatinina. As dosagens plasmáticas de proteína C-reativa foram efetuadas por nefelometria de alta sensibilidade automatizado (Dade Behring-BN II, Marburg, Germany) e fibrinogênio de alta sensibilidade em coagulômetro automatizado (Dade Behring Coagulation Timer, Marburg, Germany), os quais foram utilizados como marcadores de inflamação sistêmica. Para dosagem dos marcadores de estresse oxidativo, foi desenvolvido um protocolo para a determinação dos níveis de tiol total e de proteínas carboniladas, descritos em detalhe abaixo.

4.2. MÉTODOS LABORATORIAIS PARA MENSURAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO(32)

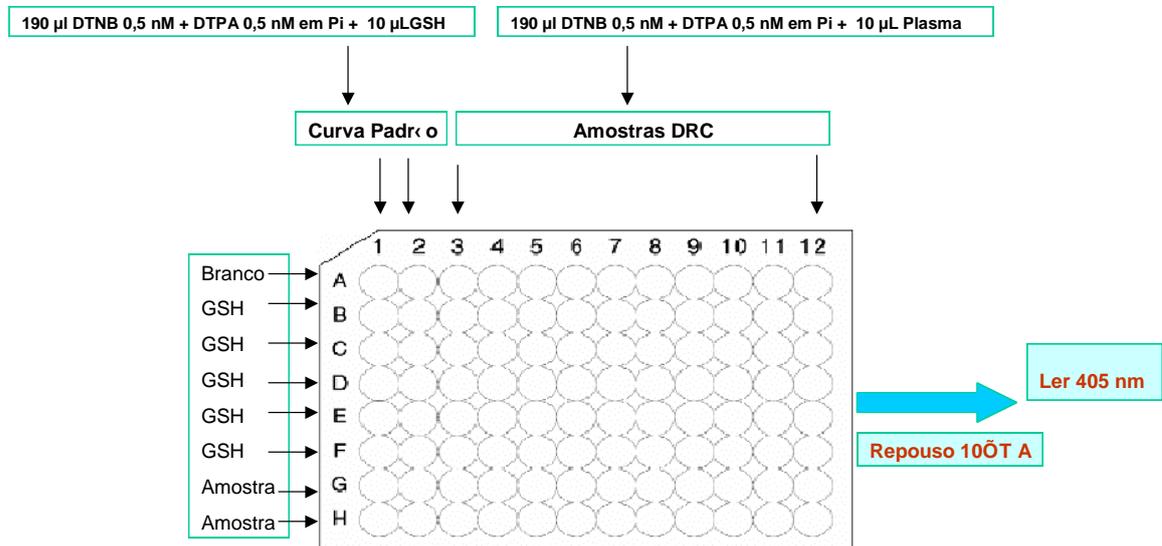
4.2.1. *Determinação de tióis no plasma*

Para dosagem de tióis foi utilizado o método do DTNB (5,5'- Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)), (reagente de Ellman's) com leitura das absorbâncias em 405 nm.

Foi preparada uma solução de DTNB a 0,5mM contendo 0,5mM de DTPA em tampão fosfato (100mM KH_2PO_4 e EDTA 10mM, pH7.5). Uma curva padrão com solução de glutathiona (GSH) e concentrações conhecidas em MPA 2,5% (ácido metafosfórico), de 10 μM , 50 μM , 75 μM e 100 μM foi preparada. O branco é definido com a solução de DTNB e MPA a 2,5%. Para dosagem das amostras em duplicata, foi utilizada uma microplaca de microtitulação, adicionando 190 μl da solução de DTNB e 10 μl de plasma. Após a adição, a amostra foi homogeneizada suavemente e deixada em repouso a temperatura ambiente por 15 min. A leitura da absorbância foi realizada num leitor de microplacas Tecan.

Utilizando a equação da reta ($Y=B.X$), a partir da curva de calibração, foi calculada a concentração em μM , com as devidas correções de diluição. Em seguida, as concentrações foram corrigidas pelo valor de albumina de cada amostra (Figuras 2^A e 2B).

A)



B)

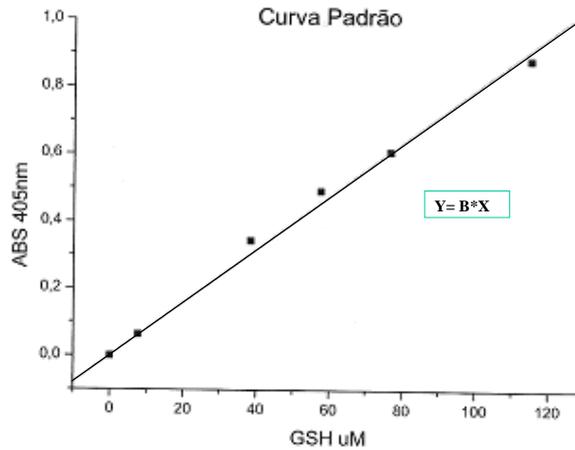


Figura 2 – A) Representação esquemática da dosagem de tiol em microplaca de microtitulação. B) Curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de GSH.

