



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDO FÓLICO NOS
ESTÁGIOS PRECOCE E MODERADO DA
DOENÇA RENAL CRÔNICA:
ANÁLISE DOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS,
BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO**

ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDO FÓLICO NOS
ESTÁGIOS PRECOCE E MODERADO DA
DOENÇA RENAL CRÔNICA:
ANÁLISE DOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS,
BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa.

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M434e Matsumoto, Andressa Keiko .
EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDO FÓLICO NOS ESTÁGIOS PRECOCE E MODERADO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA : ANÁLISE DOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS, BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO / Andressa Keiko Matsumoto. - Londrina, 2022.
90 f. : il.

Orientador: Décio Sabbatini Barbosa.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Antioxidante, Ácido fólico, Doença renal crônica; Homocisteína. - Tese. I. Barbosa, Décio Sabbatini . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDO FÓLICO NOS
ESTÁGIOS PRECOCE E MODERADO DA
DOENÇA RENAL CRÔNICA:
ANÁLISE DOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS,
BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.
Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Danielle Venturini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Rubia Casagrande Universidade
Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Estefania Gastaldello Moreira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 18 de abril de 2022.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa, o meu maior agradecimento por toda a disponibilidade e orientação prestada, que foram fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal. E, acima de tudo, pelo carinho e amizade gerados em todos esses anos.

À professora Dra. Estefânia Gastaldello Moreira, pelas valiosas contribuições que com sua prática e conhecimento, contribuíram muito para obtenção desse trabalho.

À professora Dra. Danielle Venturini por toda ajuda, amizade e apoio.

Ao Professor Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino por estar presente em todas as etapas de nossa pesquisa, esforçando-se ao máximo para nosso sucesso.

Ao professor Dr. Michael Maes cujos conhecimentos fundamentaram ainda mais as pesquisas e a análise estatística.

À professora Maria Emília Favero, por tanta dedicação, disponibilidade e amizade.

Aos meus grandes parceiros Denise Duarte Santiago e Antônio Carlos Mariano pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos Carine Coneglian, Kamila Landucci Bonifácio, Laura Semeão, Ana Paula Michelin, Rafael Dal Bem, João Victor de Lima Pedrão pela ajuda nos experimentos e por estarem sempre presentes nos momentos de alegrias e nas dificuldades. Pela paciência, carinho, amizade e convívio tão agradável que tornou a jornada muito mais divertida.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UEL, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional, pessoal e pela confiança em mim depositada.

À Sandra Lage e Emanuella Oliveira, secretárias da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UEL, pela assessoria técnico-administrativa.

Aos meus pais Inês Aparecida Pim Matsumoto e Casemiro Pedro de Godoy, exemplos vivos de sabedoria e perseverança. Obrigada por me ensinarem os valores da vida.

À minha namorada, Duda, por sempre mostrar que tudo vai acabar bem.

Aos amigos e à minha família obrigada pela paciência e apoio.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho ou estiveram ao meu lado nesta jornada.

*“Na vida, não existe nada a temer,
mas a entender.”*

(Marie Curie)

MATSUMOTO, Andressa Keiko. **Efeitos do tratamento com ácido fólico nos estágios precoce e moderado da doença renal crônica: análise dos biomarcadores inflamatórios, bioquímicos e de estresse oxidativo.** 2022. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins, reduzindo a capacidade de eliminar substâncias tóxicas do organismo. A DRC evolui em estágios (cl clinicamente convencionados de 1 a 5), sendo que a duração de cada um depende da etiologia e do seu manejo. O estresse oxidativo e nitrosativo (EO/EN) na DRC ocorre pelas toxinas urêmicas, sendo um fator potencialmente importante na mortalidade desses pacientes e mediador de muitas complicações, principalmente cardiovasculares. Tornam-se necessárias novas estratégias para melhorar as condições clínicas e laboratoriais desses pacientes, como por exemplo, a suplementação com ácido fólico. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil metabólico (uréia, creatinina sérica, resistência a insulina (HOMA-IR), colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, ácido úrico, AST, ALT, proteínas totais, albumina, glicose e homocisteína [Hci]), inflamatório (PCR - Proteína C reativa), bem como análise de biomarcadores de EO (Capacidade antioxidante total plasmática [TRAP], Catalase, superóxido dismutase [SOD], sistema glutatona, grupamento sulfidril [SH], paraoxonase1 [PON 1], hidroperóxidos por quimiluminescência [QL-LOOH], malondialdeído [MDA], metabólitos do óxido nítrico [NOx] e produtos avançados da oxidação de proteínas [AOPP]), parâmetros hematológicos (hemograma e reticulócitos) e a gravidade da doença por meio da taxa de filtração glomerular (TFG) em indivíduos pré-dialíticos. Foram selecionados 113 pacientes ambulatoriais com DRC e alocados em um grupo tratado com ácido fólico (n=66) e estavam em diferentes estágios (3a [n=16], 3b [n=25] e 4 [n=25]) e um grupo controle, sem intervenção ativa (n=47), nos estágios 3-4 da DRC (3a [n=17], 3b [n=16] e 4 [n=14]). Os níveis de Hci foram diretamente proporcionais em relação à progressão da DRC e, além disso, as atividades de PON1 CMPAase e AREase foram significativamente menores no estágio 4 da DRC em comparação com os estágios 3a e 3b. Dessa forma, evidenciou-se a possibilidade de serem potenciais biomarcadores para acompanhar a progressão da DRC. O tratamento com ácido fólico 5mg/dia durante 3 meses, via oral, no estágio G4, reduziu os níveis de Hci, bem como dos grupamentos SH e aumentou a atividade da enzima antioxidante (PON1 CMPAase e AREase nos estágios 3b e 4, mas não 3a). Além disso, os biomarcadores oxidativos (NOx e QL-LOOH) e parâmetros hematológicos (Concentração Média de Hemoglobina corpuscular (MCHC), ferro sérico, ferritina e saturação de transferrina) foram significativamente mais baixos após o tratamento em comparação com o tempo basal no grupo de intervenção ativa. A intervenção com ácido fólico não causou alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e inflamatórios. No grupo sem intervenção ativa, nenhum efeito estatisticamente significativo foi encontrado nos

biomarcadores oxidativos, inflamatórios e bioquímicos. O tratamento com ácido fólico atenuou o EO/EN e pode ser considerado uma possibilidade de intervenção precoce para os estágios iniciais e moderados da DRC. Entretanto, novos estudos serão necessários para confirmar esses achados.

Palavras-chave: antioxidante; ácido fólico; doença renal crônica; homocisteína.

MATSUMOTO, Andressa Keiko. **Effects of folic acid treatment in early and moderate stages of chronic kidney disease:** analysis of inflammatory, biochemical, and oxidative stress biomarkers. 2022. 88 p. Thesis (Doctoral degree in Health Sciences) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) consists of kidney damage and progressive and irreversible loss of kidney function, reducing the ability to eliminate toxic substances from the body. CKD evolves in stages (clinically agreed from 1 to 5), the duration of which depends on the etiology and its management. Oxidative and nitrosative stress (OS/NS) in CKD is caused by uremic toxins, being a potentially important factor in the mortality of these patients and mediator of many complications, mainly cardiovascular. New strategies are needed to improve clinical and laboratory conditions of these patients, such as folic acid supplementation. The aim of the present study was to evaluate the metabolic profile (urea, serum creatinine, insulin resistance (HOMA-IR), total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, uric acid, AST, ALT, total proteins, albumin, glucose and homocysteine [Hci]), inflammatory (CRP - C-reactive protein), as well as analysis of OS biomarkers (Total plasma antioxidant capacity [TRAP], Catalase, superoxide dismutase [SOD], glutathione system, sulfhydryl group [SH], paraoxonase1 [PON 1], chemiluminescent hydroperoxides [QL-LOOH], malondialdehyde [MDA], nitric oxide metabolites [NOx] and advanced protein oxidation products [AOPP]), hematological parameters (red blood cell count and reticulocytes) and disease severity by means of the glomerular filtration rate (GFR) in pre-dialysis subjects. 113 outpatients with CKD were selected and allocated to a group treated with folic acid (n=66) and were in different stages (3a [n=16], 3b [n=25] and 4 [n=25]) and one control group, without active intervention (n=47), in CKD stages 3-4 (3a [n=17], 3b [n=16] and 4 [n=14]). Hci levels were directly proportional to CKD progression and PON1 CMPAase and AREase activities were significantly lower in CKD stage 4 compared to stages 3a and 3b. This way evidencing the possibility of being potential biomarkers to follow the progression of CKD. Treatment with folic acid 5mg/day for 3 months, orally, in the G4 stage, reduced the levels of Hci, as well as of the SH groups and increased the activity of the antioxidant enzyme (PON1 CMPAase and AREase in stages 3b and 4, but not 3a). In addition, oxidative biomarkers (NOx and QL-LOOH) and hematologic parameters (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), serum iron, ferritin, and transferrin saturation) were significantly lower after treatment compared to baseline in the active intervention group. Treatment with folic acid did not cause significant changes in biochemical and inflammatory parameters. In the group without active intervention, no statistically significant effect was found on oxidative, inflammatory and biochemical biomarkers. Folic acid treatment attenuated OS/NS and can be considered a possibility for early intervention in the early and moderate stages of CKD. However, further studies will be needed to confirm these findings.

Keywords: antioxidant; folic acid; chronic kidney disease; homocysteine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Prognosis on CKD by GFR and albuminuria categories: KDIGO 2012	16
Figura 2 -	Metabolismo da Hci.....	22
Figura 3 -	Estrutura química do ácido fólico	25
 ARTIGO 1		
Figure 1 -	Consort flow diagram	36
Figure 2 -	The action of folic acid in CKD patients.....	42
 ARTIGO 2		
Figure 1 -	Consort flow diagram	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Critérios para DRC (qualquer um dos seguintes presentes por > 3 meses)	16
-------------------	--	----

ARTIGO 1

Table 1 -	Baseline comparison of socio-demographic and clinical data of chronic kidney disease patients treated with folic acid and controls	37
Table 2 -	Effect of folic acid treatment on biochemical markers in chronic kidney disease patients	37
Table 3 -	Effect of folic acid treatment on oxidative stress biomarker kidney disease patients	38
Table 4 -	Inter-group analyses to compare delta (Δ)	40
Table 5 -	Comparison between baseline levels and post-treatment, study groups treated with folic acid, in CKD groups on the integrated index of variables reported in table 2 and 3.....	40
Table 6 -	Results of multivariate GLM analyses on the data of antioxidant and oxidant biomarkers as a dependent variable and the final exploratory variables considering folic acid treatment, GFR groups, sex, age, BMI, IPAQ (VA/A/IA/S), diabetes, hypertension, use of station, ACEi + ARBs, ASA and smoking.....	41

ARTIGO 2

Table 1 -	Effect of folic acid treatment on estimated glomerular filtration rate (eGFR), paraoxonase (PON)1, COMPAase and AREase activities, homocysteine and vitamin B12: results of generalized estimating equation (GEE) analysis, repeated measures.....	67
Table 2 -	Associations between changes in folic acid, homocysteine and PON1, COMPAase and AREase enzyme activities from baseline to post-treatment: results of GEE analyses, repeated measures	68
Table 3 -	Effect of folic acid treatment on hematological parameters in CKD patients	69
Table 4 -	Differences in baseline PON1 activity, homocysteine levels and	

hematological parameters between study groups based on estimated glomerular filtration rate (eGFR) cut-off values 71

Table 5 -	Three-way interaction with effects of treatment, time and GFR groups on the integrated index of CMPAase + AREase activities, homocysteine levels and hematological parameters 73
------------------	--

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-MTHF	5-metiltetra-hidrofolato
ALT	Alanina Aminotransferase
AOPP	Produtos Avançados de Oxidação Proteica
AST	Aspartato Aminotransferase
CAT	Catalase
CBS	Cistationina- β -sintase
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CMPA	Acetato de 4-clorometilfenol
CPM	Contagem por minuto
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DRC	Doença Renal Crônica
EO	Estresse Oxidativo
EO/EN	Estresse Oxidativo e Estresse Nitrosativo
EPO	Eritropoetina
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GLM	Modelo Linear Geral
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona Reduzida
GT	Glutaciona Total
Hci	Homocisteína
HDL-c	Lipoproteínas de alta densidade
HHci	Hiper-homocisteinemia
HOMA-IR	Modelo de avaliação da Homeostase
HOMA-B	Modelo de avaliação da Homeostase das células beta
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IPAQ	<i>International Physical Activity Questionnaire</i>
IMC	Índice de Massa Corpórea
KDIGO	<i>National Kidney Foundation</i>

LDL-c	Proteínas de baixa densidade
LOOH	Hidroperóxidos
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
NOx	Oxido Nítrico
•OH	Radical hidroxila
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
PCR	Proteína C reativa
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SOD	Superóxido dismutase
THF	Tetra-hidrofolato
TFG	Taxa de filtração glomerular
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
TNF- α	Fator de necrose tumoral humana-alfa
TSR	Terapia de substituição renal
UEL	Universidade Estadual de Londrina
URL	Unidade Relativa de Luz

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	DOENÇA RENAL CRÔNICA E ESTRESSE OXIDATIVO.....	18
1.2	DOENÇA RENAL CRÔNICA E INFLAMAÇÃO	20
1.3	HOMOCISTEÍNA E DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	21
1.4	ESTRATÉGIAS CONTRA A PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA	23
1.5	VITAMINA B9 (FOLATO) – ÁCIDO FÓLICO	24
2	OBJETIVOS	25
2.1	ARTIGO 1: A RANDOMIZED TRIAL OF SHORT-TERM TREATMENT WITH FOLIC ACID TO REDUCE THE OXIDATIVE STRESS OF PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE	25
2.1.1	Objetivo Geral	26
2.1.2	Objetivos Específicos	26
2.2	ARTIGO 2: POTENTIALS BIOMARKERS TO FOLLOW-UP THE PROGRESSION OF CHRONIC KIDNEY DISEASE AND A NEW STRATEGY TO ENHANCED ANTIOXIDANT DEFENCES IN IN EARLY AND MODERATE STAGES	26
2.2.1	Objetivo Geral	26
2.2.2	Objetivos Específicos	26
3	MÉTODOS E CASUÍSTICA	26
3.1.	DELINEAMENTO DO ESTUDO	26
3.2	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	27
3.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	28
3.4	INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS	28
3.4.1	Questionário Estruturado	28
3.5	DADOS ANTROPOMÉTRICOS E MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL	28
3.6	AVALIAÇÕES LABORATÓRIAS.....	28
3.6.1	Coleta de Sangue	28
3.6.2	Avaliação dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo	29
3.6.2.1	Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP)	29
3.6.2.2	Determinação da superóxido dismutase (SOD)	29

3.6.2.3	Determinação da catalase (CAT)	30
3.6.2.4	Determinação do sistema glutatona (GT, GSH e GSSG)	30
3.6.2.5	Determinação de grupamento sulfidril (SH) totais no plasma	30
3.6.2.6	Determinação da atividade da paraoxonase1 (PON 1)	31
3.6.2.7	Determinação hidroperóxidos por quimiluminescência (QL- LOOH).....	31
3.6.2.8	Determinação quantitativa de malondialdeído (MDA)	31
3.6.2.9	Determinação de metabólitos do óxido nítrico (NOx)	32
3.6.2.10	Determinação de produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP).....	32
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
3.7.1	Artigo 1: A Randomized Trial of Short-Term Treatment with Folic Acid to Reduce the Oxidative Stress of Patients with Chronic Kidney Disease	32
3.7.2	Artigo 2: Potentials Biomarkers to Follow-Up the Progression of Chronic Kidney Disease and a New Strategy to Enhanced Antioxidant Defences in in Early and Moderate Stages.....	33
4	RESULTADOS	33
4.1	ARTIGO 1	34
4.2	ARTIGO 2	46
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXOS	81
	ANEXO A- Parecer Consubstanciado o CEP.....	82
	APÊNDICES	84
	APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Grupo Intervenção.....	85
	APÊNDICE B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Grupo Controle.....	87

APÊNDICE C – Questionário Internacional de Atividade Física – IPAQ.....	89
--	----

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é um grande problema de saúde pública, em especial pelo crescente envelhecimento populacional e o aumento de fatores de risco tradicionais, como hipertensão, tabagismo, dislipidemia e *diabetes mellitus* (LEVI *et al.*, 2014). O número de casos de pacientes com DRC continua aumentando inexoravelmente nos países economicamente desenvolvidos, bem como nos países em desenvolvimento (NEUEN *et al.*, 2017; YUAN *et al.*, 2017). Segundo o *Global Burden of Disease Study* (GBD 2015), a DRC foi a 12ª causa mais comum de óbitos, respondendo por 1,1 milhão de óbitos em todo o mundo. Essa doença está afetando em torno de 9% da população mundial (BIKBOV *et al.*, 2020), é definida como uma condição patológica que apresenta a estrutura renal anormal e/ou disfunção na taxa de filtração glomerular estimada (TFGe <60 mL/min/1,73 m²) presente por pelo menos três meses (KDIGO, 2021). Além disso, a função renal diminuída é um preditor de hospitalização, disfunção cognitiva e baixa qualidade de vida.

No Brasil, a prevalência estimada em adultos com DRC (estágios 3 a 5) é de 6,7%, triplicando em indivíduos com 60 anos ou mais (MALTA *et al.*, 2019). Essa condição crônica foi responsável, em 2016, por 35.000 óbitos e ocupou a 10ª posição (ENE-IORDACHE *et al.*, 2016). Estima-se também que 2,3 milhões a 7,1 milhões de indivíduos morrem prematuramente por falta de acesso à terapia renal substitutiva, com maiores taxas de mortalidade em países de baixa e média renda (na Ásia, África e América Latina) (LIYANAGE *et al.*, 2015).

Existe um aumento na morbidade e mortalidade por doença cardiovascular (DCV) em pacientes nos estágios mais avançados da DRC (HUSAIN-SYED *et al.*, 2015). Os fatores de risco clássicos para DCV como idade avançada, hipertensão, diabetes, tabagismo, dislipidemia, hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca e sedentarismo, estão frequentemente presentes em pacientes em terapia de substituição renal (TSR). Isto se deve em parte à epidemiologia da população em TSR, que consiste principalmente de pacientes afetados por *diabetes mellitus* e doença vascular (YUAN *et al.*, 2017).