4.2.2. Dosagem de carbonilas no plasma

Para dosagem de carbonila foi utilizado o método DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina). Em um tubo de ensaio foi adicionado 200 μl de plasma e 1ml de DNPH (10mM em 2M HCL), e em outro tubo 200 μl de plasma e 1ml de HCL 2M (branco). O material foi homogeneizado e deixado em banho-maria a 37°C por 90 min. As amostras foram resfriadas por 10 min em gelo, e 1ml de ácido tricloro acético (TCA) 28% foi adicionado. Nova homogeneização em vórtex por 3 min e centrifugação a 6000rpm por 3min foi realizada. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1ml de etanol- acetato de etila 1:1 (v/v). Nova homogeneização em vórtex por 2min e centrifugação a 6000rpm por 6min foi realizada. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 1ml de guanidina 6M, homogeneizado por 1min. Transferiu-se a amostra para um tubo de 1 ml onde foi centrifugado a 6000rpm por 3min. Utilizando a equação $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ (onde $\epsilon = 21000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $A =$ absorvância),

foram obtidas as concentrações das amostras após a correção pela albumina de cada paciente (Figura 3).

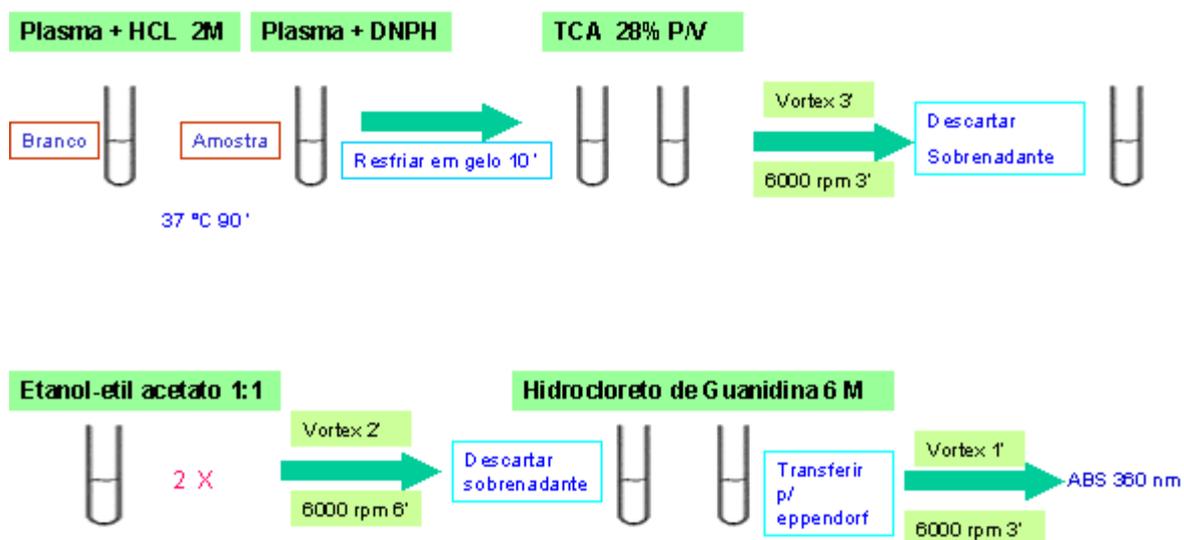


Figura 3 – Representação esquemática da dosagem de carbonilas no plasma pelo método DNPH.

5 ARTIGO

ASSOCIATION BETWEEN BIOMARKERS OF CARBONYL STRESS WITH INCREASED SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN DIFFERENT STAGES OF CHRONIC KIDNEY DISEASE AND AFTER RENAL TRANSPLANTATION

Paulo R. Aveles Ciro R. Criminácio Simone Gonçalves Alexandre t. Bignelli
Ligia Maria Claro Sérgio S. Siqueira Lia s. Nakao Roberto Pecoits-filho

Center for Health and Biological Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil.

Key Words

Carbonyl stress • Kidney dysfunction • Uremic toxins • Plasma thiols

Abstract

Background: Chronic kidney disease (CKD) is characterized by progressive kidney dysfunction accompanied by accumulation of uremic toxins and a potential disequilibrium between the redox status and the generation of prooxidants, resulting in oxidative stress and chronic inflammation which is associated with complications (particularly cardiovascular disease) in this population. We aimed to analyze the concentration of total plasma thiols (indicator of antioxidant capacity) and the protein carbonyl content (a marker of carbonyl stress) in relation to kidney function and inflammation in a group of patients with CKD. **Patients and Methods:** A group of 68 patients with CKD (stages 2–5; mean age 57.8 ± 12 years, 46% male, 34% diabetics) and another group of 21 patients who underwent living donor kidney transplantation (mean age 36.8 ± 17 years, 50% male, 10% diabetics, and 9.8 ± 2 months after renal transplantation) were included in the study. Total plasma thiol and protein carbonyl levels were determined by the DTNB and DNPH methods, respectively, and were adjusted to the plasma albumin concentrations. Plasma levels of fibrinogen and C-reactive protein (CRP) were measured by routine methods and used as markers of in