O *diabetes mellitus* pode lesar capilares glomerulares sendo que o primeiro sinal de problema renal é a presença de proteinúria. Cerca de um terço das pessoas com *diabetes mellitus* pode, eventualmente, desenvolver DRC (BIKBOV *et al.*, 2020). A função renal é mensurada ou estimada pela taxa de filtração glomerular (TFG) e, para tanto, são considerados os resultados da dosagem de creatinina tanto no sangue como na urina, para cálculo do clearance de creatinina, ou por meio de cálculos como pelas fórmulas de *Cockcroft-Gault* (FROISSART *et al.*, 2005), *Modification of Diet in Renal Disease* – MDRD - (LEVEY *et al.*, 1999) ou *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*- CKD-EPI -

1 (LEVEY et al., 2009).

2 Segundo as diretrizes sobre DRC, elaboradas pela KDIGO (2021), recomenda-se a
3 utilização da equação CKD-EPI para a estimativa da TFG e ressalta-se a necessidade de
4 lançar mão de outros métodos para a confirmação do diagnóstico da DRC. Por exemplo, o
5 KDIGO (2021) recomenda a confirmação diagnóstica da DRC em adultos com TFG estimada
6 (TFGe) entre 45-59 mL/min/1,73 m².

7 Cistatina C, uma proteína de baixo peso molecular, é produzido em todas as células
8 nucleadas do corpo, sendo filtrada no glomérulo, metabolizada no túbulo proximal e
9 preenche os critérios para um marcador de filtração renal. Em contraste com a creatinina
10 sérica, a taxa de produção de cistatina C não tem relação com massa muscular e não é
11 afetada por outros fatores, como idade, sexo e raça (BJORK et al., 2019). Contudo, há
12 limitações para o uso da cistatina C na rotina laboratorial. No Brasil, esse exame não está
13 disponível na maioria dos serviços e seu custo ainda é elevado; em alguns laboratórios de
14 qualidade reconhecida no país que realizam tal exame, o custo é de aproximadamente oito
15 vezes o da creatinina (GABRIEL; NISHIDA; KIRSZTAJN 2011).

16 A albuminúria (expressa em mg/g de creatinina) foi categorizada em A1 (ou normal
17 ou ligeiramente aumentada, quando < 30 mg/g), A2 (ou moderadamente aumentada, na
18 faixa entre 30-300 mg/g) e A3 (ou acentuadamente aumentada para valores > 300 mg/g),
19 terminologia que substitui as nomenclaturas normoalbuminúria, microalbuminúria e
20 macroalbuminúria, anteriormente adotadas (Figura 1). No que tange à avaliação da função
21 renal, de uma maneira mais geral, aceita-se a medição da TFG, que é um componente da
22 função de excreção, como o melhor índice para avaliação funcional, embora os rins tenham
23 muitas outras funções, inclusive endócrinas e metabólicas (KIRSZTAJN et al., 2014).

24

25 **Figura 1:** Prognóstico da DRC pelas categorias de TFGe e albuminúria.

26

Prognosis of CKD by GFR and albuminuria categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories		
				Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				< 30 mg/g < 3 mg/mmol	30–300 mg/g 3–30 mg/mmol	> 300 mg/g > 30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/1.73 m ²) Description and range	G1	Normal or high	≥ 90			
	G2	Mildly decreased	60–89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45–59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30–44			
	G4	Severely decreased	15–29			
	G5	Kidney failure	< 15			

1
2 **Fonte:** KDIGO (2021).

3
4 Segundo a *National Kidney Foundation* (KDIGO, 2021) existem 6 estágios da DRC:
5 o estágio G1 refere-se ao normal (TFGe ≥ 90 mL/min/1,73 m²), G2 a levemente diminuído
6 (TFGe = 60-89 mL/min/1,73 m²), G3a (TFGe 45-59 mL/min/1,73 m²), G3b (TFGe 30-44
7 mL/min/1,73 m²), G4 para função renal gravemente reduzida (eGFR 15-29 mL/min/1,73 m²)
8 e G5 para insuficiência renal, incluindo doença renal terminal (TFGe <15 mL/min/1,73 m²).

9 A tabela 1 apresenta os critérios para diagnóstico da DRC baseada nos marcadores
10 de lesão renal e na taxa de filtração glomerular.

11 **Tabela 1:** Critérios para DRC (qualquer um dos seguintes presentes por > 3 meses).

Marcadores de lesão renal (um ou mais)

Albuminúria (> 30 mg/24h; relação albumina/creatinina 30 mg/g)

Anormalidades no sedimento urinário

Distúrbios eletrolíticos e outros devido a lesões tubulares

Anormalidades detectadas por exame histológico

Anormalidades estruturais detectadas por exame de imagem

História de transplante renal

TFG diminuída

< 60 ml/min/1,73 m² (categorias de TFG G3a-G5)

12 **Fonte:** Adaptação KDIGO (2021). DRC: Doença renal crônica; TFG: Taxa de filtração glomerular

1 A anemia é uma das principais complicações da DRC, causada por uma deficiência
2 de eritropoietina endógena. Ocorre também uma relação entre estado inflamatório crônico,
3 estresse oxidativo e nitrosativo (EO/EN) e anemia nesses pacientes (STEPNIEWSKA,
4 2015). As citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral humana-alfa (TNF- α),
5 interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL- 6) têm um efeito inibitório sobre precursores eritróides na medula
6 óssea, levando ao desenvolvimento de resistência da eritropoietina, que pode ser superada
7 através da administração de doses de eritropoetina (EPO) humana recombinante (SANTOS
8 et al., 2018).

9 A IL-6 estimula a expressão hepática de uma proteína de fase aguda, a hepcidina,
10 que inibe a absorção duodenal de ferro. A hepcidina, quando liberada pelo fígado, inibe a
11 proteína ferroportina. Esta é uma proteína transmembrana encontrada nos enterócitos,
12 macrófagos e hepatócitos, responsável pela transferência de Fe²⁺ absorvido para a
13 circulação. Como resultado, ocorre um nível baixo de ferro sérico, levando à diminuição da
14 liberação de ferro para a medula óssea e, conseqüentemente, favorecendo a anemia,
15 mesmo na presença de reservas totais de ferro, ou seja, a chamada deficiência funcional de
16 ferro (SILVERBERG et al., 2011).

17 Além disso, o TNF- α , IL-1 e IL-6 induzem a expressão de ferritina e estimulam o
18 armazenamento e retenção de ferro dentro dos macrófagos. Dessa forma, esses
19 mecanismos levam a uma redução dos níveis de ferro na circulação e, conseqüentemente,
20 da disponibilidade do mesmo para as células eritroides. Além desses mecanismos descritos,
21 TNF- α inibe a produção de EPO pelo rim, levando a níveis inapropriadamente baixos no
22 sangue e conseqüentemente piora da anemia, bem como inibem diretamente a
23 diferenciação e proliferação de células progenitoras de eritrócitos. Com isso, somada a
24 disponibilidade limitada de ferro e a diminuição da EPO biologicamente ativa, haverá inibição
25 da eritropoese e, conseqüentemente, o desenvolvimento de anemia (WEISS, 2002;
26 SILVERBERG et al., 2011).

27 Em pacientes com DRC, a anemia apresenta-se como normocrômica/normocítica ou,
28 eventualmente, discretamente microcítica/hipocrômica e com contagem baixa ou normal de
29 reticulócitos. Além disso, a capacidade de ligação do ferro à transferrina e o ferro sérico
30 encontram-se reduzidos e os níveis plasmáticos de ferritina estão normais ou elevados
31 (WEISS, 2002).

32 O aumento do EO/EN é um dos motivos de morte prematura dos eritrócitos (eritose)
33 devido ao excesso de exposição à fosfatidilserina na superfície do eritrócito. A hepcidina
34 desempenha um papel importante no metabolismo do ferro e, conseqüentemente, no
35 desenvolvimento da anemia na DRC. Contudo, os níveis de hepcidina se correlacionam
36 positivamente com atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de EO/EN,

1 principalmente em pacientes não dialisados. Um aumento no nível de hepcidina coexiste
2 com menor reabsorção de ferro na DRC (STEPNIEWSKA, 2015).

3 4 1.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA E ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO

5
6 O EO/EN consiste no desequilíbrio entre substâncias pró e antioxidantes
7 intracelulares ou de forma sistêmica resultando na superprodução de espécies reativas de
8 oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) e diminuição do sistema de defesas antioxidantes (WAN;
9 SU; ZHANG, 2016). Resultando na oxidação de moléculas biológicas, como lipídeos,
10 proteínas e ácido desoxirribonucleico - DNA (DI MEO et al., 2016).

11 A geração de compostos oxidativos é fisiologicamente relevante como um passo
12 importante na inflamação e processos de reparo de tecidos. Portanto, representa parte dos
13 mecanismos de defesa contra invasões de microrganismos e células malignas, bem como
14 na cicatrização e remodelação de tecidos. Por outro lado, uma ativação inadequada ou mal
15 adaptativa aos processos que envolvem agentes oxidativos pode estar cronicamente
16 presente em situações como a uremia, contribuindo para a lesão tecidual (HANDELMAN,
17 2000). ERO/ERN são liberadas juntamente com citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez
18 amplificam a geração de oxidantes (SURESHBABU; RYTER; CHOI 2015).

19 Devido à disfunção renal, a depuração de substâncias pró-oxidantes encontra-se
20 reduzida e mecanismos de defesa antioxidante que desempenham um papel de proteção
21 complementar ficam comprometidos (DUNI et al., 2017). Esse desequilíbrio o pró-oxidante
22 e mecanismos antioxidantes podem contribuir para o dano entre tubulointersticial e
23 progressão da DRC (KENNEDY et al., 2013). O rim é um órgão altamente metabólico, rico
24 em reações de oxidação nas mitocôndrias, o que o torna vulnerável aos danos causados
25 pela EO/EN. Além disso, em pacientes em estágios avançados de DRC, o aumento do
26 EO/EN está associado a complicações como hipertensão, aterosclerose, inflamação e
27 anemia (DI MEO et al., 2016).

28 Com a redução progressiva da função renal, ocorre o acúmulo de resíduos orgânicos,
29 chamados de toxinas urêmicas (ureia, creatinina, homocisteína [Hci], oxalato, fósforo,
30 guanidinas, entre outras), podem propiciar a peroxidação lipídica, oxidação proteica e
31 redução na concentração de enzimas antioxidantes em pacientes com DRC (TBAHRITI,
32 2013). Além disso, a superprodução de ERO/ERN é agravada por fatores relacionados ao
33 paciente, como idade e a presença de inflamação sistêmica crônica (STEPNIEWSKA, 2015).
34 As comorbidades (obesidade, hipertensão, *diabetes mellitus*, etc.) e fatores relacionados ao
35 processo de hemodiálise, por exemplo a bioincompatibilidade da membrana, especialmente
36 em pacientes com DRC em diálise de longa data podem influenciar no aumento do EO/EN

1 (BOSSOLA; TAZZA, 2015).

2 Além disso, o aumento do EO/EN promove apoptose de células renais, diminuição
3 da capacidade regenerativa das células e fibrose, apresentando um efeito deletério sobre a
4 função renal. Desta forma, o EO/EN é um fator importante na patogênese da lesão renal
5 (WAN; SU; ZHANG, 2016). À medida que aumentam o EO/EN e a inflamação, ambos
6 comuns nos estágios finais da doença renal, especula-se que pode haver uma associação
7 entre eles e disfunção endotelial, contribuindo para um aumento do risco de DCV nestes
8 pacientes (TBAHRITI, 2013).

9 Além do EO/EN elevado, indivíduos com DRC exibem anormalidades nas
10 lipoproteínas. A dislipidemia é caracterizada pela hipertrigliceridemia, níveis elevados de
11 colesterol total ou da lipoproteína de densidade baixa (LDL), ou níveis diminuídos da
12 lipoproteína de densidade alta (HDL), além da distribuição alterada das subclasses de HDL,
13 que também possuem propriedades antioxidantes, anti-trombóticas e anti-inflamatórias que
14 contribuem significativamente para a proteção cardiovascular em geral (CHISTIakov et al.,
15 2017). Usando eletroforese em gradiente de gel, as partículas de HDL podem ser divididas
16 em HDL₂ grande (HDL_{2b}, HDL_{2a}) e pequenas subclasses HDL₃ (HDL_{3a}, HDL_{3b} e HDL_{3c}) que
17 são diferentes não apenas em tamanho, mas também em estrutura e função (MILJKOVIC
18 et al., 2018). Ainda é controverso quais subclasses têm melhor efeito anti-oxidativo,
19 especialmente na patologia renal, onde as partículas de HDL são estruturalmente e
20 funcionalmente alteradas como consequência do aumento do estresse oxidativo e da
21 inflamação (CHISTIakov et al., 2017).

22 Paraoxonases (PONs) são uma família de três proteínas - PON1, PON2 e PON3,
23 que hidrolisam organofosforados e têm atividade de peroxidase, lactonase e também
24 arilesterase, embora em diferentes extensões. Todas as três PONs também hidrolisam
25 fosfolípidios oxidados. PON1 e PON3 são encontradas no HDL plasmático e são capazes
26 de proteger o LDL contra a oxidação, contribuindo para as propriedades antiaterogênicas do
27 HDL (SAMOUILIDOU et al., 2018).

28 Historicamente, a PON derivou seu nome de sua capacidade de hidrolisar o
29 paraoxon, um organofosforado contido em alguns praguicidas (LA DU et al., 1999).
30 Pesquisas nas últimas décadas revelaram numerosos outros substratos para esta enzima,
31 como fenil acetatos (MARTINELLI et al., 2013; FURLONG et al., 2016).

32 A atividade hidrolítica biológica de PON1 pode ser descrita como uma atividade de
33 lipolactonase, que engloba atividades de arilesterase (AREase), fosfotriesterase e lactonase
34 (MOYA; MÁÑEZ 2018). Conforme revisado por Ceron et al. (2014), a atividade de PON1
35 pode ser avaliada usando diferentes substratos resultando na determinação da atividade da
36 paraoxonase/fosfotriesterase (paraoxon ou 4-acetato de clorometilfenol (CMPA) como

1 substratos), atividade da AREase (fenilacetato ou 4 (p)-nitrofenil acetato como substratos)
2 ou atividade de lactonase (5-tiobutil butirolactona ou diidrocurmarina como substratos). A
3 paraoxonase (ou CPMase) e a AREase são as atividades mais investigadas embora a
4 atividade da lactonase seja considerada por alguns autores como a principal atividade
5 fisiológica (MENINI; GUGLIUCCI 2014).

6 A diminuição da atividade da PON1 está associada a diferentes patologias incluindo
7 DRC (CHISTIAKOV et al., 2017; KENNEDY et al., 2013), mas o mecanismo exato envolvido
8 na alteração da atividade da PON1 ainda é desconhecido (MILJKOVIC et al., 2018).
9 Contudo, resultados de Samouilidou et al. (2016) mostraram que a diminuição da
10 concentração sérica de PON1 é influenciada pelo perfil lipídico de pacientes com DRC. A
11 dislipidemia é principalmente associada a baixos níveis séricos de HDL, alto níveis de
12 triglicerídeos e níveis elevados de lipoproteínas ricas em triglicerídeos ou remanescentes de
13 lipoproteínas. Além disso, a redução nos mecanismos de defesa antioxidante, como PON1,
14 exacerba anormalidades lipídicas (LEWISL; HAYNES; LANDRAY 2010).

16 1.2 DOENÇA RENAL CRÔNICA E INFLAMAÇÃO

17
18 A DRC é caracterizada por inflamação persistente de baixo grau, um fator de risco
19 bem estabelecido de morbidade e mortalidade, sendo caracterizada pelo aumento dos níveis
20 de EO/EN e inflamação. O mecanismo patológico primário que liga EO/EN, inflamação e
21 progressão da DRC é caracterizado por uma lesão inicial no rim devido às atividades de
22 radicais derivados de oxigênio e nitrogênio intra e extracelular e a resposta inflamatória
23 resultante. Radicais como o superóxido e o radical hidroxila interagem prontamente com os
24 componentes moleculares do néfron (GUPTA et al., 2012).

25 À medida que ocorrem danos nos néfrons mediados por radicais, a resposta
26 inflamatória resultante, que normalmente serve como mecanismo protetor e reparador,
27 estimula a formação de radicais livres adicionais. Os neutrófilos (e outros fagócitos)
28 recrutados para o néfron danificado produzem superóxido por meio de seu sistema de
29 nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase associado à membrana, no
30 qual os elétrons são transferidos do NADPH dentro da célula através da membrana e
31 acoplados ao oxigênio molecular, resultando na formação de superóxido (CLOSA, FOLCH-
32 PUY 2004).

33 O superóxido e outros radicais, bem como seus alvos modificados, continuam a
34 promover lesão renal específica ou atuam como moléculas mensageiras, resultando em uma
35 resposta inflamatória sustentada localmente (ou seja, renal). Essa resposta imune induzida
36 por radicais estimula a liberação de sinais pró-inflamatórios adicionais que inevitavelmente

1 resultam na formação de radicais adicionais e/ou ERO e danos contínuos aos componentes
2 moleculares dos néfrons (CACHOFEIRO et al., 2008). Após o estresse oxidativo recorrente
3 e inflamação crônica, o dano mediado por radicais eventualmente resulta em degradação
4 de néfrons tão extensa que o dano ao tecido/órgão se torna aparente (por exemplo, TFG
5 reduzida) (CLOSA, FOLCH-PUY 2004).

6 Uma correlação inversa entre TFG e inflamação já foi claramente comprovada
7 (GUPTA et al., 2012; AMDUR et al., 2016;). No estudo observacional de coorte de Gupta et
8 al. (2012), envolvendo pacientes com DRC e avaliando os biomarcadores de inflamação
9 (IL-1 β , antagonista do receptor de IL-1, IL-6, TNF- α , PCR e fibrinogênio), mostraram que
10 esses biomarcadores foram inversamente associados às medidas de função renal e
11 positivamente com albuminúria, ou seja, a intensidade da inflamação é maior em pacientes
12 com menor função renal e níveis mais elevados de albuminúria.

13 Segundo Dan et al. (2018) em pacientes com DRC o risco de eventos
14 cardiovasculares e renais apresenta-se elevado em casos que os níveis basais de PCR
15 encontra-se acima dos valores de referência.

16 Evidências emergentes sugerem que a redução do estresse oxidativo e da
17 inflamação são duas das abordagens mais apropriadas, em termos de retardar a progressão
18 da DRC (DOUNOUSI et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2021).