flammation. **Results:** Mean glomerular filtration rate (GFR) was 48 ml/min, and there was a positive correlation between GFR and thiol ($r = 0.25$, $p < 0.05$) and a negative correlation between GFR and carbonyl ($r = -0.26$, $p < 0.05$), fibrinogen ($r = -0.45$, $p < 0.0001$) and CRP ($r = -0.14$, $p = \text{ns}$). Carbonyl strongly correlated with CRP ($r = 0.49$, $p < 0.0001$) and fibrinogen ($r = 0.30$, $p < 0.01$). There was a significant reduction in plasma carbonyl after renal transplantation (1.48 ± 0.4 nmol/mg albumin), compared with the levels before the procedure (2.08 ± 1.4 nmol/mg albumin, $p < 0.05$), which parallels an improvement in thiol levels (15.84 vs. 21.85 nmol/mg albumin, $p < 0.001$). In addition, there was a significant correlation between CRP and carbonyl after the transplantation ($r = 0.65$; $p < 0.005$). **Conclusion:** We observed that patients with CKD present an altered redox status and increased signs of carbonyl stress and inflammatory activity as kidney function deteriorates, which was partially but significantly improved after renal transplantation. These findings indicate the importance of renal function in the complications of CKD related to oxidative stress and inflammation.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by progressive renal dysfunction accompanied by uremic toxin accumulation and a potential disequilibrium between the redox status and the generation of prooxidants, resulting in oxidative stress and chronic inflammation [1]. In this population, this status is associated with complications (particularly cardiovascular disease), and biomarkers of inflammation and oxidative stress are predictors of mortality [2].

Oxidative stress can result from an excess of oxidant production or depletion of antioxidant defenses. Reactive species can act as messengers in the intracellular signaling of inflammatory cells, in a reaction commonly described as harmful to cells and tissues. They cause direct lesions to cellular macromolecules, making them more susceptible to degradation and promoting further activation of the immune system. Recently gathered evidence has suggested that, in uremia, the increased carbonyl compounds derived from carbohydrates and lipids modify proteins not only by a

glycooxidation reaction but also by a lipoxidation reaction ('carbonyl stress'). Carbonyl stress has been implicated in the pathogenesis of long term uremic complications such as dialysis-related amyloidosis.

During the progression of CKD, the decrease in renal function leads to a variety of disturbances in body homeostasis, which is clearly related to the degree of renal function, usually evaluated by estimation of the glomerular filtration rate (GFR). These disturbances are characterized by the accumulation of uremic toxins, increase in signs of volume overload, worsening of hypertension, and the induction of metabolic and hormonal disturbances. All of these features are highly prevalent in advanced stages of CKD and are potential triggers for a cellular response that could lead to inflammatory activation and generation of a status of oxidative stress. Dialysis therapy can further contribute to this situation through bio-incompatible systems and water quality, leading to increased infection susceptibility. Renal transplantation removes the dialysis-related factors to the cellular response, and additionally reestablishes renal function, with a potential impact on reducing oxidative stress.

Several markers of oxidative stress have been described in CKD; however, there is no consensus about which consistently accompanies disease progression, reflects its severity, responds to therapeutic intervention, and induces improvement in patient outcome [1]. Modified proteins measured in plasma are potentially good candidates as biomarkers of carbonyl stress in CKD. As a result of carbonyl stress, carbonylated proteins can be easily detected in plasma, which are described to be elevated in CKD when compared to healthy individuals [4]. Based on analysis of the mechanisms of generation of radical species, markers of antioxidant status can also be considered biomarkers of carbonyl stress. The antioxidant defenses derive primarily from diet, enzymatic systems, and non-enzymatic systems such as uric acid, albumin, transferrin and total thiols. Interestingly, thiol levels (from reduced cysteine residues) can be easily measured in plasma, are reduced in CKD compared to healthy controls, and may also be an interesting biomarker of carbonyl stress [4].

We hypothesize that signs of increased carbonyl stress are present (in parallel with enhanced signs of systemic inflammation) in patients in a CKD stage-dependent

way, and that renal transplantation partially reverses this situation. Thus, the objective of this study was to evaluate markers of carbonyl stress in relation to kidney function and inflammation in a group of patients with CKD in different stages and after the renal transplantation.

Materials and Methods

This study consisted of the analysis of 2 populations: first, we performed a cross-sectional and observational study in a group of CKD patients in different stages of pre-dialysis care. Second, patients who underwent a living donor kidney transplantation were evaluated before the transplantation and analyzed longitudinally after a mean follow-up time of 9 months. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Pontifícia Universidade Católica do Paraná, and informed consent was obtained from each patient.

CKD Patients Stages 1–5

Patients aged 18 years and older in whom CKD was diagnosed at least 3 months prior to the study, and who declared willingness to participate in the study were included. Exclusion criteria were clinical signs of active infection, liver dysfunction, autoimmune diseases, malignancy, and the use of anti-inflammatory or immunosuppressant drugs 3 months prior to recruitment. Data regarding anthropometry, age, gender, primary kidney disease, smoking, history of dyslipidemia, diabetes mellitus, hypertension, edema, and clinically detected cardiovascular disease (coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral vascular disease and heart failure) were recorded by a detailed analysis of medical records, patient interview, and physical examination. Renal function was evaluated by estimating GFR using two distinct determinations of the mean of two measurements of creatinine and urea clearances. Patients were divided into different stages of CKD, according to the current definition.