19

20 1.3 HOMOCISTEÍNA E DOENÇA RENAL CRÔNICA

21

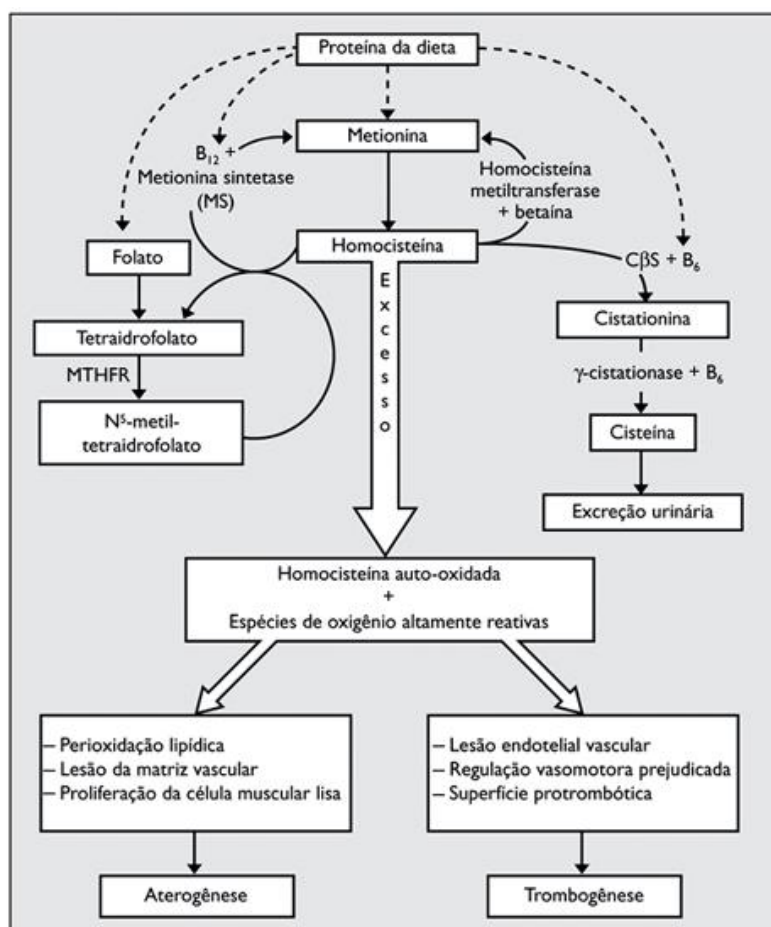
22 O derivado da Hci é a metionina (Figura 2), proveniente da dieta ou da quebra de
23 proteínas endógenas, é convertido em S-adenosilmetionina (SAM) pela enzima SAM
24 sintase. O SAM é um dos principais doadores de grupos metil para várias reações de
25 metilação (LONG; NIE 2016). Quando o grupo metil é transferidos por metiltransferases para
26 os respectivos aceptores, o SAM é convertido em S-adenosil-homocisteína (SAH) e
27 posteriormente hidrolisado pela SAH hidrolase para formar Hci e adenosina (PERNA;
28 INGROSSO 2019). Uma vez formada, a Hci pode ser metabolizada por duas vias
29 alternativas: remetilação e transsulfuração. A via remetilação regenera a metionina pela
30 enzima Metionina sintetase (MS) usando Hci como substrato e folato e vitamina B 12 como
31 cofatores (LI et al., 2006).

32 A transsulfuração de Hci é catalisada por cistationina- β -sintase (CBS) e γ -
33 cistationase. Nesse caminho, Hci primeiro sofre condensação com serina para formar
34 cistationina por CBS (LONG; NIE 2016). Então, a cistationina é decomposta em cisteína por
35 γ -cistationase. Finalmente, a cisteína é metabolizada em taurina e sulfato ou transferida para
36 glutatona (LI et al., 2006). Foi demonstrado que a Hci é principalmente transsulfurada no

1 rim e a deficiência dessa transsulfuração renal contribui de maneira importante para a
 2 elevação da Hci plasmática sob diferentes condições fisiológicas ou patológicas, como
 3 hipertensão, *diabetes mellitus*, envelhecimento ou progressão para estágio final da renal
 4 doença (LONG; NIE 2016).

5 A concentração de Hci depende fundamentalmente da taxa de sua formação
 6 (transmetilações), bem como da taxa de remoção da homocisteína. A Hci está presente na
 7 circulação sanguínea covalentemente ligada à albumina sérica, impedindo a excreção da
 8 porção ligada à proteína (PERNA; INGROSSO 2019).

9



10

11 **Figura 2:** Metabolismo da Hci.

12 **Fonte:** Neves, Macedo, Lopes (2004).

13 A Hci contém um grupo tiol altamente reativo e pode sofrer rápida auto-oxidação na
 14 presença de oxigênio e íons metálicos (ferro e cobre) gerando ERO potentes, incluindo ânion
 15 superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio e radical hidroxila ($\bullet OH$), sugerindo que a auto-
 16 oxidação da Hci é um dos mecanismos de formação de ERO. A NADPH oxidase é uma das
 17 principais fontes de produção de superóxido em células de mamíferos (TYAGI et al., 2005).
 18 Estudos demonstraram que a NADPH oxidase está envolvida na lesão glomerular

1 progressiva associada à HHci (SHASTRY et al., 2007; LONG; NIE 2016).

2 A Hci, em níveis elevados, pode causar danos vasculares renais diretamente através
3 da produção de espécies de oxigênio, efeitos nas células do músculo liso vascular, lesão
4 endotelial e apoptose (OIKONOMIDI, et al. 2016). Além disso, a hiper-homocisteinemia
5 (HHci), definida como elevada concentração de Hci total plasmática ($>12\mu\text{M}$), está associada
6 com microalbuminúria e lesão glomerular na maioria da população diabética, sendo a HHci
7 um fator de risco para o declínio da função renal e desenvolvimento da DRC (MANOLESCU
8 et al., 2010; XIE *et al.*, 2015).

9 O nível de Hci em pacientes com DRC é de 3-5 vezes acima dos valores de
10 referência. É de conhecimento a existência de uma correlação positiva altamente
11 significativa entre as concentrações de creatinina e Hci. Valores de TFGe da creatinina
12 sérica ou depuração calculada da creatinina são consistente e inversamente correlacionados
13 com níveis de Hci plasmática. Essa correlação é uma poderosa evidência indireta que HHci
14 na doença renal estão intimamente ligadoo à função renal (LONG; NIE 2016).

15

16 1.4 ESTRATÉGIAS CONTRA A PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

17

18 DRC é uma doença complexa e coexiste com muitas outras condições. Portanto,
19 modelos de atendimento devem ser desenvolvidos que integram a complexidade das
20 condições clínicas, filosofias centradas no paciente e os cuidados de saúde incluindo o
21 ambiente. Os princípios do cuidado são universais, mas a implementação pode ser
22 personalizada para circunstâncias específicas. O modelo de cuidado varia de acordo com a
23 gravidade da DRC, o que determinará a população-alvo e objetivos. Estas declarações são
24 formuladas para abranger predominantemente aquelas pessoas com probabilidade de
25 progredir para estágio final da doença (KDIGO, 2021).

26 Outra estratégia importante no tratamento de pacientes com DRC é a modificação do
27 estilo de vida, incluindo dieta, exercícios e cessação do tabagismo (KDIGO, 2021).
28 Estratégias podem retardar a progressão da DRC e reduzir os riscos da mortalidade por
29 doenças cardiovasculares. Essas estratégias englobam o controle da pressão arterial com
30 agentes que bloqueiam a via renina-angiotensina, controle glicêmico e hipolipemiantes
31 reduzindo a incidência de eventos ateroscleróticos (VIVEKANAND *et al.*, 2013). Atualmente
32 as medicações utilizadas na DRC são para tratamento das comorbidades, como *diabetes*
33 *mellitus* e doenças cardíacas (ROVIN et al., 2019).

34 Na busca por tratamentos que reduzem a progressão da DRC e em função da
35 importância do EO/EN nesta doença, é crescente o número de estudos com agentes
36 antioxidantes nesses pacientes (DELFINO et al., 2007; HOUSE et al., 2010; LIAKOPOULOS

1 et al., 2019).

2

3 1.5 VITAMINA B9 (FOLATO) – ÁCIDO FÓLICO

4

5 Vitaminas do grupo B, incluindo as vitaminas B9 (folato) e B12 (cobalamina) são
6 vitaminas hidrossolúveis, envolvidas em várias funções celulares normais: são fornecedoras
7 de resíduos de carbono para purina e síntese de pirimidina, síntese de nucleoproteínas e
8 manutenção na eritropoiese (SCHAEFER; KOSCH; TESCHNER 2002).

9 O folato é derivado de poliglutamatos nos alimentos que são desconjugados no jejuno
10 superior e transportado ativamente através do epitélio da mucosa (FISCHBACH; DUNNING
11 2008). O folato circula como 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF), pela ação da enzima
12 metilenotetrahidrofolato (MTHF) redutase que é ainda desmetilado em tetra-hidrofolato
13 (THF) em uma reação catalisada por B12, que requer Hci como um aceitador de metila
14 (levando à geração de metionina). O tetrahidrofolato é responsável por transferir carbono
15 nas reações do organismo, principalmente nas reações necessárias para a síntese de DNA.

16 A manifestação clínica da deficiência das vitaminas B9 e B12 é a anemia
17 megaloblástica (SCHAEFER; KOSCH; TESCHNER 2002). Vegetais de folhas verdes, grãos
18 integrais, fermento e fígado são particularmente ricos em folato, preferencialmente quando
19 cru ou não fortemente processado. Além disso, as bactérias intestinais também sintetizam
20 folato (CHOUMENKOVITCH et al., 2001). Em muitos países, farinha e pão são enriquecidos
21 com folato como estratégia da saúde pública. Essa medida resultou em uma redução de
22 4,9% para 1,9% na proporção de pessoas na população que apresentavam deficiência de
23 folato (MALOUF; GRIMLEY; AREOSA 2003).

24 O Ácido Fólico também apresenta considerável atividade antioxidante pois em sua
25 estrutura molecular existe um grupo hidroxila no anel do tipo purina (Figura 3). Em suas
26 reações com radicais oxidantes, como mostrado no estudo de Joshi et al. (2001), *in vitro*, o
27 ácido fólico inibiu a oxidação da hipoxantina em ácido úrico. Já em estudo *in vivo*, do mesmo
28 autor, o ácido fólico inibiu a peroxidação lipídica microssomal que foi dependente da
29 concentração administrada, desta forma, espera-se que esse grupo hidroxila desempenhe
30 um papel antioxidante.

31 Além disso, o folato é o principal componente dietético que controla os níveis de HHci
32 em nosso organismo (embora a vitamina B12 também contribua neste processo, é em
33 menor proporção). Uma suplementação entre 0,5-5,0 mg/dia de ácido fólico diminui cerca
34 de 25% os níveis de Hci (LONN et al., 2006).

35

36

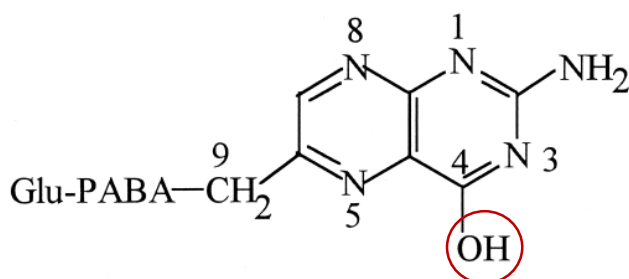


Figura 3: Estrutura química do ácido fólico.

Fonte: Adaptado de Joshi et al. (2001).

Racek et al. (2005) observaram o efeito do folato e antioxidantes isoladamente sobre os níveis de homocisteína e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com hiperhomocisteinemia e comprovaram que a suplementação de ácido fólico 5mg/d durante 5 meses foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica. Outros estudos apontam o folato como co-substrato na remetilação do metabolismo da Hci, observando uma intervenção significativa e efetiva do ácido fólico na redução das concentrações plasmáticas da mesma (DELFINO et al., 2007; HOUSE et al., 2010; SHEVCHUK et al., 2019).

Poucos estudos examinaram a associação do EO/EN na progressão da DRC em pacientes não dialíticos. Além disso, considerando-se o amplo uso terapêutico de diuréticos e drogas cardiovasculares por esses pacientes e o envolvimento do EO/EN no desenvolvimento da DRC, torna-se desafiador identificar possíveis novas propriedades farmacológicas desses medicamentos (além das já estabelecidas), como por exemplo um caráter antioxidante capaz de auxiliar no tratamento desta doença.

Até o momento não é de nosso conhecimento que tenha sido feito algum trabalho onde se avalie grande quantidade de biomarcadores de EO/EN em pacientes com DRC em diferentes estágios da doença (G3a, G3b e G4) cuja intervenção tenha sido realizada em um curto período (3 meses) com ácido fólico (5mg/d). Por fim, a detecção precoce da DRC e condutas terapêuticas apropriadas para minimizar sua progressão podem reduzir o sofrimento destes pacientes bem como os custos financeiros associados a esta doença. Em função disto, na busca por tratamentos que auxiliem na diminuição da progressão da DRC, são crescentes os estudos com agentes antioxidantes nesses pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 ARTIGO 1: A RANDOMIZED TRIAL OF SHORT-TERM TREATMENT WITH FOLIC ACID TO REDUCE THE OXIDATIVE STRESS OF PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

1 2.1.1 Objetivo Geral

2 Examinar os efeitos do tratamento com ácido fólico (5mg/d) em marcadores
3 bioquímicos e biomarcadores de EO/EN em pacientes com DRC pré dialíticos.

4

5 2.1.2 Objetivos Específicos

6 Avaliar os efeitos do ácido fólico nas alterações de marcadores bioquímicos em
7 pacientes com DRC;

8 Verificar se o tratamento com ácido fólico aumenta as defesas antioxidantes e atenua
9 os marcadores pró oxidantes de pacientes em pré-diálise;

10 Analisar se as alterações de biomarcadores antioxidantes e oxidantes estão
11 relacionadas com as variáveis: tratamento com ácido fólico, TFG, sexo, idade, IMC, IPAQ,
12 *diabetes mellitus*, hipertensão, uso de medicamentos e tabagismo.

13

14 2.2 ARTIGO 2: POTENTIAL BIOMARKERS TO FOLLOW-UP THE PROGRESSION OF CHRONIC KIDNEY
15 DISEASE AND A NEW STRATEGY TO ENHANCE ANTIOXIDANT DEFENCES IN EARLY AND MODERATE
16 STAGES.

17

18 2.2.1 Objetivo Geral

19 Examinar se em pacientes nos diferentes estágios da DRC (G3a, G3b e G4) o ácido
20 fólico (5 mg/d) pode influenciar nos parâmetros hematológicos, atividades da enzima PON1,
21 na TFG e nos níveis de Hci.

22

23 2.2.2 Objetivos Específicos

24 Analisar os efeitos do ácido fólico nos parâmetros hematológicos em pacientes nos
25 estágios iniciais e moderado da DRC, sem anemia;

26 Verificar se o tratamento é eficaz em melhorar a TFG, aumentar atividades de
27 enzimas antioxidantes (PON1) e diminuir os níveis de Hci;

28 Discutir a possibilidade do uso de potenciais biomarcadores laboratoriais (Hci e
29 atividade da PON1) para acompanhar a progressão da DRC.

30

31

32 3 MÉTODOS E CASUÍSTICA

33

34 3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

35

36 O delineamento refere-se a um ensaio clínico aleatorizado.

1 3.2 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

2

3 Neste estudo, 113 pacientes ambulatoriais com DRC foram recrutados no
4 ambulatório de nefrologia do ambulatório de especialidades do hospital universitário (AEHU)
5 da Universidade Estadual de Londrina (HC-UEL), no período entre os anos de 2017 e 2018,
6 e alocados em grupos intervenção (n=66) e controle (n=47). Todos os participantes eram
7 brasileiros, com idades entre 18 e 65 anos, em ambos os sexos. Para o cálculo da amostra
8 considerou-se um erro amostral de 5% e um nível de confiança de 95%. Considerando-se
9 os dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia de 2014 (SESSO et al., 2016), onde para
10 cada 01 paciente em diálise temos 10 com DRC em situação não dialítica, chegou-se a um
11 número aproximado de 115 pacientes para condução deste estudo. Considerando uma
12 possível perda amostral por diferentes razões de cerca de 20%, chegamos a um total de 138
13 pacientes.

14 O diagnóstico clínico da DRC dos pacientes foi obtido nos prontuários médicos do
15 hospital. As equações MDRD (LEVEY et al., 1999) e CKD-EPI (LEVEY et al., 2009) foram
16 usadas para estimar a TFG com base nos níveis séricos de creatinina. Os pacientes com
17 DRC foram classificados em três grupos, de acordo com a TFGe, classificação em G3a, G3b
18 e G4 (KDIGO, 2021).

19 Os critérios de inclusão foram: pacientes de ambos os sexos, idade acima de 18 anos
20 em plena condição cognitiva, sem apresentar comorbidades que predissem a participação
21 neste estudo e com TFGe correspondente à classificação nos estágios 3-4 da DRC.

22 Os critérios de exclusão para todos os sujeitos foram: a) idade inferior a 18 anos; b)
23 distúrbios neuroinflamatórios, incluindo doença de Parkinson, acidente vascular cerebral,
24 esclerose múltipla e doença maligna; e c) uso de drogas imunomoduladoras e/ou
25 suplementos de antioxidantes e ácidos graxos ω 3-poliinsaturados. Todos os pacientes foram
26 alocados em um grupo de intervenção ativo (tratamento com ácido fólico) ou em um grupo
27 controle (sem intervenção). A dose de ácido fólico foi fixada em uma concentração de 5 mg
28 por dia em comprimidos. A escolha dessa dosagem é baseada em estudos anteriores
29 (NANAYAKKARA et al., 2007; HOUSE et al., 2010).

30 Dados sociodemográficos e clínicos foram coletados de todos os participantes,
31 incluindo presença de *diabetes*, hipertensão, uso de anti-hipertensivos ou estatinas. A
32 pressão arterial sistólica e diastólica (SP e DP) foi mensurada com esfigmomanômetro
33 aneroide. O diagnóstico de transtorno de uso do tabaco (TUD) foi realizado utilizando os
34 critérios do DSM-IV-TR. Também foi avaliado o índice de massa corporal (IMC) como peso
35 corporal (kg) / altura (m²).

36

1 3.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

2

3 O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres
4 Humanos da Universidade Estadual de Londrina/Hospital Universitário Regional Norte do
5 Paraná, com parecer nº do CAAE: 63097216.1.0000.5231 (ANEXO A). Este estudo foi
6 registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC), sob a referência RBR-2bfthr.

7 Todos os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e
8 informados, em detalhes, sobre o estudo a ser desenvolvido. Logo após tomarem ciência do
9 projeto, o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A e B) foi assinado por
10 todos os pacientes.

11

12 3.4 INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS

13

14 3.4.1 QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO

15

16 Após consentimento informado, os participantes foram submetidos a entrevistas
17 clínicas, além da aplicação de um formulário para obtenção dos dados demográficos e
18 antropométricos.

19

20 3.5 DADOS ANTROPOMÉTRICOS E MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL

21

22 Foram obtidos dados como medida da circunferência abdominal durante a
23 expiração, em posição de pé e relaxada, na linha média entre as margens costais mais
24 baixas e a crista íliaca paralela ao chão, altura e peso. Foi avaliado a pressão arterial
25 sistólica e diastólica usando um esfigmomanômetro de mercúrio no braço direito e utilizou-
26 se o valor médio de duas medidas realizadas a 5 minutos de distância. Também foi calculado
27 o IMC através da divisão do peso pela altura elevada ao quadrado ($IMC=Kg/m^2$).

28

29 3.6 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS

30

31 3.6.1 Coleta de Sangue

32

33 Um técnico de laboratório de Análises Clínicas coletou amostras de 32 mL de sangue
34 venoso na prega do cotovelo, respeitando jejum de 12 horas e as coletas foram realizadas
35 no período matutino. As amostras foram depositadas em tubos a vácuo, um com gel
36 separador sem anticoagulante, centrifugados por 10 minutos a 8.568xg (g-force) em

1 centrífuga (EVLAB®, Londrina, PR, Brasil) e alíquotas de soro foram armazenadas em
2 freezer a -80°C (Kendro®, Asheville, NC, EUA) até o momento de uso.

3 Os níveis de colesterol total, HDL-c, triglicerídeos, ácido úrico, aspartato
4 aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteínas totais, albumina e
5 glicose foram determinados por um método automatizado (Dimension® RXL- Siemens
6 Healthcare Diagnostics Inc, Newark, DE, EUA). Os níveis de HDL-c foram medidos
7 diretamente, sem necessidade de pré-tratamento da amostra ou de passos de centrifugação
8 especializados. A lipoproteínas de densidade baixa (LDL-c) foi calculado pela equação de
9 Friedewald: $LDL = CT - (TG/5 + HDL)$. Os triglicerídeos séricos foram medidos utilizando
10 um procedimento enzimático empregando combinações de enzimas. Os níveis de insulina
11 plasmática foram determinados por MEIA (AXSYM, Abbott® Laboratory, Alemanha). As
12 análises de Hci foram mensuradas por metodologias automatizadas no aparelho Architect
13 i2000SR (Abbott, IL, EUA). O ácido fólico e a vitamina B12 foram mesurados por
14 quimiluminescência (valores de referência 3–17 ng/mL e 180–900 pg/mL, respectivamente).
15 Os valores CV inter-ensaio para todas as análises foram <10%.

16 Os níveis séricos de PCR de alta sensibilidade foram determinados usando um
17 ensaio turbidimétrico (ARCHITECT c8000, Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL,
18 USA). Para o cálculo dos índices de HOMA (HOMA-IR) foi utilizado o HOMA calculator®,
19 Version 2.2.3 (*Diabetes mellitus* Trials Unit of University of Oxford).

20

21 3.6.2 Avaliação dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo

22

23 3.6.2.1 Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP)

24

25 O TRAP foi avaliado por quimiluminescência (QL) em uma adaptação do método da
26 técnica descrita por Repetto *et al.* (1996). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e/ou
27 lipossolúveis presentes no soro. Este experimento foi conduzido em um leitor de microplaca
28 Victor X-3, Perkin Elmer®, (Waltham, MA, EUA) em um modo de contagem não coincidente
29 por 25 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm com controle de temperatura de
30 30°C. Resultados foram expressos em μM Trolox.

31

32 3.6.2.2 Determinação da superóxido dismutase (SOD)

33

34 A atividade da enzima SOD nos eritrócitos foi determinada usando o método do
35 pirogalol descrita por Marklund *et al.* (1974). Esta técnica baseia-se na inibição que esta
36 enzima promove na auto-oxidação do pirogalol em solução aquosa. A quantidade de SOD

1 que foi capaz de inibir 50% da oxidação do pirogalol foi definida como uma unidade de
2 atividade enzimática. A leitura da reação da SOD foi realizada em uma leitora de
3 microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) com o
4 comprimento de onda de 420 nm. Resultados foram expressos em USOD/min/gHb.

5 6 3.6.2.3 Determinação da catalase (CAT)

7
8 A análise da atividade da CAT foi através da medida do decaimento na concentração de
9 peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e da geração do oxigênio, utilizando a técnica descrita por
10 Aebi (1984). A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®,
11 modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 240 nm. Resultados foram
12 expressos em ABS/min/gHb.

13 14 3.6.2.4 Determinação do sistema glutaciona (GT, GSH e GSSG)

15
16 Utilizamos a técnica descrita por Anderson (1985) e Tietze (1969) para determinar a
17 concentração de glutaciona total (GT), glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona oxidada
18 (GSSG) nos glóbulos vermelhos através da formação de ácido tio nitrobenzóico (TNB) no
19 comprimento de onda de 412 nm, utilizando um espectrofotômetro. A reação de duas
20 moléculas de GSH (amostra) e uma molécula de ácido ditio-bis-nitrobenzóico (DTNB) resulta
21 na formação de GSSG e TNB, de coloração amarela. Na presença de glutaciona redutase
22 (GR) e NADPH, o GSSG resultante da primeira reação (ou que já estava presente na
23 amostra) é reconvertido em GSH, obtendo assim as quantidades de GT presentes na
24 amostra. A quantidade de GSSG é obtida pela fórmula: $(TG - GSH) / 2$. A reação foi lida em
25 um leitor de microplacas Perkin Elmer™, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA). Os
26 resultados foram expressos em mM / gHb.

27 28 3.6.2.5 Determinação de grupamento sulfidril (SH) totais no plasma

29
30 O grupamento SH de proteínas foi avaliado no soro utilizando o método descrito
31 previamente por Hu (1994) e adaptado para microplaca por Taylan e Resmi (2010). O
32 método de análise foi baseado na reação do ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB) com
33 o grupo sulfidril de proteínas. A leitura da reação foi feita em uma leitora de microplaca
34 marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de
35 412 nm. Os resultados foram expressos em μM .

36

1 3.6.2.6 Determinação da atividade da paraoxonase1 (PON 1)

2

3 A atividade total PON1 e dos seus genótipos (PON1Q/Q192, PON1R/R192 e
4 PON1Q/R192) foram realizadas pela metodologia descrita por Richter, Jarvink e Furlong
5 (2008). Os substratos utilizados foram fenilacetato (PA, Sigma, EUA) e 4- (clorometil)
6 fenilacetato (CMPA, Sigma, EUA), que é uma alternativa ao uso do paraoxon tóxico. As
7 atividades da PON1 foram determinadas pela taxa de hidrólise de CMPA (CMPAase, que é
8 influenciada pelo polimorfismo PON1 Q192R), bem como pela taxa de hidrólise do
9 fenilacetato (AREase, que é menos influenciada pelo polimorfismo PON1 Q192R). A leitura
10 da reação foi realizada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo
11 EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 280 nm durante 4 minutos (16
12 leituras com intervalo de 15 segundos entre as leituras) com a temperatura mantida a 25°. A
13 atividade total da PON 1 foi expressa em U/mL.

14

15 3.6.2.7 Determinação de hidroperóxidos por quimiluminescência (QL-LOOH)

16

17 A avaliação da formação de hidroperóxidos (LOOH) por quimiluminescência é
18 efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Flecha, Llesuy e Boveris (1991) e Panis
19 et al. (2012). A quimiluminescência estimulada por t-butil foi empregada para analisar os
20 níveis de hidroperóxidos presentes no soro. Este teste baseia-se no consumo das defesas
21 antioxidantes e a formação de hidroperóxidos resultando em um aumento da emissão de
22 fótons, ou seja, em um aumento de quimiluminescência que está relacionado com o estresse
23 oxidativo. Este experimento foi realizado em luminômetro Glomax (TD 20/20). Todo o
24 experimento foi realizado ao abrigo da luz para evitar a fosforescência, a 30°C, durante 60
25 minutos. Os resultados foram expressos em unidades relativas de luz (URL) e a
26 curva obtida foi utilizada como um indicador qualitativo da lipoperoxidação. Os resultados
27 quantitativos foram obtidos após a integração da área sobre a curva utilizando
28 o OriginLab 7.5 software.

29

30 3.6.2.8 Determinação quantitativa de malondialdeído (MDA)

31

32 A quantificação de MDA foi realizada conforme a técnica descrito por Bastos *et al.*
33 (2012) utilizando cromatografia líquida de alta performance (CLAE) Alliance e2695, Waters®
34 (Barueri, SP, Brasil) com uma coluna Eclipse XDB-C18 4,6mm x 250mm 5µm, Agilent®
35 (Santa Clara, CA, EUA). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 532 nm.
36 Resultados de MDA expressos em µmol de MDA/mg de proteínas.

1 3.6.2.9 Determinação de metabólitos do óxido nítrico (NOx)

2

3 A determinação da concentração de subprodutos do óxido nítrico (NO) foi realizada
4 pela técnica descrita por Navarro-Gonzalvez et al. (1998). O NO é um gás muito instável e
5 rapidamente se degrada nos subprodutos nitratos e nitritos, que podem ser detectados no
6 soro. O método de detecção baseia-se na redução de nitrato a nitrito, mediada por reações
7 de óxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre
8 dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado
9 pela adição do reagente de Griess. A quantificação de NOx foi feita em leitora de microplacas
10 Asys Expert Plus, Biochrom® (Holliston, MA, EUA), sendo as leituras feitas em 540 nm. A
11 concentração de óxido nítrico foi expressa em μM .

12

13 3.6.2.10 Determinação de produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP)

14

15 Para a quantificação de AOPP no soro utilizou-se o método descrito por Hanasand
16 et al. (2012). Esse teste é empregado para medir a oxidação proteica. A leitura da reação
17 da AOPP foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire
18 (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 340 nm. A concentração de AOPP foi
19 expressa em $\mu\text{moles/L}$ de equivalente de cloramina T.

20

21 3.7 Análise estatística

22

23 3.7.1 ARTIGO 1: A RANDOMIZED TRIAL OF SHORT-TERM TREATMENT WITH FOLIC ACID TO REDUCE 24 THE OXIDATIVE STRESS OF PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

25

26 A análise de tabelas de contingência (teste χ^2) foi empregada para avaliar as
27 associações entre as variáveis categóricas e a análise de variância (ANOVA) foi empregada
28 para avaliar as diferenças nas variáveis contínuas entre os grupos de tratamento. O teste t
29 de Student pareado foi usado para a análise intragrupo e o teste t de Student não pareado
30 para a avaliação intergrupo dos efeitos do ácido fólico sobre os biomarcadores bioquímicos
31 e de estresse oxidativo e a interação dos efeitos do tratamento e dos grupos de DRG.
32 Empregamos a análise multivariada de modelo linear geral (GLM) para verificar os efeitos
33 do tratamento com ácido fólico nos biomarcadores enquanto controlamos grupos de DRG,
34 sexo, idade, IMC, IPAQ, diabetes, hipertensão, uso de estatina, inibidores da enzima
35 conversora de angiotensina (iECA) + bloqueadores de receptores da angiotensina (BRA),
36 ácido acetilsalicílico (AAS) e tabagismo. Todos os testes foram bicaudais e um valor de $p \leq$

1 0,05 foi usado para significância estatística. Todos os resultados são apresentados como
2 média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas no IBM SPSS Windows
3 versão 25.

4

5 3.7.2 ARTIGO 2: POTENTIAL BIOMARKERS TO FOLLOW-UP THE PROGRESSION OF CHRONIC KIDNEY
6 DISEASE AND A NEW STRATEGY TO ENHANCE ANTIOXIDANT DEFENCES IN EARLY AND MODERATE
7 STAGES

8

9 A análise das tabelas de contingência (teste do χ^2) foi empregada para avaliar as
10 associações entre variáveis categóricas, enquanto a análise de variância (ANOVA) foi
11 empregada para avaliar as diferenças nas variáveis contínuas entre os grupos de
12 tratamento. A análise da Equação de Estimativa Generalizada (*Generalized estimating*
13 *equation* - GEE), medidas repetidas, foi empregada para avaliar os efeitos do ácido fólico na
14 TFGe e nos biomarcadores. As análises GEE pré-especificadas incluíram efeitos
15 categóricos do tratamento com ácido fólico, tempo e interação tempo a tratamento. A análise
16 GEE, medidas repetidas, também foi usada para examinar as alterações ao longo do tempo
17 (da linha de base ao ponto final) nos dados de TFGe e de biomarcadores. Todos os testes
18 foram bicaudais e um valor de p de $\leq 0,05$ foi utilizado para significância estatística. As
19 análises estatísticas foram realizadas usando o IBM SPSS windows versão 25. Foram
20 computadas duas pontuações compostas ponderadas por unidade z, uma refletindo primeiro
21 um índice integrativo da atividade PON1 computada como atividades z CMPAase + z
22 AREase e a segunda refletindo uma razão PROOX / ANTIOX e calculado como z Hci - z
23 (zCMPAase + zAREase).

24

25 4. RESULTADOS

26

27

28

29

CLINICAL TRIAL STUDY

A Randomized Trial of Short-term Treatment with Folic Acid to Reduce the Oxidative Stress of Patients with Chronic Kidney Disease

Andressa Keiko Matsumoto^{1,*}, Ana Paula Michelin¹, Laura de Oliveira Semeão¹, Walter Sepúlveda-Loyola², João Victor de Lima Pedrão¹, Guilherme Martins Porto¹, Beatriz Suellen Arceni³, Estefânia Gastaldello Moreira¹, Vinicius Daher Alvares Delfino⁴ and Décio Sabbatini Barbosa¹

¹Health Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil; ²Program of Masters and Doctoral degree in Rehabilitation Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil; ³Clinical and laboratory pathophysiology Graduate Program, State University of Londrina, PR, Brazil; ⁴Department of Internal Medicine, Nephrology Section, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

Abstract: Background: Increased generation of reactive oxygen and nitrogen species in chronic kidney disease (CKD) patients leads to increased oxidative stress. The antioxidant capacity of folic acid has been shown to scavenge radicals efficiently.

Objective: The current study was carried out to examine the effects of folic acid treatment on biochemical and oxidative stress biomarkers in patients in different stages of CKD.

Methods: This was a randomized, non-blinded, clinical trial that assessed the effects of 3 months of treatment with 5 mg of folic acid daily or no treatment in 113 outpatients within CKD stages 3a and 3b. At the end of the intervention, we analyzed the data of 66 patients treated with folic acid and 47 in the control group. Serum homocysteine levels and biochemical and oxidative/nitrosative stress biomarkers were analyzed in all patients.

Results: In most patients, folic acid treatment normalized homocysteine levels and increased antioxidant enzyme activity (paraoxonase 1) and decreased sulfhydryl (SH) groups. In addition, oxidative biomarkers (products of nitric oxide and lipid hydroperoxide) were significantly lower post-treatment compared to baseline in the active intervention group. In the no active intervention group, no statistically significant effects were found on the oxidative and biochemical biomarkers.

Conclusion: Folic acid treatment in stages 3a-4 CKD patients effectively ameliorated their hyperhomocysteinemia and increased the activity of antioxidant enzymes, as well as decreased the levels of pro-oxidant biomarkers in stage G3a and G3b CKD patients. Folic acid treatment attenuated oxidative/nitrosative stress and may be considered as a possible strategy to improve redox status and diminish the damages associated with oxidative/nitrosative stress in CKD patients. Further studies are needed to confirm these findings.

Clinical Trials Register No: This study is registered in the Brazilian Record of Clinical Trials (ReBEC), under reference RBR-2bftth.

ARTICLE HISTORY

Received: July 24, 2021
Revised: October 04, 2021
Accepted: November 17, 2021

DOI:
10.2174/1389200222666211210153145

Keywords: Chronic kidney disease, folic acid, antioxidant, homocysteine, anemia, scavenging free radicals.

1. INTRODUCTION

Kidney disease has a major effect on global morbidity and mortality. The prevalence of cases of all-stage chronic kidney disease (CKD) was recorded at 9.1% of the population worldwide [1]. Patients affected by kidney disease experience huge cardiovascular risk, and cardiovascular events represent the leading causes of death [2].

An adult patient is identified with chronic kidney disease (CKD) when they present, for a period equal to or greater than three months, a glomerular filtration rate (GFR) lower than 60 ml/min/1.73 m². It is suggested that the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation should be used to estimate a patient's GFR from serum creatinine [3]. Early detection and treatment by primary care clinicians are important because progressive CKD is associated with adverse clinical outcomes, including cardiovascular disease and increased mortality [4]. The kidney is a highly metabolic organ, rich in oxidation reactions in

mitochondria, which makes it vulnerable to damage caused by oxidative and nitrosative stress (IO&NS) [5].

Oxidative stress, defined as disturbance in the pro and antioxidant balance, is harmful to cells due to the excessive generation of highly reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species. When the balance is not disturbed, oxidative stress plays a role in physiological adaptations and signal transduction [6]. However, an excessive amount of ROS and RNS results in the oxidation of biological molecules, such as lipids, proteins, and DNA. IO&NS have been reported in kidney disease, due to both antioxidant depletions and increased ROS production [7]. Amplification of oxidative stress is present from the early stages of CKD, holding a key position in the pathogenesis of renal failure [8]. In addition, in patients at advanced stages of CKD, increased oxidative stress is associated with complications, such as hypertension, atherosclerosis, inflammation, anemia, and diabetes [9, 5]. Pei *et al.* [10] detected an increased level of advanced oxidation protein products (AOPP), and malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) serum levels were decreased in CKD patients. Furthermore, Kennedy *et al.* [9] suggested that paraoxonase (PON)-1 activity was lower in CKD subjects compared to non-CKD control subjects.