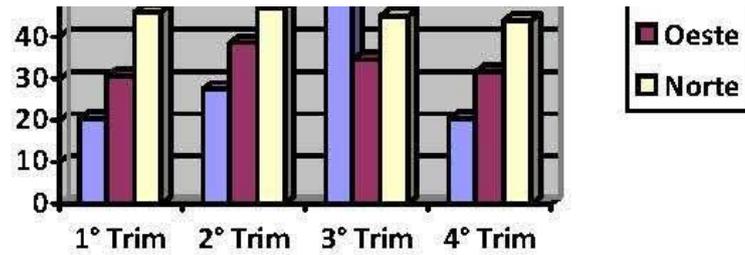


Table 1.

Main clinical and laboratory characteristics of chronic kidney disease (stage 1–5) in the transplant population

	Chronic kidney disease (stage 1–5)	Transplant
Number of patients	68	21
Mean age, years	57.8	61.2
Male gender, %	46	50
GFR, ml/min (range)	34 (6-107)	884
Primary kidney disease		
Nephrosclerosis, %	30	7
Diabetic nephropathy, %	30	10
Chronic pyelonephritis, %	12	16
Chronic glomerulonephritis, %	12	34
Unknown, %	9	23
Other, %	19	10
Comorbidity		
Hypertension, %	89	82
Diabetes mellitus, %	36	25
Hyperlipidemia, %	24	20
Cardiovascular disease, %	53	37
Smokers, %	12	0
Obesity, %	30	0

Patients before and after Renal Transplantation

The second part of the protocol was a longitudinal and observational study that prospectively included consecutive patients who underwent a living donor kidney transplantation in our institution. Exclusion criteria were age \geq 18 years, clinical signs of active infection, liver dysfunction, autoimmune disease, malignancy and acute rejection at the time of sample collection. Eligible patients followed the standardized study protocol: baseline analysis and sample collection were performed 1 week before the transplantation. Data regarding anthropometry, age, gender, primary kidney disease, smoking, history of dyslipidemia, diabetes mellitus, hypertension, edema, and clinically detected cardiovascular disease (coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral vascular disease and heart failure) were recorded by a detailed analysis of medical records, patient interview, and physical examination.

Sample Collection and Biomarker Analysis

Eligible patients for both studies followed a standardized sample collection protocol in which blood samples were collected in vacutainer tubes containing EDTA after an overnight fast. Plasma was separated immediately after the collection in a refrigerated system and stored in aliquots at -80°C .

The concentration of C-reactive protein (CRP) was measured using a highly sensitive automated nephelometric immunoassay (Dade Behring-BN II, Marburg, Germany). The assay sensitivity was 0.78 mg/l. Fibrinogen was performed with automated coagulometer (DADE Behring Coagulation Timer, Marburg, Germany).

Protein carbonyls were determined photometrically by the DNPH method. Briefly, 200 μ l plasma and 1 ml DNPH (10 mM in 2 M HCl) were incubated at 37°C for 90 min. As a control, incubation was also performed in the absence of DNPH. Samples were cooled in ice, protein was precipitated by addition of TCA (28%), washed with a mixture of ethyl acetate and ethanol (1:1) and finally resuspended in 1 ml of 6 M guanidine. After centrifugation (6,000 rpm for 3 min), supernatants were

analyzed at 360 nm, and carbonyl concentrations were calculated ($\epsilon = 21,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Concentrations were then corrected for albumin concentration. Plasma total thiols were determined photometrically using Ellman's reagent, as previously described [5].

The type of value distribution was evaluated by the Shapiro-Wilks test. For comparison of CKD groups with respect to the variables CRP, fibrinogen, thiol, and carbonyl, we applied the ANOVA variance analysis test, and LSD was used for multiple comparisons. The comparisons of CKD groups with respect to CRP were done using the non-parametric Kruskal-Wallis test, and the Mann-Whitney test was used for multiple comparisons. Thiol and carbonyl were logarithmically transformed before being entered in the data analysis. In the analysis of the second sub-study (before and after the transplantation), the comparison was performed using the Student's t test for paired samples. Correlation was tested using Pearson or Spearman tests. p values of ≤ 0.05 reflected statistical significance. For multiple comparisons, the level of significance was corrected by the Bonferroni test ($p \leq 0.005$).