*Address correspondence to this author at the Hospital Universitário de Londrina, Av. Robert Koch, 60 Vila Operária CEP: 86038-350 Londrina - PR, Londrina, Brazil; Tel/Fax: 55 43 33712451; Cell: 55 43 9 96016344; E-mail: dessamatsu@hotmail.com

Homocysteine (Hcy) is a sulfhydryl-containing amino acid formed during the metabolism of methionine to cysteine [11]. High plasma Hcy levels (hyperhomocysteinemia) occur in approximately 85% of CKD patients because of impaired renal metabolism and reduced renal excretion [12]. Hyperhomocysteinemia increases oxidative stress because Hcy is susceptible to auto-oxidation, with the secondary generation of ROS (superoxide radicals [O₂⁻] and hydrogen peroxide [H₂O₂]) and lipid peroxidation. In addition, Hcy can inhibit the activity of the antioxidant enzymes, glutathione peroxidase and SOD [13].

Folic acid, the synthetic form of vitamin B9, is critical in the conversion of Hcy to methionine [12]. Vitamin deficiency, mainly folic acid and vitamin B12 (cobalamin), is considered to be a major contributor to the hyperhomocysteinemia found in patients with CKD [14]. In the remethylation process of Hcy, 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF), the active form of folic acid, is a co-substrate, and vitamin B12 acts as a coenzyme that helps to overcome the partial inhibition of methionine synthase found in uremic patients [15]. The folic acid was observed to scavenge radicals very efficiently, demonstrating antioxidant capacity and a significant inhibition property in microsomal lipid peroxidation [16].

Thus, the aim of the present study was to examine the effects of folic acid treatment on biochemical and oxidative stress biomarkers in patients in different stages (3a-4) of CKD. In addition, it was investigated whether these redox parameters are associated with GFR groups, socio-demographic and anthropometric data, level of physical activity, diabetes, hypertension, and drugs commonly used (statins, acetylsalicylic acid (ASA or aspirin), angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI), and angiotensin II receptor blockers (ARBs)) in this disease.

2. PARTICIPANTS AND METHODS

2.1. Participants

The study population consisted of 113 outpatients with CKD recruited at the Department of Internal Medicine, Nephrology Section, Clinical Hospital at the State University of Londrina (HC-UEL). To calculate the sample, a sampling error of 5% and a 95% confidence level were considered. Considering the data from the Brazilian Society of Nephrology 2014 CKD census, where for every 01 patient on dialysis there were 10 with CKD in a non-dialysis situation, an approximate number of 115 patients was estimated. CKD patients were Brazilian and over 18 years of age. The clinical diagnosis of CKD was made by senior nephrologists based on eGFR (CKD-EPI equation) values <60 mL/min/1.73m² for at least three months. From the obtained eGFR, patients were classified in the most advanced stages of CKD [3], namely G3a - mildly to moderately decreased eGFR (59-45 mL/min/1.73 m²); G3b - moderately to severely decreased eGFR (44-30 mL/min/1.73 m²), and G4 - severely decreased eGFR (29-15 mL/min/1.73 m²). Patients in the G5 stage - kidney failure (eGFR <15 mL/min/1.73 m²) were not included in the study.

2.2. Socio-demographic and Anthropometric Data

Subjects were interviewed before the blood test to collect socio-demographic data (age, sex, and ethnicity), including family CKD history, alcohol use, the presence of diabetes, hypertension, and use of specific drugs (statins, ASA, ACEI+ARBs). Systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP) were measured using a calibrated aneroid sphygmomanometer under standard conditions. The diagnosis of tobacco use disorder was made using DSM-IV-TR criteria. Waist circumference, weight, and height were measured, and body mass index (BMI) was calculated by dividing the weight (Kg) by the squared height (m).

Subjects with clinical or laboratory evidence of autoimmune, liver, or neurological disease (including Parkinson's disease, stroke, and multiple sclerosis), younger than 18 years, who did not fit within stages 3a-4, used immunomodulatory or immunosuppressive

drugs, who had cancer, or used antioxidant supplements, were excluded from both the groups.

2.3. Study Design

This was a randomized, non-blinded, clinical trial, which examined the effects of an intervention with folic acid on biochemical and oxidative stress biomarkers in pre-dialysis individuals with CKD. A statistician was responsible for assigning the patients to each group by means of computed numerical randomization. To avoid selection bias, a third person, not involved in the study, numbered the envelopes. Patients were allocated into a group treated with folic acid (active intervention group) or a group with no active intervention (control group) from September 2017 to March 2019. Treatment with oral folic acid was fixed at a dose of 5 mg daily for 3 consecutive months [17, 18]. All patients had blood tests at baseline and again 3 months later. After informed consent was given, the participants underwent clinical interviews, including the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), a validated tool to measure the level of physical activity [19, 20], and on the same day, blood samples were collected. The intervention started the following day in the morning. Treatment compliance was ascertained *via* pill counts and self-reporting.

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the State University of Londrina (UEL), Brazil (CAAE 63097216.1.0000.5231). This study is registered in the Brazilian Record of Clinical Trials (ReBEC), under reference RBR-2bftlr.

2.4. Assays

Fasting blood was sampled from all individuals between 8.00 and 9.00 a.m. Blood was immediately centrifuged, and the serum was aliquoted and stored at -80°C until thawing for assays. Erythrocytes from the tube with EDTA were used to test for antioxidant enzymes. The total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) [21]; sulfhydryl (SH) groups [22]; total plasmatic PON1 activity [23]; SOD [24] and catalase (CAT) activity in erythrocytes [25]; total glutathione (GT), glutathione reduction (GSH), and oxidation (GSSG) following the technique described by Tietze [26]; products of nitric oxide (NOx) using an adaptation of the technique described by Navarro-González *et al.* [27]; AOPP in plasma using the method described by Witko-Sarsat *et al.* [28]; lipid hydroperoxides - chemiluminescence (CL-LOOH) assay [29], and MDA [30] were assayed using previously described methods.

Analyses of serum urea, serum creatinine glucose, uric acid, albumin, total protein, aspartate transaminase (ALT), alanine transaminase (AST), total cholesterol, and triglycerides were performed on the Dimension[®], RxL apparatus (Deerfield, IL, USA). High-density lipoprotein (HDL) was measured directly with the same methods and without sample pretreatment or centrifugation steps. Low-density lipoprotein (LDL) was calculated using the Friedewald equation (total cholesterol - (triglycerides/5 + HDL cholesterol)). Insulin levels were determined by MEIA (AXSYM, Abbott[®] Laboratory, Germany). Serum levels of high-sensitivity CRP (hs-CRP) were determined using a turbidimetric assay (ARCHITECT c8000, Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). The homeostasis model of assessment in insulin resistance (HOMA-IR) was used as a surrogate measure of insulin sensitivity using HOMA-IR = insulin (mU/mL) x glucose (nmol/L/22.5) [31]. Hcy was measured by automated methodologies (Hcy levels elevated if > 12 mmol/L) on the Architect i2000SR apparatus (Abbott, IL, USA). Folic acid and vitamin B12 were measured by chemiluminescence (reference values 3-17 ng/mL and 180-900 pg/mL, respectively). The inter-assay CV values for all analyses were <10%.

2.5. Statistical Analysis

Analysis of contingency tables (χ^2 test) was employed to assess the associations between categorical variables, and analysis of vari-

ance (ANOVA) was employed to assess differences in continuous variables between the treatment groups. The paired Student's t-test was used for the intra-group analysis and the unpaired Student's t-test for the inter-group assessment of the effects of folic acid on the biochemical and oxidative stress biomarkers and interaction of effects of treatment and CKD groups. We employed multivariate general linear model (GLM) analysis to check the effects of treatment with folic acid on biomarkers while controlling for CKD groups, sex, age, BMI, IPAQ (VA/A/IA/S), diabetes, hypertension, use of statin, ACEI+ARBs, ASA, and smoking. All tests were two-tailed and a p-value of 0.05 was used for statistical significance. All results are shown as mean (SE). The statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 25.

3. RESULTS

3.1. Consort Flow Diagram

Fig. (1) shows the CONSORT flow diagram and the progress of the participants through the randomized trial. Of the 209 CKD patients initially included in the study, 73 were excluded due to different exclusion criteria, as shown in Fig. (1). As a consequence, 136 patients were randomized in the study; 82 (60.30%) allocated to the intervention arm treated with folic acid and 54 (39.70%) allocated to the control group. After allocation, 23 patients were lost to follow-up (Fig. 1). Finally, 113 patients completed the 12-week follow-up assessment, involving 66 patients treated with folic acid and 47 control patients. There were no missing data in either the treatment arm at baseline or after treatment.

3.2. Baseline Characteristics of Patients in Both Groups

Table 1 shows the baseline characteristics of CKD patients treated with and without folic acid. There were no significant dif-

ferences between treatment groups in any of the demographic data, including age, sex, and ethnicity, or baseline clinical data, including BMI, abdominal circumference (AC), use of drugs (statins, ACEI + ARBs, and ASA), diabetes, hypertension, heart rate (HR), DBP, smoking, and alcohol use. The SBP was somewhat higher ($P=0.008$) in patients treated with folic acid than in controls. There were no significant differences in IPAQ measures between patients who were treated or not with folic acid.

3.3. Effects of Treatment with Folic Acid

Table 2 shows the results of the paired and unpaired Student's t-tests. We examined the effects of treatment (study groups with or without folic acid) on biochemical markers and analyzed the basal values between the groups. Post-treatment levels of folic acid were significantly increased in the active intervention group ($P=0.001$) compared with baseline levels. The post-treatment levels of Hcy were significantly lower in patients treated with folic acid ($P=0.001$) compared with pretreatment values. When comparing the baseline values between the active intervention group and the control group, statistically significant differences were observed in glucose ($P=0.041$) and HOMA-IR levels ($P=0.012$).

Antioxidant and oxidant biomarkers are reported in Table 3. We found that the changes in folic acid from baseline to 3 months later were significantly higher in PON1 CMAase ($P=0.001$) and AREase ($P=0.001$) activities. We also found that the SH-groups ($P=0.001$) were significantly lower in the active intervention group. The post-treatment levels of NOx ($P=0.030$) and CL-LOOH ($P=0.019$) were significantly lower in patients treated with folic acid compared with baseline levels. There were no significant effects of treatment on TRAP, SOD, CAT, GT, GSH, GSSG, AOPP, and MDA levels. The basal values analyzed between groups were not significant.

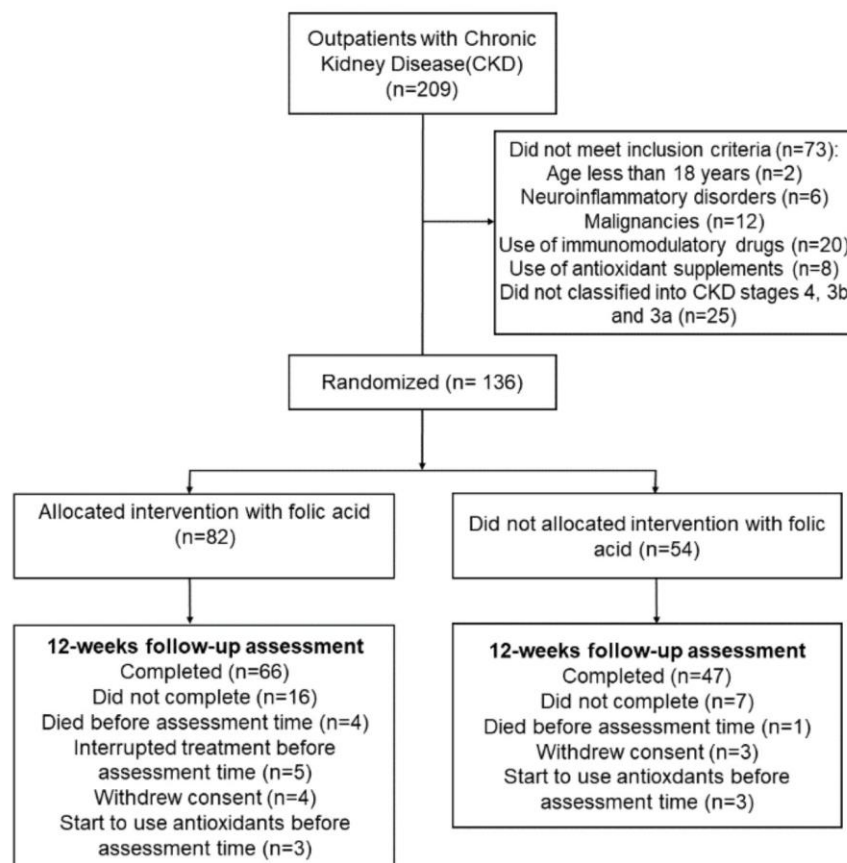


Fig. (1). Consort flow diagram.

Table 1. Baseline comparison of socio-demographic and clinical data of chronic kidney disease patients treated with folic acid and controls.

Variables	Control (n=47)	Folic Acid (n=66)	F/X ²	df	P
Age (years)	67.08 (1.77)	66.35 (1.61)	0.17	1/111	0.678
Sex (F/M)	19/28	30/36	0.28	1	0.595
Ethnicity (C/nC)	41/7	60/6	0.98	1	0.322
Family CKD history (Y/N)	14/34	19/47	0.002	1	0.965
IPAQ (VA/A/IA/S)	3/20/12/13	4/22/25/15	0.065	1	0.798
BMI (kg/m ²)*	29.3 (5.4)	29.1 (5.1)	0.03	1/110	0.870
AC (cm)	106.312 (1.78)	104.606 (1.42)	0.570	1/112	0.452
Statin use (Y/N)	10/37	9/57	1.15	1	0.284
ACEI + ARBs use (Y/N)	12/35	21/45	0.63	1	0.589
ASA use (Y/N)	29/16	35/30	1.23	1	0.268
Diabetes (Y/N)	23/24	29/37	0.77	1	0.599
HBP(Y/N)	16/29	18/47	0.77	1	0.380
SBP (mm Hg)	120.6 (16.1)	129.0 (18.6)	7.36	1/111	0.008
DBP (mm Hg)	82.8 (13.5)	83.2 (12.7)	0.03	1/111	0.867
HR (bpm)	69.458 (2.00)	71.712 (1.56)	0.810	1/112	0.370
Smoking (Y/N)	4/43	4/62	0.25	1	0.617
Alcohol (Y/N)	1/47	2/62	0.096	1	0.756

All results are shown as mean (SE). BMI: body mass index; IPAQ (VA/A/IA/S): International Physical Activity Questionnaire (very active/active/insufficient active/ sedentary); ACEI: Angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARBs: Angiotensin II Receptor Blockers; ASA: acetylsalicylic acid; HBP: high blood pressure; SBP: systolic blood pressure, DBP, diastolic blood pressure; HR: heart rate; AC: abdominal circumference. *Processed in Ln transformation.

Table 2. Effect of folic acid treatment on biochemical markers in chronic kidney disease patients.

Variables	Active Treatment	Basal	Post-treatment	P*	P†
eGFR (mL/min/1.73m ²)	No	36.297 (1.86)	36.787 (2.26)	0.882	0.640
	Yes	35.212 (1.43)	34.939 (1.69)	0.311	
Creatinine (mg/dL)*	No	1.928 (0.09)	1.931 (0.09)	0.995	0.971
	Yes	1.923 (0.07)	1.952 (0.08)	0.722	
Urea (mg/dL)*	No	63.978 (3.54)	62.553 (3.17)	0.932	0.603
	Yes	66.650 (3.51)	69.363 (3.453)	0.237	
Glucose (mg/dL)*	No	113.319 (4.62)	114.595 (5.01)	0.967	0.041
	Yes	128.809(5.48)	134.661 (5.07)	0.251	
Insuline (mU/L)*	No	12.836 (1.12)	12.443 (0.84)	0.977	0.063
	Yes	16.481 (1.40)	15.318 (1.27)	0.920	
HOMA-IR*	No	3.635 (0.40)	3.624 (0.31)	0.624	0.012
	Yes	5.408 (0.50)	7.111 (0.81)	0.256	
Folic Acid (mg/mL)	No	7.876 (0.43)	8.202 (0.48)	0.669	0.139
	Yes	8.799 (0.41)	37.228 (3.11)	0.001	
Homocysteine (mmol/L)	No	16.848 (0.80)	16.872 (0.77)	0.828	0.372
	Yes	17.873 (0.77)	15.672 (0.62)	0.001	

Table (2) contd....

Variables	Active Treatment	Basal	Post-treatment	P^*	$P^†$
Vitamin B12 (mg/mL)	No	386.680 (25.85)	352.659 (25.21)	0.184	0.171
	Yes	340.064 (21.99)	363.416 (20.64)	0.140	
Acid Uric (mg/dL)	No	6.870 (0.24)	6.853 (0.22)	0.951	0.905
	Yes	6.830 (0.21)	6.827 (0.21)	0.968	
CRP (mg/L)*	No	4.170 (0.62)	3.897 (0.68)	0.752	0.928
	Yes	4.094 (0.54)	3.532 (0.39)	0.155	
Albumin (g/dL)	No	3.776 (0.05)	3.838 (0.05)	0.270	0.123
	Yes	3.881 (0.04)	3.897 (0.04)	0.455	
Total proteins (g/dL)	No	7.352 (0.06)	7.393 (0.07)	0.642	0.779
	Yes	7.378 (0.06)	7.445 (0.07)	0.141	
AST (U/L)*	No	22.590 (1.08)	20.818 (0.86)	0.260	0.197
	Yes	20.878 (0.80)	20.663 (0.75)	0.768	
ALT (U/L)*	No	29.844 (1.72)	27.644 (1.55)	0.485	0.924
	Yes	29.666 (0.97)	27.545 (1.17)	0.134	
Total cholesterol (mg/dL)*	No	171.766 (7.70)	168.608 (5.38)	0.984	0.089
	Yes	156.757 (4.94)	157.742 (4.86)	0.597	
HDL (mg/dL)*	No	46.510 (1.65)	49.000 (1.92)	0.259	0.806
	Yes	45.907 (1.70)	46.409 (1.80)	0.836	
LDL (mg/dL)*	No	97.595 (6.19)	97.78 (4.78)	0.639	0.079
	Yes	86.030 (3.28)	81.878 (3.13)	0.600	
Triglycerides (mg/dL)*	No	145.808 (10.45)	138.311 (8.32)	0.835	0.852
	Yes	148.406 (9.13)	160.753 (12.00)	0.766	

All results are shown as mean (SE); $P < 0.05$. Analyses of repeated-measures paired Student's t-test. eGFR: estimated Glomerular Filtrate Rate; CRP: C-Reactive Protein; AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase; HDL: High Density Lipoprotein; LDL: Low Density Lipoprotein. Folic acid reference values: 3-17 ng/mL. Homocysteine levels elevated if > 12 mmol/L. *Intra-group analysis. †Inter-group analysis of basal values. *Processed in Ln transformation.

Table 3. Effect of folic acid treatment on oxidative stress biomarkers in chronic kidney disease patients.

Variables	Active Treatment	Basal	Post-treatment	P^*	$P^†$
TRAP/UA (μ mol trolox/mg/dL)	No	156.359 (3.91)	159.483 (4.31)	0.341	0.203
	Yes	149.574 (3.29)	156.640 (3.94)	0.075	
- SH (μ mol/L)	No	324.644 (8.59)	314.152 (9.00)	0.419	0.966
	Yes	325.151 (7.83)	287.356 (6.59)	0.001	
PON 1 -CMPase (U/mL)	No	28.620 (1.49)	30.346 (1.65)	0.437	0.787
	Yes	27.888 (1.31)	34.034 (1.25)	0.001	
PON 1 -AREase (U/mL)	No	180.745 (6.84)	193.822 (7.75)	0.096	0.947
	Yes	180.310 (5.72)	199.445 (6.89)	0.001	
SOD (activity/gHb/min)	No	62.974 (2.77)	68.183 (2.99)	0.224	0.218
	Yes	67.584 (2.43)	70.468 (2.68)	0.379	
CAT(abs/min/gHb)	No	54.208 (2.00)	59.439 (2.12)	0.072	0.132
	Yes	58.220 (1.86)	60.619 (2.02)	0.399	

Table (3) contd....

Variables	Active Treatment	Basal	Post-treatment	P^*	$P^†$
GT (mM/gHb)	No	7.061 (0.21)	6.664 (0.17)	0.155	0.394
	Yes	6.836 (0.16)	6.899 (0.15)	0.800	
GSH (mM/gHb)*	No	5.649 (0.15)	5.412 (0.13)	0.305	0.943
	Yes	5.634 (0.13)	5.639 (0.13)	0.973	
GSSG (mM/gHb)	No	0.678 (0.03)	0.625 (0.04)	0.201	0.113
	Yes	0.600 (0.03)	0.629 (0.03)	0.528	
NOx ($\mu\text{mol/L}$) *	No	11.045 (0.60)	9.98 (0.73)	0.166	0.893
	Yes	11.175 (0.68)	9.641 (0.61)	0.030	
AOPP ($\mu\text{mol/L}$ /eq. Cloramin T)	No	106.872 (5.88)	107.347 (6.38)	0.746	0.588
	Yes	112.288 (7.25)	113.409 (8.55)	0.143	
CL-LOOH (RUL $\times 10^6$)*	No	1.385 (0.82)	1.617 (0.11)	0.347	0.230
	Yes	1.521 (0.90)	1.286 (0.63)	0.019	
MDA ($\mu\text{M}/\text{mg pt}$)*	No	1.024 (0.04)	1.051 (0.04)	0.617	0.769
	Yes	1.045 (0.05)	1.060 (0.03)	0.203	

All results are shown as mean (SE); $P < 0.05$. Analyses of repeated-measures paired Student's t-test. TRAP/UA: Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter/Uric Acid; -SH: Sulfhydryl groups; PON1-AREase: Paraoxonase 1 - Arilesterase activity; PON1 -CAMPase: Paraoxonase 1 - 4-CMPA activity; SOD: Superoxide Dismutase activity; CAT: Catalase activity; GT: Total Glutathione; GSH: Reduced Glutathione; GSSG: Oxidated Glutathione; NOx: Nitric Oxide metabolites; AOPP: Advanced Oxidation Protein Products; LOOH: Lipid Hydroperoxides; MDA: Malondialdehyde. RLU: Relative Light Unit. *Intra-group analysis. †Inter-group analysis of basal values. *Processed in Ln transformation.

The group with no active intervention over the same period did not demonstrate any statistically significant changes in the levels of biochemical and OS biomarkers.

The inter-group analysis comparing delta (Δ) values of biochemical and OS biomarkers showed a significant statistical difference (Tables 2 and 3), with a higher increase in folic acid levels ($P=0.001$) in the treatment group compared to controls. We found a higher decrease in Hcy ($P=0.022$), -SH ($P=0.043$) and CL-LOOH ($P=0.002$) in the group treated with folic acid. No other statistically significant differences were observed in the inter-group analysis. These results are presented in Table 4.

Table 5 also presents the results of the comparisons between baseline and post-treatment levels in the study groups with folic acid, within GFR groups (G3a, G3b, and G4), analyzing the biochemical and oxidative stress biomarkers shown in Tables 2 and 3. We found an increase in folic acid levels in all GFR groups; in addition, the PON1-CMPase and PON1-AREase activity were significantly increased in group G4 ($P=0.001$ and $P=0.017$, respectively). The same Table shows that the Hcy levels decreased only in group G4 ($P=0.006$) in patients treated with folic acid, and post-treatment levels were significantly lower in SH-groups (G3b ($P=0.001$) and G4 ($P=0.001$)), NOx (G3a ($P=0.028$)), and CL-LOOH (G3b ($P=0.041$)).

We examined the associations between the changes in antioxidant and oxidant biomarkers as dependent variables using multivariate GLM analysis and the exploratory variables considering treatment with folic acid, GFR groups, socio-demographic data, BMI, IPAQ, diabetes, hypertension, use of drugs (statins, ACEI+ARBs, and ASA), and smoking. We found that the changes in SH-groups, PON1-CMPase, and folic acid levels were highly associated with treatment type ($F=16.2$, $df=4$, $P<0.001$) and diabetes ($F=2.59$, $df=4$, $P=0.041$), but not associated with the interaction between treatment and diabetes ($F=2.10$, $df=4$, $P=0.086$). We also found changes in NOx, CL-LOOH, and Hcy to be dependent on the treatment type ($F=10.25$, $df=3$, $P=0.001$), ACEI + ARBs ($F=5.69$,

$df=3$, $P=0.019$), HBP ($F=2.05$, $df=3$, $P=0.010$), interaction between treatment* ACEI + ARBs ($F=6.64$, $df=3$, $P=0.012$), treatment*HBP ($F=9.27$, $df=3$, $P<0.001$), and treatment* ACEI + ARBs*HBP ($F=9.23$, $df=3$, $P<0.001$), as reported in Table 6.

From a total number of 66 patients treated with folic acid, our data showed that 25 patients presented reduced Hcy levels, the majority of patients demonstrated increases in the antioxidant enzymes PON1-CMPase ($n=25$) and PON1-AREase ($n=50$), and 41 patients showed significantly reduced oxidant biomarkers, NOx ($n=16$) and CL-LOOH ($n=25$), in the intervention group with folic acid. These results were not observed in the control group.

4. DISCUSSION

One of the striking findings in our study was that oxidative biomarkers, NOx and CL-LOOH, were significantly lower in early stages (G3a and G3b), and the antioxidant enzymes, PON1-AREase and PON1-CMPase, were significantly higher in stage G4 post-treatment with folic acid compared with baseline levels. In addition, comparisons of delta (Δ) values between intervention and control groups showed significant differences in CL-LOOH levels. In the study conducted by Karamouzian *et al.* [32], the authors determined the balance between oxidant and antioxidant status across the whole range of renal function in pre-dialysis CKD patients, and showed that oxidative stress in humans increased progressively from early to late stages of CKD, correlated with eGFR. A recent study involving advanced CKD patients showed that folic acid treatment may delay the initiation of hemodialysis [33]. Another study analyzed the effects of 6 months of 10 mg of folic acid given three times weekly after each dialysis session. The treatment normalized plasma Hcy levels and increased plasma antioxidant capacity, thereby attenuating oxidative stress [14].

In addition, Joshi *et al.* [16] demonstrated folic acid to be an effective free radical scavenger. *In vivo*, folic acid can protect bioconstituents from free radical damage. Despite being a water-soluble molecule, the distribution of folic acid is expected to be

Table 4. Inter-group analysis to compare delta (Δ).

Variables	Control	Folic Acid	P
Folic Acid (mg/mL)	-0.257 (3.03)	-28.429 (2.53)	0.001
Homocysteine (mmol/L)	-0.141 (0.77)	2.201 (0.64)	0.022
- SH ($\mu\text{mol/L}$)	10.492 (10.68)	39.315 (9.15)	0.043
PON 1 -CMPAse (U/mL)	-1.727 (2.02)	-6.146 (1.72)	0.099
PON 1 -AREase (U/mL)	-15.589 (7.33)	-19.184 (7.33)	0.709
NOx ($\mu\text{mol/L}$)	0.778 (0.96)	1.452 (0.81)	0.594
CL-LOOH (RUL x 10^6)	-0.179 (0.12)	0.331 (0.10)	0.002

All results are shown as mean (SE); $P < 0.05$. Analyses of Student's t-test. -SH: Sulfhydryl groups; PON1-AREase: Paraoxonase 1 - Arilesterase activity; PON1 -CMPAse: Paraoxonase 1 - 4-CMPA activity; NOx: Nitric Oxide metabolites; LOOH: Lipid Hydroperoxides; MDA: Malondialdehyde. RLU: Relative Light Unit.

Table 5. Comparison between baseline levels and post-treatment, study groups treated with folic acid, in CKD groups on the integrated index of variables reported in Table 2 and 3.

Variables	CKD Groups	Pre-treatment	Post-treatment	P
Folic Acid (mg/mL)	G3a	9.438 (0.81)	31.232 (5.72)	0.002
	G3b	8.099 (0.68)	42.057 (4.83)	0.001
	G4	9.000 (0.69)	36.620 (5.42)	0.001
Homocysteine (mmol/L)	G3a	15.681 (1.05)	14.203 (1.34)	0.110
	G3b	18.235 (1.39)	15.904 (0.76)	0.101
	G4	18.789 (1.25)	16.395 (1.16)	0.006
- SH ($\mu\text{mol/L}$)	G3a	329.825 (21.47)	297.760 (11.78)	0.185
	G3b	326.448 (11.01)	288.019 (11.78)	0.001
	G4	322.181 (11.45)	278.47 (9.15)	0.001
PON 1 -CMPAse (U/mL)	G3a	29.297 (2.26)	31.743 (2.52)	0.368
	G3b	28.839 (2.57)	34.524 (2.33)	0.084
	G4	26.859 (2.01)	35.815 (1.82)	0.001
PON 1 -AREase (U/mL)	G3a	201.287 (12.78)	213.132 (15.65)	0.346
	G3b	168.697 (8.28)	198.085 (12.03)	0.020
	G4	177.205 (9.15)	191.937 (9.59)	0.017
NOx ($\mu\text{mol/L}$)*	G3a	14.103 (1.78)	9.739 (0.77)	0.028
	G3b	8.371 (0.75)	8.140 (0.88)	0.840
	G4	11.569 (0.94)	10.862 (1.195)	0.532
CL-LOOH (RUL x 10^6)*	G3a	1.584 (0.16)	1.233 (0.15)	0.112
	G3b	1.637 (0.13)	1.305 (0.12)	0.041
	G4	1.500 (0.17)	1.288 (0.07)	0.226

All results are shown as mean (SE); $P < 0.05$. Analyses of repeated-measures paired Student's t-test. Number of patients per stage of chronic kidney disease (CKD) in groups treated with folic acid: G3a: 16; G3b: 25; G4: 25. -SH: Sulfhydryl groups; PON1-AREase: Paraoxonase 1 - Arilesterase activity; PON1 -CMPAse: Paraoxonase 1 - 4-CMPA activity; NOx: Nitric Oxide metabolites; LOOH: Lipid Hydroperoxides; MDA: Malondialdehyde. RLU: Relative Light Unit. *Processed in Ln transformation.

Table 6. Results of multivariate GLM analysis on the data of antioxidant and oxidant biomarkers as a dependent variable and the final exploratory variables considering folic acid treatment, GFR groups, sex, age, BMI, IPAQ (VA/A/IA/S), diabetes, hypertension, use of statin, ACEi + ARBs, ASA and smoking.

Analyses	Dependent Variable	Exploratory Variable	F	d.f.	P	Partial Eta Squared
Univariate	- SH	Treatment	4.14	1/114	0.044	0.036
	PON1-CMPase	Diabetes	4.28	1/114	0.040	0.037
		HBP	4.72	1/114	0.031	0.041
	Folic Acid	Treatment	52.16	1/114	0.001	0.319
		Sex	5.28	1/114	0.023	0.045
		ASA	6.37	1/114	0.013	0.056
	NOx	Hypertension	4.21	1/114	0.042	0.039
	CL-LOOH	Treatment	10.86	1/114	0.001	0.097
		IPAQ (VA/A/IA/S)	3.32	1/114	0.022	0.091
	Homocysteine	Treatment	5.18	1/114	0.024	0.045
		ACEi + ARBs	6.59	1/114	0.012	0.058
	Multivariate	<i>Antioxidative biomarkers</i>				
- SH		Treatment	16.2	4	<0.001	0.389
PON1-CMPase		Diabetes	2.59	4	0.041	0.092
PON1-AREase		Treatment*Diabetes	2.10	4	0.086	0.076
Folic Acid						
<i>Oxidative biomarkers</i>						
NOx		Treatment	10.25	3	0.001	0.321
CL-LOOH		ACEi + ARBs	5.69	3	0.019	0.059
Homocysteine		HBP	2.05	3	0.010	0.087
		Treatment* ACEi + ARBs	6.64	3	0.012	0.069
		Treatment*HBP	9.27	3	<0.001	0.299
		Treatment* ACEi + ARBs*HBP	9.23	3	<0.001	0.235

Statistical difference $p < 0.05$. - SH: Sulfhydryl groups; PON1 -CMPase: Paraoxonase 1 - 4-CMPA activity; Paraoxonase 1 - Arilesterase activity; NOx: Nitric Oxide metabolites; LOOH: Lipid Hydroperoxides; BMI: body mass index; IPAQ (VA/A/IA/S): International Physical Activity Questionnaire (very active/active/insufficient active/ sedentary); ACEi: Angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARBs: Angiotensin II Receptor Blockers; ASA: acetylsalicylic acid; HBP: high blood pressure.

much lower in the lipid phase, and the majority of it remains in the aqueous phase; folic acid can also inhibit lipid peroxidation.

The scavenging and repair of thiyl radicals (RS^{\bullet}) by folic acid make it a potential vitamin to be called an antioxidant. Thiols are present in living systems, which in addition to participating in cellular redox processes, also take part in scavenging free radicals. In both the reactions, RS^{\bullet} are generated in the living systems. Folic acid shows effective free radical scavenging activity by scavenging and repairing RS^{\bullet} ; these radicals can be considered as reactive oxidants as they are able to initiate lipid peroxidation [16].

Furthermore, our study showed that folic acid treatment reduced -SH levels in G3a and G3b post-treatment in the active intervention group, and there was a significant difference in the inter-group analysis. Systemic free thiol groups (-SH, sulfhydryl groups) are thought to play a protective role against oxidative stress through ROS scavenging. Since free thiols are readily oxidized by ROS, systemic oxidative stress can be easily measured as the depletion of serum-free thiols [24]. It is known that higher Hcy concentrations are found in patients with CKD, and Hcy is a sulfhydryl containing amino acid mainly formed from the essential amino acid methionine. In situations of hyperhomocysteinemia, Hcy generates

potent ROS free radicals through auto-oxidation of its highly active sulfhydryl group [33], causing excess free radicals and increasing oxidative stress in subjects with renal disease [25]. Our results suggest that folic acid treatment reduced Hcy serum levels in the intra-group and inter-group analyses, consequently reducing SH-groups in CKD patients. In addition, we found that SBP levels were higher in the active intervention group compared with the no intervention group; this may be due to the fact that SBP was determined at a single point in the study.

In the current study, the inter-group analysis of basal values between the active intervention group and control group demonstrated statistically significant differences in glucose levels and HOMA-IR, which may be associated with diabetic therapy in the recruited patients with CKD.

Folate is the cosubstrate in the remethylation of homocysteine metabolism; thus, it was not surprising to observe a significant effect of the folic acid intervention in reducing plasma Hcy concentrations (Fig. 2). Moreover, our results are in agreement with those reported earlier [14, 17, 36]. Therefore, folic acid supplementation has been suggested in the treatment of hyperhomocysteinemia in patients with CKD [35]. Racek *et al.* [37] demonstrated that folic

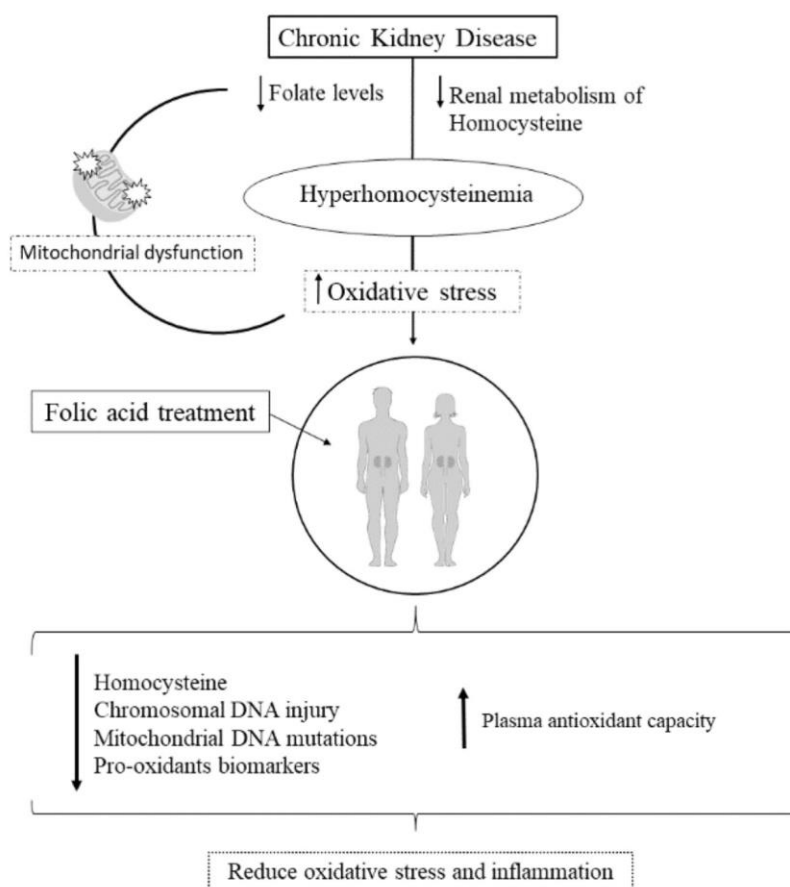


Fig. (2). The action of folic acid in CKD patients.

acid supplementation in patients with hyperhomocysteinemia induced partial prevention of plasmatic lipid peroxidation and increased oxidative stress. Additionally, evidence suggests that intestinal folic acid transport can be impaired in CKD [38].