Results

Patients with CKD Stages 1–5

The study population consisted of 68 patients (47% males) with a median age of 57 (range 23–83) years, predominantly (91%) Caucasians, body mass index (BMI) 28.8 ± 4 , and a mean length of follow-up in the clinic of 38.8 ± 5.7 months. The median GFR was 34 (range 6–107) ml/min. Most patients were in stage 3 (46%) and stage 4 (24%) of CKD. The causes of CKD were hypertensive nephrosclerosis in 30% patients, diabetic nephropathy in 30% patients, chronic glomerulonephritis in 12% patients, polycystic kidney disease in 12% patients, and other or unknown etiologies in 16% patients. The comorbidities observed in the population were hypertension in 89%, diabetes mellitus in 36%, obesity (BMI ≥ 28) in 30%, hyperlipidemia in 24%, cardiovascular disease in 53%, and smoking in 12% of the patients. Patients were

taking angiotensin-II receptor blockers or angiotensin-converting enzyme inhibitors in 75% of the cases, diuretics in 55%, aspirin in 28%, and statins in 12% of the cases. The main clinical and laboratory characteristics of the population are given in table 1.

The median value of CRP was 2.8 (range of 0.3–39.9) mg/l. According to the American Heart Association recommendations, a large proportion of patients (40%) were considered at intermediate risk of cardiovascular disease (CRP 11 mg/l), while

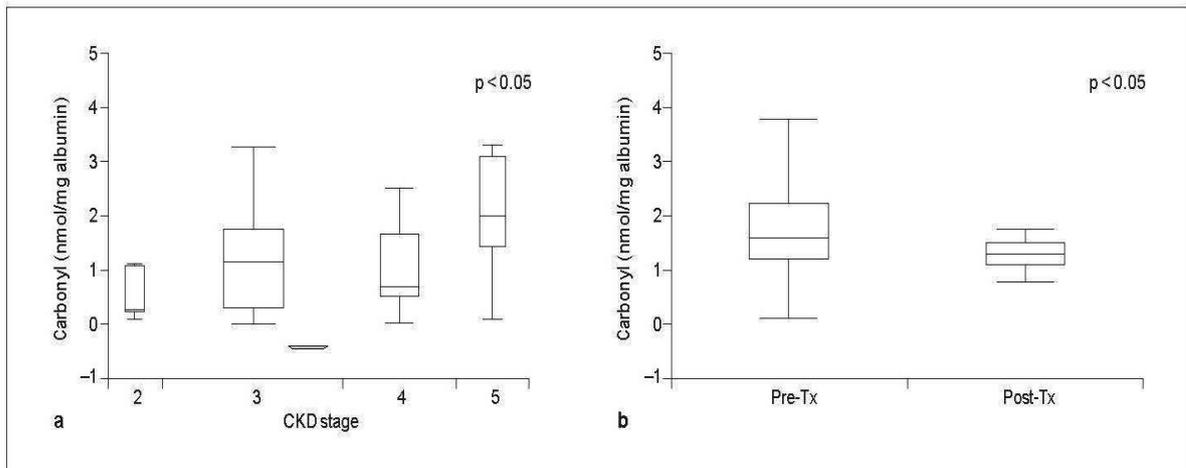


Fig. 1. Plasma carbonyl concentrations in patients with different stages of CKD (a) and in patients before and after renal transplantation (b).

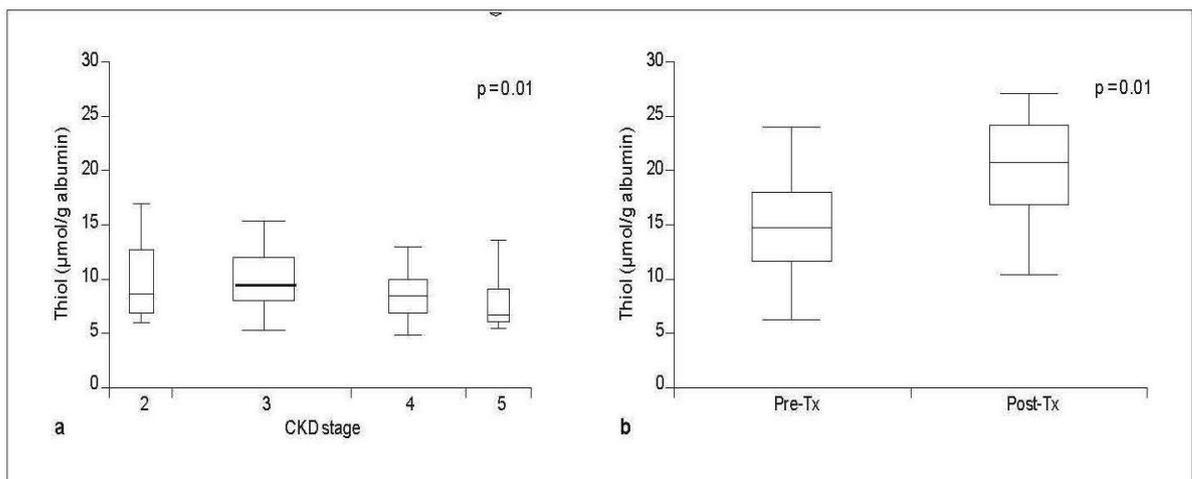


Fig. 2. Plasma thiol in patients with different stages of CKD (a) and in patients before and after renal transplantation (b).