Folate plays a critical role in the purine and pyrimidine biosynthesis (precursors of nucleic acids), in the metabolism of several amino acids (including homocysteine), and in the initiation of protein synthesis in mitochondria [38]. Folate deficiency leads to both chromosomal DNA injury and mitochondrial DNA mutations, which have been collectively associated with mitochondrial dysfunction, membrane depolarization, increased ROS production, and premature cell death, as shown in Fig. (2) [39]. It is well established that CKD is associated with up-regulation of ROS-generating machinery, and increased generation of ROS, oxidative stress, and inflammation [38]. Therefore, a potential decrease in cellular uptake of folate in tissues, such as the liver, heart, and brain, and a potential decrease in folate uptake by the mitochondria may contribute to the prevailing oxidative stress in CKD. It has been shown that mitochondrial folate deprivation can induce oxidative stress by promoting cytochrome C oxygenase dysfunction, membrane depolarization, and super-oxide overproduction [39].

In this context, folate serves as an antioxidant at the mitochondria level and helps to ameliorate the mitochondrial oxidative decay elicited by pro-oxidants [33, 34]. Given the important role of the liver in the storage and metabolism of folate, a potential defect in mitochondrial folate transport in this organ may lead to mitochondrial dysfunction, heightened ROS production, and oxidative stress in CKD.

However, we measured serum folic acid levels during basal phases and post-treatment, and were able to demonstrate large in-

creases in folic acid levels post-treatment in the active treatment group and a significant difference when compared with the control group.

In the multivariate analysis, 39% of the variability in antioxidant biomarkers across exploratory variables in Table 1 was determined by the treatment and 9% by diabetes prevalence. The interaction between treatment and diabetes explains 8% of the changes in antioxidant biomarkers. Previous studies have shown that the level of PON1 as an antioxidant enzyme is reduced in diabetes mellitus and patients with diabetic nephropathy [40, 41, 42]. Reductions in the activity and level of the PON1 protein in people with diabetes may be attributed to different mechanisms. Reductions in the main HDL apolipoprotein reported in patients with diabetes can affect the separation of PON1 from HDL and its subsequent instability. The potential increase in oxidized lipids caused by an increase in oxidative stress can contribute to PON1 inactivation in people with diabetes [43].

However, our study showed that PON1 levels, a glycoprotein associated with HDL to protect against lipoprotein oxidation, are associated with HBP presence in patients with CKD. Hypertension is one of the most important risk factors for cardiovascular diseases and renal failure. The most obvious underlying cause of essential hypertension was reported to be increased oxidative stress [44]. Due to its ability to prevent the formation of oxidized LDL, it was thought that PON1, an HDL-associated hydrolytic antioxidant enzyme, could contribute to the development of hypertension. This hypothesis was supported by the finding that the increase in oxidized LDL level was correlated with hypertension as a result of the increase in oxidative stress [45]. Low serum activity of PON1 is linked to an increased risk of coronary heart disease, myocardial

infarction, and carotid atherosclerosis, as reported by other authors [46, 47].

In addition, we found folic acid levels to be associated with treatment, sex, and ASA use. These findings are in accord with those of Lussier-Cacan *et al.* [48], who reported that women presented significantly higher folate concentrations and lower Hey levels than men. We also noticed that the effect of ASA, a drug commonly used in CKD patients, is associated with changes in folic acid levels. Aspirin is an efficient •OH radical scavenger, which is faster than several well-established antioxidants, such as ascorbate, glutathione, and cysteine [49]. The ASA interferes with the metabolism of folic acid, and a recent study found that antioxidants could inhibit or delay folic acid decomposition to varying degrees [50].

In our study, 32% of the variability in oxidative biomarkers across the exploratory variables reported in Table 1 was determined by the treatment, 6% by ACEI + ARBs, and 9% by hypertension. Therefore, the variability in the oxidative stress biomarkers is highly dependent on the type of treatment that subjects receive. This is an important clinical finding that supports the biological effect of a folic acid treatment protocol on oxidative stress in patients with CKD. The interaction between the treatment and ACEI+ARBs explains 7% of the changes in OS biomarkers, 30% by treatment with HBP, and 23% by interaction among treatment, ACEI+ARBs and HBP. Previous studies show a significant role of oxidative stress in the development of renal injury in hypertension and diabetic nephropathy [51, 52, 53]. NOx produced in the vasculature by the constitutive endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is an important vasodilator playing a role in the control of vascular tone, blood pressure, and regional blood flow [54]. Reduced bioavailability of eNOS results in endothelial dysfunction and has been implicated in the pathogenesis of renal hypertension and the progression of kidney disease in humans [55]. Factors that might contribute to a reduction in NO generation include eNOS uncoupling, eNOS inactivation, oxidative stress, and increased levels of endogenous eNOS inhibitors, such as asymmetric dimethyl-arginine [56].

In addition, we found both folic acid treatment and the level of physical activity measured by IPAQ to be associated with CL-LOOH changes. This finding highlights that some oxidative stress biomarkers are also reactive to physical activity levels and exercise. In the study reported by Pechter *et al.* [57], an exercise intervention in CKD patients led to a decrease in blood pressure and oxidative stress, indicated by a decrease in products of lipid peroxidation and an increase in reduced glutathione. In the present study, we only measured the effects of folic acid, however, future studies could investigate the effects of folic acid and exercise on OS biomarkers.

It is well known that the combination of an ACEI or ARB and pentoxifylline have protective effects in reducing proteinuria by ameliorating the decline in the eGFR in patients with stages 3-5 CKD [58, 59]. Kaseda *et al.* [60] support the hypothesis that ACEIs and ARBs have antioxidant activity in humans with preexisting oxidative stress, including patients with CKD. Furthermore, the long-term use of ACEIs may also possibly attenuate the adverse effect of elevated Hey concentrations and the beneficial effect of Hey lowering on blood pressure reduction [61].

The limitations of the study are that it is a non-blinded study, a non-placebo study, and the number of participants in stage 3a CKD is small. Also, CKD outpatients with diabetes have not been paired between control and active intervention groups, and only a single measurement of blood pressure has been carried out. These limitations may have impacted or influenced the results of our research, so they must be considered when interpreting the data.

CONCLUSION

In conclusion, the folic acid treatment protocol employed for non-dialysis patients normalized their plasma Hey levels and in-

creased their antioxidant enzyme activity in phases G3b and G4 and decreased levels of pro-oxidative biomarkers in early stage CKD patients. This treatment offers a new approach for treating hyperhomocysteinemia and may be an important strategy to ameliorate patient oxidative/nitrosative stress and the damages associated with this phenomenon.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Approval for the study was obtained from the Human Research Ethics Committee of the State University of Londrina (UEL), Brazil (CAAE 63097216.1.0000.5231). This study is registered in the Brazilian Record of Clinical Trials (ReBEC), under entry RBR2bfth.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals were used in this study. All the human procedures were followed in accordance with the ethical standards of the committee responsible for human experimentation (institutional and national), and with the Helsinki Declaration.

CONSENT FOR PUBLICATION

Informed consent was obtained from all participants for publication of the data.

STANDARD OF REPORTING

This study followed the CONSORT guidelines.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Postgraduate Laboratory of the University Hospital of Londrina for the support provided.

REFERENCES

- [1] Bikbov, B.; Purcell, C.A.; Levey, A.S.; Smith, M.; Abdoli, A.; Abebe, M. GBD chronic kidney disease collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: A systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet*, **2020**, *395*(10225), 709-733. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30045-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30045-3) PMID: 32061315
- [2] Capelli, I.; Cianciolo, G.; Gasperoni, L.; Zappulo, F.; Tondolo, F.; Cappuccilli, M.; La Manna, G. Folic acid and vitamin B12 administration in CKD, why not? *Nutrients*, **2019**, *11*(2), 383. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11020383> PMID: 30781775
- [3] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.*, **2013**, *3*(1), 1-150.
- [4] Matsushita, K.; Coresh, J.; Sang, Y.; Chalmers, J.; Fox, C.; Guallar, E.; Jafar, T.; Jassal, S.K.; Landman, G.W.; Muntner, P.; Roderick, P.; Sairenchi, T.; Schöttker, B.; Shankar, A.; Shlipak, M.; Tonelli, M.; Townsend, J.; van Zuilen, A.; Yamagishi, K.; Yamashita, K.; Gansevoort, R.; Sarnak, M.; Warnock, D.G.; Woodward, M.; Ärnlöv, J. Estimated glomerular filtration rate and albuminuria for prediction of cardiovascular outcomes: a collaborative meta-analysis of individual participant data. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, **2015**, *3*(7), 514-525. [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00040-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00040-6) PMID: 26028594
- [5] Daenen, K.; Adries, A.; Mekahli, D.; Schepdael, A.V.; Jouret, F.; Bammens, B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.*, **2019**, *34*(6), 975-991. <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-018-4005-4> PMID: 30105414

- [6] Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.*, **2012**, *5*(1), 9-19.
<http://dx.doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613> PMID: 23268465
- [7] Locatelli, F.; Canaud, B.; Eckardt, K.U.; Stenvinkel, P.; Wanner, C.; Zoccali, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: An emerging threat to patient outcome. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **2003**, *18*(7), 1272-1280.
<http://dx.doi.org/10.1093/ndt/fgf074> PMID: 12808161
- [8] Duni, A.; Liakopoulos, V.; Roumeliotis, S.; Peschos, D.; Dounousi, E. Oxidative stress in the pathogenesis and evolution of chronic kidney disease: Untangling Ariadne's thread. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, *20*(15), 3711.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms20153711> PMID: 31362427
- [9] Kennedy, D.J.; Tang, W.H.W.; Fan, Y.; Wu, Y.; Mann, S.; Pepoy, M.; Hazen, S.L. Diminished antioxidant activity of high-density lipoprotein-associated proteins in chronic kidney disease. *J. Am. Heart Assoc.*, **2013**, *2*(2), e000104.
<http://dx.doi.org/10.1161/JAHA.113.000104> PMID: 23557751
- [10] Pei, Y.; Xu, Y.; Ruan, J.; Rong, L.; Jiang, M.; Mo, Y.; Jiang, X. Plasma oxidative stress level of IgA nephropathy in children and the effect of early intervention with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, **2016**, *17*(2), 1470320316647240.
<http://dx.doi.org/10.1177/1470320316647240> PMID: 27198042
- [11] Hwang, S.Y.; Siow, Y.L.; Au-Yeung, K.K.W.; House, J.; O, K. Folic acid supplementation inhibits NADPH oxidase-mediated superoxide anion production in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **2011**, *300*(1), F189-F198.
<http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00272.2010> PMID: 20980407
- [12] Cianciolo, G.; De Pascalis, A.; Di Lullo, L.; Ronco, C.; Zannini, C.; La Manna, G. Folic acid and homocysteine in chronic kidney disease and cardiovascular disease progression: Which comes first? *Cardiovascular Med.*, **2017**, *7*(4), 255-266.
<http://dx.doi.org/10.1159/000471813> PMID: 29118764
- [13] Massy, Z.A.; Ceballos, I.; Chadefaux-Vekemans, B.; Nguyen-Khoa, T.; Descamps-Latscha, B.; Drüeke, T.B.; Jungers, P. Homocyst(e)ine, oxidative stress, and endothelium function in uremic patients. *Kidney Int. Suppl.*, **2001**, *78*(78), S243-S245.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.59780243.x> PMID: 11169019
- [14] Alvares Delfino, V.D.; de Andrade Vianna, A.C.; Mocelin, A.J.; Barbosa, D.S.; Mise, R.A.; Matsuo, T. Folic acid therapy reduces plasma homocysteine levels and improves plasma antioxidant capacity in hemodialysis patients. *Nutrition*, **2007**, *23*(3), 242-247.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2007.01.002> PMID: 17321110
- [15] Hoffer, L.J. Testing the homocysteine hypothesis in end-stage renal disease: Problems and a possible solution. *Kidney Int.*, **2006**, *69*(9), 1507-1510.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5000279> PMID: 16572120
- [16] Joshi, R.; Adhikari, S.; Patro, B.S.; Chattopadhyay, S.; Mukherjee, T. Free radical scavenging behavior of folic acid: Evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.*, **2001**, *30*(12), 1390-1399.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00543-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00543-3) PMID: 11390184
- [17] House, A.A.; Eliasziw, M.; Cattran, D.C.; Churchill, D.N.; Oliver, M.J.; Fine, A.; Dresser, G.K.; Spence, J.D. Effect of B-vitamin therapy on progression of diabetic nephropathy: A randomized controlled trial. *JAMA*, **2010**, *303*(16), 1603-1609.
<http://dx.doi.org/10.1001/jama.2010.490> PMID: 20424250
- [18] Nanayakkara, P.W.B.; van Guldener, C.; ter Wee, P.M.; Scheffer, P.G.; van Ittersum, F.J.; Twisk, J.W.; Teerlink, T.; van Dorp, W.; Stehouwer, C.D.A. Effect of a treatment strategy consisting of pravastatin, vitamin E, and homocysteine lowering on carotid intima-media thickness, endothelial function, and renal function in patients with mild to moderate chronic kidney disease: Results from the anti-oxidant therapy in chronic renal insufficiency (ATIC) study. *Arch. Intern. Med.*, **2007**, *167*(12), 1262-1270.
<http://dx.doi.org/10.1001/archinte.167.12.1262> PMID: 17592099
- [19] Benedetti, T.R.B.; Antunes, P.C.; Rodriguez-Añez, C.R.; Mazo, G.Z.; Petroski, E.L. Reproducibility and validity of the international physical activity questionnaire (IPAQ) in elderly men. *Rev. Bras. Med. Esporte*, **2007**, *13*(1), 86922007000100004.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922007000100004>
- [20] Garcia, L.M.T.; Osti, R.F.I.; Ribeiro, E.H.C.; Florindo, A.A. Validação de dois questionários para a avaliação da atividade física em adultos. *Rev Bras Ativ Fis e Saude.*, **2013**, *18*(3), 317-318.
<http://dx.doi.org/10.12820/rbafs.v.18n3p317>
- [21] Repetto, M.; Reides, C.; Gomez Carretero, M.L.; Costa, M.; Griemberg, G.; Llesuy, S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin. Chim. Acta*, **1996**, *255*(2), 107-117.
[http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981\(96\)06394-2](http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981(96)06394-2) PMID: 8937754
- [22] Hu, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Meth. Enzymol.*, **1994**, *233*, 380-385.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33044-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33044-1) PMID: 8015473
- [23] Richter, R.J.; Jarvik, G.P.; Furlong, C.E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **2008**, *1*(2), 147-152.
<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.811638> PMID: 20031556
- [24] Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **1974**, *47*(3), 469-474.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x> PMID: 4215654
- [25] Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.*, **1984**, *105*, 121-126.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3) PMID: 6727660
- [26] Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, **1969**, *27*(3), 502-522.
[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5) PMID: 4388022
- [27] Navarro-González, J.A.; García-Benayas, C.; Arenas, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.*, **1998**, *44*(3), 679-681.
<http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/44.3.679> PMID: 9510886
- [28] Witko-Sarsat, V.; Friedlander, M.; Capeillère-Blandin, C.; Nguyen-Khoa, T.; Nguyen, A.T.; Zingraff, J.; Jungers, P.; Descamps-Latscha, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.*, **1996**, *49*(5), 1304-1313.
<http://dx.doi.org/10.1038/ki.1996.186> PMID: 8731095
- [29] Gonzalez Flecha, B.; Llesuy, S.; Boveris, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic. Biol. Med.*, **1991**, *10*(2), 93-100.
[http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-K](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-K) PMID: 1849867
- [30] Bastos, A.S.; Loureiro, A.P.; de Oliveira, T.F.; Corbi, S.C.; Caminaga, R.M.; Júnior, C.R.; Orrico, S.R. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Anal. Biochem.*, **2012**, *423*(1), 141-146.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.01.016> PMID: 22330745
- [31] Haffner, S.M. Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. *Am. J. Cardiol.*, **2003**, *92*(4A), 18J-26J.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149\(03\)00062-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149(03)00062-X) PMID: 12957323
- [32] Karamouzis, I.; Sarafidis, P.A.; Karamouzis, M.; Iliadis, S.; Haidich, A.B.; Sioulis, A.; Triantos, A.; Vavatsi-Christaki, N.; Grekas, D.M. Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.*, **2008**, *28*(3), 397-404.
<http://dx.doi.org/10.1159/000112413> PMID: 18063858
- [33] Wu, X.; Zhang, L.; Miao, Y.; Yang, J.; Wang, X.; Wang, C.C.; Feng, J.; Wang, L. Homocysteine causes vascular endothelial dysfunction by disrupting endoplasmic reticulum redox homeostasis. *Redox Biol.*, **2019**, *20*, 46-59.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2018.09.021> PMID: 30292945
- [34] Bourgonje, A.R.; Abdulle, A.E.; Al-Rawas, A.M.; Al-Maqbali, M.; Al-Saleh, M.; Enriquez, M.B.; Al-Siyabi, S.; Al-Hashmi, K.; Al-Lawati, I.; Bulthuis, M.L.C.; Mulder, D.J.; Gordijn, S.J.; van Goor, H.; Saleh, J. Systemic oxidative stress is increased in postmenopausal women and independently associates with homocysteine levels. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*(1), 314.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms21010314> PMID: 31906485
- [35] Chen, C.H.; Yang, W.C.; Hsiao, Y.H.; Huang, S.C.; Huang, Y.C. High homocysteine, low vitamin B-6, and increased oxidative stress are independently associated with the risk of chronic kidney disease. *Nutrition*, **2016**, *32*(2), 236-241.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2015.08.016> PMID: 26526964
- [36] Shevchuk, S.V.; Kateryna, P.P.; Iryna, A.I.; Halyna, V.B.; Bezsmerlyni, Y.O.; Kurylenko, I.V.; Biloshytska, A.V.; Baranova, I.V. The relationship between homocysteine level and vitamins B12, B9 and B6