47% of patients were at high risk of cardiovascular disease (CRP 13 mg/l). Only 9 patients presented CRP levels of ≤ 1 mg/l. The median values of fibrinogen were 406 (range 238–1,003) mg/dl, and 51% of patients presented fibrinogen levels above the normal range (400 mg/dl).

There was a positive correlation between carbonyl and fibrinogen concentrations ($p < 0.01$, $r = 0.30$) and a trend toward a negative correlation between thiol and fibrinogen concentrations ($r = 0.22$, $p = 0.06$). There was a significant ($p < 0.05$) CKD stage-dependent increase in plasma levels of carbonyls (fig. 1), mirrored by a decrease ($p < 0.01$) in thiol levels (fig. 2). In summary, plasma levels of carbonyls in CKD stage 5 (2.2 \pm 1.6 nmol/mg albumin) were significantly higher than in stage 2 (0.8 \pm 1.3 nmol/mg albumin; $p = 0.003$), stage 3 (1.2 \pm 0.9 nmol/mg albumin; $p = 0.015$) and stage 4 (1.0 \pm 0.7 nmol/mg albumin; $p = 0.011$). Plasma levels of thiols in CKD stage 5 were significantly lower (7.9 \pm 2.5 nmol/mg albumin) than in stage 2 (9.8 \pm 3.5 nmol/mg albumin; $p = 0.05$) and stage 3 (9.9 \pm 2.6 nmol/mg albumin; $p = 0.03$). Accordingly, there was a negative correlation between the GFR and the carbonyl concentration ($r = 0.26$, $p < 0.05$), and a positive correlation between GFR and the thiol concentration ($r = 0.25$, $p < 0.05$).

Patients before and after Renal Transplantation

Twenty-one patients (50% males, median age 36, range 19–59 years) were enrolled in the study. Of these patients, 76% received a graft from a related living donor and 24% from an unrelated living donor. Fifty-seven percent of patients had received previous transfusions, and 94% of patients presented positive serology for cytomegalovirus, while only 5% of patients were hepatitis C-positive. The graft ischemia time was 58 \pm 6 min, and patients remained in the hospital for 12 \pm 6 days after surgery. The immunosuppressant schedule was tacrolimus or cyclosporin + micophenolate mofetil + prednisone in 71% of patients, tacrolimus or cyclosporin + sirolimus + prednisone in 13% of patients, and other schedules in the remaining. Sixty-eight percent of patients presented at least one episode of rejection, and the total number of rejections was 32 episodes. There were 13 episodes of bacterial or viral

acute infections. The prevalence of overweight and obesity in the baseline analysis was 26% and increased particularly 9 months after the transplantation to 54% ($p < 0.001$), parallel to an increase in the BMI of the population. The mean weight gain after transplantation was 7.3 ± 3.5 kg, and BMI after the transplantation significantly correlated with fibrinogen levels. The main clinical characteristics of the patients at the baseline are presented in table 1.

There was a significant reduction in plasma carbonyl after renal transplantation (1.4 ± 0.4 nmol/mg albumin), compared with the levels before the procedure (2.0 ± 1.4 nmol/mg albumin, $p < 0.05$; fig. 1), in parallel to an improvement in thiol levels (15 ± 4 vs. 21 ± 5 nmol/mg albumin, $p < 0.001$; fig. 2). In addition, there was a significant correlation between CRP and carbonyl after the transplantation ($r = 0.65$; $p < 0.005$).

Discussion

Patients with CKD present an excess of morbidity and mortality, which cannot be fully explained by the traditional risk factors, and uremia-related oxidative stress has been described as an important player in complications of CKD. In this study, we observed that patients present a CKD stage-dependent status of carbonyl stress, which was partially (but significantly) reversed after reestablishment of renal function by transplantation.

There is growing evidence, from experimental and clinical studies, that carbonyl stress may be implicated in the pathogenesis of many complications of CKD, namely atherosclerosis, dialysis-related amyloidosis, malnutrition and anemia [1]. Given that free radicals have very short half-lives, the clinical assessment of carbonyl stress is based on the measurement of different stable oxidized compounds (such as modified lipid and protein products). At the same time, both enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) and nonenzymatic antioxidants (glutathione, vitamin C, vitamin E, albumin) can be evaluated [6]. In the present study, we chose to analyze simultaneously biomarkers of both antioxidant capacity (plasma thiols) and protein oxidation (carbonyls) as markers of carbonyl

stress in different patient populations. From a pathogenic point of view, while thiol levels predict the reminiscent reduced cysteine residues [7], carbonyl levels represent the final product of oxidative reaction [4]. In addition, these bio- markers have been described in previous studies as a viable alternative to evaluate oxidative stress, as they are easy to measure, inexpensive, and clearly altered in CKD compared to healthy individuals [1].

CKD patients are exposed to many potential stimuli for the induction of oxidative stress, both through the induction of a reduced antioxidant capacity and/or increased prooxidant activity. These stimuli can be related to the process of dialysis or to non-dialysis-related factors [8]. A reduction in renal function itself can be associated with an inflammatory response and oxidative stress, since increased levels of biological markers of these two situations are observed in both slight and advanced states of pre-dialysis disease [9]. However, at present few studies have demonstrated an association of either antioxidant capacity or oxidative stress with the degree of renal dysfunction [4, 8]. Our findings of a CKD stage-dependent increase in the concentration of carbonyls and a decrease in the concentration of thiols are in accordance with previous observations, and reinforce the hypothesis that the renal function impairment itself is associated with the induction of oxidative stress, most likely due to the accumulation of modified protein and lipid compounds. The mirror effect of CKD on antioxidant capacity and oxidative stress observed in the present study is interesting, and could both indicate that CKD induces the depletion of antioxidants with predisposition of carbonyl stress and/or directly activates production of reactive species with consumption of antioxidants. The cause/effect mechanisms behind these observations deserve further investigation.

An original finding of the present study is the association between biomarkers of inflammation and oxidative stress, as seen by the significant correlations between fibrinogen, carbonyls and thiols. Carbonyl stress and inflammation are deeply interrelated, as different oxidant free radicals are generated by phagocytic cells in response to inflammatory stimuli: both are related to endothelial dysfunction, as the endothelium is a source and a target of oxidants and actively participates in the

inflammatory response. In the present study, the described association between inflammation and oxidative stress biomarkers suggests that they may be linked to CKD not only through common mechanisms of activation, but also by generating an amplifying loop. Although inflammation bio- markers are consistently associated with CKD and its complications (including premature death), studies analyzing the value of oxidative stress biomarkers are scarcer and still need to be elucidated in future studies.

We also observed a significant reduction in signs of carbonyl stress capacity after the renal transplantation. The reduction in carbonyls was previously reported in another study similar in design and population, although in that study there was no description of plasma thiol changes after transplantation. In studies performed in transplant patients, we [10] and others [11, 12] have de- scribed that there was an improvement in the inflammatory status (according to the evaluation of several bio- markers, such as fibrinogen and CRP) after correction of renal function, which was dependent on the degree of renal function observed after the procedure. These observations of an improvement in inflammatory status in combination with a reduction in oxidative stress may justify the decrease in cardiovascular risk observed in transplant patients when compared to patients on dialysis.

The fact that the present study simultaneously evaluated two pivotal markers of carbonyl stress in two different patient populations of CKD represents an important contribution to the area and allows analysis of data throughout the spectrum of kidney dysfunction. The combination of 2 cohorts (cross-sectional predialysis and longitudinal transplantation) results in a single report that reinforces the importance of renal function associated with oxidative stress, avoids interassay variation, and provides important information to the literature.

However, there are limitations to the study that need to be clearly discussed. First, the study population is small and results should be replicated in larger studies to further support the presented results. Second, there are major changes in body composition, susceptibility to subclinical infection and immunosuppressive drug prescription in the transplantation group that may interfere with carbonyl stress. The particular role of those factors was not controlled in the present study.

In conclusion, we observed that patients with CKD present increased signs of carbonyl stress and inflammatory activity as kidney function deteriorates, which was partially but significantly improved after renal transplantation. These findings indicate the importance of renal function in the complications of CKD related to carbonyl stress and inflammation. Further well-designed randomized controlled clinical trials with carbonyl stress-reducing drugs are required to analyze whether carbonyl stress is an important target when aiming to reduce complications of CKD.

References

- 1 Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM: The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62: 1524–1538.
- 2 Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B: Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1927–1939.
- 3 Droge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95.
- 4 Himmelfarb J, McMonagle E, McMennamin E: Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58: 2571–2578.
- 5 Himmelfarb J, McMonagle E: Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int* 2001;60:358– 363.
- 6 Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A: Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52:601–623.
- 7 Himmelfarb J, McMennamin E, McMonagle E: Plasma aminothiols oxidation in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002; 61: 705–716.
- 8 Oberg BP, McMennamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al: Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004; 65:1009–1016.
- 9 Meyer TW, Hostetter TH: Uremia. *N Engl J Med* 2007; 357:1316–1325.

10 Bignelli AT, Barberato SH, Aveles P, Abensur H, Pecoits-Filho R: The impact of living donor kidney transplantation on markers of cardiovascular risk in chronic kidney disease patients. *Blood Purif* 2007;25:233–241.

11 Simmons EM, Langone A, Sezer MT, Vella JP, Recupero P, Morrow JD, et al: Effect of renal transplantation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients. *Transplantation* 2005; 79:914–919.

12 Cueto-Manzano AM, Morales-Buenrostro LE, Gonzalez-Espinoza L, Gonzalez-Tableros N, Martin-del-Campo F, Correa-Rotter R, et al: Markers of inflammation before and after renal transplantation. *Transplantation* 2005; 80:47–51.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Biomarcadores têm uma importância enorme na área de saúde. Atualmente são utilizados no entendimento da fisiopatologia de doenças e na identificação de pacientes sob risco elevado de desenvolver uma complicação. Além disso, podem ser usados como marcadores da presença ou gravidade de uma patologia, como ferramentas de monitorização de eficácia de intervenções e como forma de perceber alterações no curso natural de uma doença. Dessa maneira, somente após completar um ciclo de investigações é que um biomarcador se torna realmente reconhecido e amplamente aplicável. No curso desse projeto, tentou-se avançar no entendimento do papel de alguns biomarcadores da doença renal crônica.

O entendimento do potencial papel do estresse oxidativo na DRC foi o ponto de partida para esse estudo. Baseado no conhecimento da fisiopatologia de complicações da DRC, particularmente cardiovasculares, escolheu-se biomarcadores de estresse oxidativo como potenciais candidatos. Isso é devido ao fato da geração de espécies reativas ser marcante na DRC e que resultados de sua produção excessiva podem ser observados em células e tecidos afetados pela doença.

A primeira fase do desenvolvimento foi a padronização da metodologia de mensuração de tióis e carbonilas no plasma de pacientes. Após a padronização, a definição de um modelo de estudo, combinando pacientes em estágios diferentes da DRC com uma situação de reestabelecimento da função renal (antes e após o transplante), permitiu uma análise consistente da relação da concentração dos biomarcadores com a intensidade da DRC, caracterizada por uma perda de função renal. Os achados desse estudo permitem afirmar que os biomarcadores escolhidos se relacionam com a gravidade da disfunção renal e que este efeito pode ser parcialmente revertido com a recuperação da função renal.

Restam, portanto, alguns passos para a consolidação da importância desses marcadores e sua ampla utilização clínica e em pesquisa. Primeiramente, estudos futuros devem analisar o poder preditivo dos biomarcadores em relação a eventos nesse grupo de

pacientes. Posteriormente, estudos prospectivos devem avaliar o comportamento desses biomarcadores após intervenções especificamente voltadas para a redução do estresse oxidativo. Finalmente, estudos grandes e bem controlados devem comprovar que estas intervenções antioxidantes seriam capazes de reduzir o risco de morbimortalidade, beneficiando diretamente os pacientes com DRC. Somente neste ponto, o processo de avaliação da importância de tióis e carbonilas como biomarcadores de risco na DRC estará completa.

7 CONCLUSÕES

Conclui-se que pacientes com DRC possuem uma redução da capacidade antioxidante e sinais de estresse oxidativo, que são mais pronunciados à medida que a função renal declina. Essas alterações são parcialmente, porém de forma significativa, corrigidas com o restabelecimento da função renal após o transplante. Esses achados apontam para a importância da função renal nas reações que determinam estresse oxidativo, o qual pode estar potencialmente implicado nas complicações da DRC.

REFERÊNCIAS

1. Romão J. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. *J Bras Nefrol.* 2004 Agosto;XXVI(nº 3):1-3.
2. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B. Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jul;14(7):1927-39.
3. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* 2002 Nov;62(5):1524-38.
4. Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol.* 2004;237:57-89.
5. Ellis EM. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther.* 2007 Jul;115(1):13-24.
6. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.
7. Ferreira AL, Matsubara LS. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. *Rev Assoc Med Bras.* 1997 Jan-Mar;43(1):61-8.
8. Jung T, Bader N, Grune T. Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Jun 15;462(2):231-7.
9. Martinez-Ruiz A, Lamas S. Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovasc Res.* 2007 Jul 15;75(2):220-8.
10. Ahamed M, Siddiqui MK. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin Chim Acta.* 2007 Aug;383(1-2):57-64.
11. Hiraku Y, Murata M, Kawanishi S. Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Feb 15;1570(1):47-52.
12. Ji LL. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol.* 2007 Jul;42(7):582-93.
13. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006 Apr;52(4):601-23.
14. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997 Mar;82(2):291-5.
15. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med.* 2007 Sep 15;43(6):883-98.
16. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. *N Engl J Med.* 2007 Sep 27;357(13):1316-25.
17. Himmelfarb J, McMonagle E, McMennamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int.* 2000 Dec;58(6):2571-8.

18. Himmelfarb J, McMonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int.* 2001 Jul;60(1):358-63.
19. Stenvinkel P. Inflammatory and atherosclerotic interactions in the depleted uremic patient. *Blood Purif.* 2001;19(1):53-61.
20. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999 Feb;55(2):648-58.
21. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant.* 2005 Jun;20(6):1048-56.
22. Wanner C. C-reactive protein risk prediction: adding cardiac hypertrophy to the list. *Am J Kidney Dis.* 2002 Dec;40(6):1340-1.
23. Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Nov 28;884:19-40.
24. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Barany P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis.* 2003 Jun;41(6):1212-8.
25. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004 Mar;65(3):1009-16.
26. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation.* 2003 Jan 7;107(1):87-92.
27. Drueke TB, Nguyen Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, Lacour B, Descamps-Latscha B. Role of oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerosis of uremia. *Kidney Int Suppl.* 2001 Feb;78:S114-9.
28. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 2005 Feb-Apr;26(1-2):33-65.
29. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jun 1;88(11):4651-5.
30. Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C, et al. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Oct;293(4):H2009-23.
31. Lodha S, Dani D, Mehta R, Bhaskaran M, Reddy K, Ding G, et al. Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. *Mol Med.* 2002 Dec;8(12):830-40.
32. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 2000 Feb 1;28(3):463-99.