- status in patients with chronic kidney disease. *Wiadomości Lekarskie*, **2019**, 72(4), 532-538. PMID: 31055527
- [37] Racek, J.; Rusnáková, H.; Trefil, L.; Siala, K.K. The influence of folate and antioxidants on homocysteine levels and oxidative stress in patients with hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia. *Physiol. Res.*, **2005**, 54(1), 87-95. PMID: 15717846
- [38] Bukhari, F.J.; Moradi, H.; Gollapudi, P.; Ju Kim, H.; Vaziri, N.D.; Said, H.M. Effect of chronic kidney disease on the expression of thiamin and folic acid transporters. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **2011**, 26(7), 2137-2144. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfq675> PMID: 21149507
- [39] Chang, C.M.; Yu, C.C.; Lu, H.T.; Chou, Y.F.; Huang, R.F. Folate deprivation promotes mitochondrial oxidative decay: DNA large deletions, cytochrome c oxidase dysfunction, membrane depolarization and superoxide overproduction in rat liver. *Br. J. Nutr.*, **2007**, 97(5), 855-863. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114507666410> PMID: 17381984
- [40] Mackness, B.; Durrington, P.N.; Abuashia, B.; Boulton, A.J.M.; Mackness, M.I. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin. Sci. (Lond.)*, **2000**, 98(3), 355-363. <http://dx.doi.org/10.1042/CS19990239> PMID: 10677395
- [41] Farbstein, D.; Levy, A.P. The genetics of vascular complications in diabetes mellitus. *Cardiol. Clin.*, **2010**, 28(3), 477-496. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccl.2010.04.005> PMID: 20621252
- [42] Ayan, D.; Şeneş, M.; Çaycı, A.B.; Söylemez, S.; Eren, N.; Altuntaş, Y.; Öztürk, F.Y. Evaluation of paraoxonase, arylesterase, and homocysteine thiolactonase activities in patients with diabetes and incipient diabetes nephropathy. *J. Med. Biochem.*, **2019**, 38(4), 481-488. <http://dx.doi.org/10.2478/jomb-2019-0014> PMID: 31496913
- [43] Rosenblat, M.; Karry, R.; Aviram, M. Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: relevance to diabetes. *Atherosclerosis*, **2006**, 187(1), 74-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.026> PMID: 16229851
- [44] Oparil, S.; Zaman, M.A.; Calhoun, D.A. Pathogenesis of hypertension. *Ann. Intern. Med.*, **2003**, 139(9), 761-776. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-139-9-200311040-00011> PMID: 14597461
- [45] Assadpoor-Pirani, M.; Pordal, A.H.; Beyranvand, M.R. Measurement of oxidized low-density lipoprotein and superoxide dismutase activity in patients with hypertension. *Arch. Iran Med.*, **2009**, 12(2), 116-120. PMID: 19249879
- [46] Popa, C.; Popescu, C.; Pilat, L.; Puschita, M. The correlation of human paraoxonase 1 (PON 1) serum levels with the cardiovascular risk for a group of hypertensive patients with associated chronic diseases. *ScienceMED.*, **2014**, 5(1), 35-40.
- [47] Cosan, D.T.; Colak, E.; Saydam, F.; Yazıcı, H.U.; Degirmenci, I.; Birdane, A.; Colak, E.; Gunes, H.V. Association of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and concentration with essential hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.*, **2016**, 38(7), 1174255. <http://dx.doi.org/10.3109/10641963.2016.1174255>
- [48] Lussier-Cacan, S.; Xhignesse, M.; Piolot, A.; Selhub, J.; Davignon, J.; Genest, J.Jr. Plasma total homocysteine in healthy subjects: Sex-specific relation with biological traits. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1996**, 64(4), 587-593. <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/64.4.587> PMID: 8839504
- [49] Shi, X.; Ding, M.; Dong, Z.; Chen, F.; Ye, J.; Wang, S.; Leonard, S.S.; Castranova, V.; Vallyathan, V. Antioxidant properties of aspirin: Characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production. *Mol. Cell. Biochem.*, **1999**, 199(1-2), 93-102. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006934612368> PMID: 10544957
- [50] Wusigale, H.L.; Hu, L.; Cheng, H.; Gao, Y.; Liang, L. Mechanism for inhibition of folic acid photodecomposition by various antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, **2020**, 68(1), 340-350. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06263> PMID: 31874034
- [51] Nistala, R.; Whaley-Connell, A.; Sowers, J.R. Redox control of renal function and hypertension. *Antioxid. Redox Signal.*, **2008**, 10(12), 2047-2089. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2008.2034> PMID: 18821850
- [52] Kashiwara, N.; Haruna, Y.; Kondeti, V.K.; Kanwar, Y.S. Oxidative stress in diabetic nephropathy. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, 17(34), 4256-4269. <http://dx.doi.org/10.2174/092986710793348581> PMID: 20939814
- [53] Whaley-Connell, A.; Sowers, J.R. Oxidative stress in the cardiorenal metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.*, **2012**, 14(4), 360-365. <http://dx.doi.org/10.1007/s11906-012-0279-2> PMID: 22581415
- [54] Luo, S.; Lei, H.; Qin, H.; Xia, Y. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Curr. Pharm. Des.*, **2014**, 20(22), 3548-3553. <http://dx.doi.org/10.2174/13816128113196660746> PMID: 24180388
- [55] Amador-Martínez, I.; Pérez-Villalva, R.; Uribe, N.; Cortés-González, C.; Bobadilla, N.A.; Barrera-Chimal, J. Reduced endothelial nitric oxide synthase activation contributes to cardiovascular injury during chronic kidney disease progression. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **2019**, 317(2), F275-F285. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00020.2019> PMID: 31116605
- [56] Martens, C.R.; Edwards, D.G. Peripheral vascular dysfunction in chronic kidney disease. *Cardiol. Res. Pract.*, **2011**, 2011, 267257. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/267257> PMID: 21637718
- [57] Pechter, U.; Ots, M.; Mesikepp, S.; Zilmer, K.; Kullisaar, T.; Vi-halemm, T.; Zilmer, M.; Maaros, J. Beneficial effects of water-based exercise in patients with chronic kidney disease. *Int. J. Rehabil. Res.*, **2003**, 26(2), 153-156. <http://dx.doi.org/10.1097/00004356-200306000-00013> PMID: 12799612
- [58] Carson, C.; Al-Makki, A.; Shepler, B. Can Pentoxifylline be used as adjunct therapy to ACE inhibitors and ARBs in preserving kidney function? *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2016**, 19(1), 1-7. <http://dx.doi.org/10.18433/J3K020> PMID: 27096690
- [59] Liu, D.; Wang, L.N.; Li, H.X.; Huang, P.; Qu, L.B.; Chen, F.Y. Pentoxifylline plus ACEIs/ARBs for proteinuria and kidney function in chronic kidney disease: A meta-analysis. *J. Int. Med. Res.*, **2017**, 45(2), 383-398. <http://dx.doi.org/10.1177/0300060516663094> PMID: 28415944
- [60] Kaseda, R.; Tsuchida, Y.; Gamboa, J.L.; Zhong, J.; Zhang, L.; Yang, H.; Dikalova, A.; Bian, A.; Davies, S.; Fogo, A.F.; Linton, M.F.; Brown, N.J.; Ikizler, T.A.; Kon, V. Angiotensin receptor blocker vs ACE inhibitor effects on HDL functionality in patients on maintenance hemodialysis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **2018**, 28(6), 582-591. <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2018.02.020> PMID: 29691148
- [61] Qin, X.; Li, Y.; Sun, N.; Wang, H.; Zhang, Y.; Wang, J.; Li, J.; Xu, X.; Liang, M.; Nie, J.; Wang, B.; Cheng, X.; Li, N.; Sun, Y.; Zhao, L.; Wang, X.; Hou, F.F.; Huo, Y. Elevated homocysteine concentrations decrease the antihypertensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in hypertensive patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2017**, 37(1), 166-172. <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308515> PMID: 27834686

DISCLAIMER: The above article has been published, as is, ahead-of-print, to provide early visibility but is not the final version. Major publication processes like copyediting, proofing, typesetting and further review are still to be done and may lead to changes in the final published version, if it is eventually published. All legal disclaimers that apply to the final published article also apply to this ahead-of-print version.

4.2 ARTIGO 2:

POTENTIALS BIOMARKERS TO FOLLOW-UP THE PROGRESSION OF CHRONIC KIDNEY DISEASE AND A NEW STRATEGY TO ENHANCED ANTIOXIDANT DEFENCES IN EARLY AND MODERATE STAGES**JOURNAL OF RENAL NUTRITION**

(1) Andressa Keiko Matsumoto, (2,3,4) Michael Maes, (1) Ana Paula Michelin, (1) Kamila Landucci Bonifácio, (1) Laura de Oliveira Semeão, (1) Rafael Filipe Dal Ben Martins, (1) João Victor de Lima Pedrão, (1) Estefânia Gastaldello Moreira, (5) Vinicius Daher Alvares Delfino, (1) Décio Sabbatini Barbosa.

(1) Health Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

(2) Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

(3) Department of Psychiatry, Medical University of Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria

(4) IMPACT Strategic Research Center, Deakin University, Geelong, Australia

(5) Department of Internal Medicine, Nephrology Section, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

Andressa Keiko Matsumoto: dessamatsu@hotmail.com

Michael Maes: dr.michaelmaes@hotmail.com

Ana Paula Michelin: paulimichelin10@gmail.com

Kamila Landucci Bonifácio: kamilalondrina@hotmail.com

Laura de Oliveira Semeão: lsemeao@gmail.com

Rafael Filipe Dal Ben Martins: rfdalben@gmail.com

João Victor de Lima Pedrão: jvpedrao@gmail.com

Estefânia Gastaldello Moreira: egmoreira22@hotmail.com

Vinicius Daher Alvares Delfino: vddelfino@sercomtel.com.br

Décio Sabbatini Barbosa: sabbatini2011@hotmail.com

Corresponding Author: Andressa Keiko Matsumoto, Hospital Universitário de Londrina, Av. Robert Koch, 60 Vila Operária CEP: 86038-350 Londrina – PR, Londrina, Brazil. email: dessamatsu@hotmail.com, Phone/FAX 55 43 33712451; cell phone: 55 43 9 96016344.

Abstract

Objective: The current study was carried out to examine whether in pre-dialysis chronic kidney disease (CKD) patients (stages G3a, G3b and G4) treatment with folic acid 5 mg/daily may affect paraoxonase (PON1) enzyme activity, estimated glomerular filtration rate (eGFR), homocysteine (Hcy) levels and hematological parameters. **Methods:** We determined hematological parameters, estimated GFR (eGFR), PON1 activity and Hcy levels, both before and after treatment with folic acid (5 mg/d) versus no treatment during three consecutive months in 113 outpatients with CKD classified into stages 4, 3b and 3a. **Results:** The folic acid treatment significantly reduced post-treatment mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) in stages 3a and 4, serum iron (G3a but not in G3b and G4), ferritin (G4) and transferrin saturation (TS) in stage 3a. PON1 CMAase and AREase activities were significantly lower in stage 4 CKD as compared to stages 3a and 3b. Treatment with folic acid significantly increased CMAase and AREase in stages 3b and 4, but not 3a and significantly reduced plasma Hcy levels and the Hcy/PON1 activity. The effects of folic acid increasing PON1 activities were not mediated by changes in Hcy. **Conclusion:** Treatment with folic acid reduced serum iron, MCHC, ferritin and TS in early and moderate stages of CKD, may enhance antioxidant defenses, improve oxidative stress by rebalancing the prooxidant (Hcy) / antioxidant (PON1) in phases G3b and G4. In addition, Hcy levels and PON1 activity may be potentials biomarkers to follow the progression of CKD.

Keywords: chronic kidney disease, folic acid, hematological parameters, oxidative stress, antioxidants, biomarkers.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is a serious public health issue [1]. CKD is the 12th most common cause of death, accounting for 1.1 million deaths worldwide [2]. CKD is defined as renal dysfunction with an estimated glomerular filtration rate [eGFR] <60 mL/min/1.73 m² and which should be present for at least 3 months [3]. Staging of CKD is based on eGFR values whereby G1 stage refers to normal (eGFR ≥ 90 mL/min/1.73 m²), G2 to mildly decreased (eGFR = 60-89 mL/min/1.73 m²), G3a (eGFR 59-44 mL/min/1.73 m²), G3b (eGFR 44-33 mL/min/1.73 m²), G4 to severely decreased kidney function (eGFR 29-15 mL/min/1.73 m²), and G5 to kidney failure including end-stage renal disease (ESRD) (eGFR <15 mL/min/1.73 m²) [3].

Age, hypertension, smoking, dyslipidemia and *diabetes mellitus* are some of the known risk factors of CKD [4, 5]. Anemia affects millions of patients with CKD and there are several mechanisms involved. The first refers to the reduced iron reservoir needed for heme synthesis. This deficiency results from excessive production of hepcidina regulatory protein produced by the liver under the influence of cytokine stimulation, which inhibits the absorption of iron from the gastrointestinal tract and at the same time reduce its release into the blood [6]. Inflammatory cytokines, IL-1, IL-6 and IFN- γ or TNF- α are the main factors contributing to the increase in hepcidin gene expression. The second mechanism involved in the pathogenesis of anemia of CKD is the impaired production of erythropoietin [7].

Absorption of iron in the gastrointestinal tract is a complicated process involving many proteins (ferroportin, ferritin, hepcidin, hephaestin, transferrin, lactoferrin). At the cellular level, deficiency of this element increases the synthesis of the transferrin receptor and increases the absorption of iron in the gastrointestinal tract [6]. While at the systemic level, its deficiency significantly reduces the synthesis of ferritin (unless the deficiency is accompanied by inflammation that is present at the same time, because ferritin is an acute-phase protein). The so-called active iron, i.e., rapidly exchanging, is associated with ferritin and is found primarily in hepatocytes and liver macrophages, spleen, bone marrow and

muscles. The role of ferritin is primarily intracellular iron storage, which prevents the formation and production of reactive oxygen (ROS) generated by the Fenton reaction [8].

Many CKD-provoking factors are associated with mitochondrial dysfunctions and increased nitro-oxidative stress [5]. Oxidative stress (OS) occurs in the early stages of CKD and increases with the progression of renal impairment [9]. Uremic toxins, including urea, creatinine, homocysteine [Hcy], oxalate, phosphorus, and guanidines, may promote lipid peroxidation and protein oxidation and generate an imbalance in the ratio of oxidized to reduced glutathione and reduced superoxide dismutase / peroxidase activity [10-13]. Hcy is metabolized by Hcy-thiolactonase (HTLase), which hydrolyzes Hcy-thiolactone to Hcy [14]. Hcy is minimally eliminated by the kidney since only non-protein bound Hcy is subjected to glomerular filtration [15]. Moreover, in the kidney, Hcy is transsulfurated and a deficiency of this renal transsulfuration mechanism may contribute to elevated plasma Hcy [16]. Increased Hcy levels are frequently observed in CKD patients and are, additionally, associated with elevated OS [17]. Moreover, plasma Hcy is modulated by genetic alterations in methionine metabolism enzymes, and deficiencies in vitamin B12 and B6 and folic acid [16]. Folic acid and vitamin B12 are essential cofactors in the methylation of Hcy into methionine [18-19]. The metabolism of 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF), the circulating form of folic acid, is impaired in uremic patients [20] including a slower uptake rate of folates into tissues [21]. Folic acid supplementation at doses of 2.5 to 15 mg may be efficient in reducing Hcy serum levels in CKD pre-dialysis or hemodialysis patients [18, 22-25]. Moreover, there is evidence that folic acid exerts antioxidant effects, such as free radical scavenging, protection against oxidative modification of low-density lipoproteins (LDL), and improvement of cellular antioxidant defences [26, 27]

In CKD, increased production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) frequently occurs as a consequence of reduced clearance of pro-oxidant substances due to renal dysfunction [28]. Moreover, impaired antioxidant defences may increase vulnerability to oxidative damage [28]. One of those antioxidant enzymes is paraoxonase (PON)1, a high-

density lipoprotein (HDL) associated enzyme displaying arylesterase (AREase) and lactonase activity [29]. PON1 protects lipids, HDL and LDL cholesterol from oxidation thereby protecting against the consequences of lipid peroxidation including cardiovascular disorder [30, 31]. Moreover, PON1 shows HTLase activity thereby hydrolyzing Hcy-thiolactone back to Hcy, which in turn may be converted to methionine [32], thereby protecting against Hcy-associated ROS and OS [14]. Hence, the current study was carried out to examine whether, in pre-dialysis patients (stages G3a, G3b and G4), folic acid 5 mg/daily may affect PON1 enzyme activity, eGFR and Hcy levels. The specific hypotheses are that in CKD patients treated with folic acid may enhance PON1 activity and that the latter may improve eGFR and reduce Hcy levels.

Methods

Participants

In this study, all 113 outpatients with CKD were Brazilian nationals, aged 18-65 years, both women and men. The clinical diagnosis of CKD was made by senior nephrologists based on eGFR values $<60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ and the presence of markers of kidney damage including albuminuria, aberrations in urine sediment and electrolyte abnormalities. The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equation [34] and Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation [35] were used to estimate GFR based on serum creatinine levels. CKD patients were classified into three groups according to eGFR classification G3a, G3b and G4 [3].

Socio-demographic and clinical data were collected from all participants including the presence of diabetes, hypertension and the use of acetylsalicylic acid (ASA), statins, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and angiotensin II receptor blockers (ARBs). Systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP) were measured using an aneroid sphygmomanometer. The diagnosis of tobacco use disorder (TUD) was made using DSM-IV-TR criteria. We also determined body mass index (BMI) as body weight (kg)/height in

meters squared.

Exclusion criteria for all subjects were a) age less than 18 years; b) neuroinflammatory disorders including Parkinson's disease, stroke, and multiple sclerosis; c) medical illness including malignancies; and d) use of immunomodulatory drugs, and antioxidant and ω 3-polyunsaturated fatty acid supplements. We also excluded patients who did not fit within stages 3a-4.

This is a randomized, non-blinded, clinical trial, which examines the effects of intervention with folic acid in PON1 activities, Hcy and eGFR. Patients were allocated (simple randomization at a ratio 6/4) into an active intervention group (treatment with folic acid) or a control group (no active intervention). Treatment with folic acid was fixed at a dose of 5 mg in a tablet daily for 3 consecutive months. The choice of this dosage is based on previous studies [24, 36]. All patients were treated with care as usual (CAU), that is use of antidiabetics, statins, ACE inhibitors, ARBs, antihypertensive drugs and ASA in the intervention and control group. These treatments and their dosages were stable for at least 8 weeks prior to the initiation of the trial and during the study as well. No other treatments were started during the study period. All patients had blood tests at baseline and 3 months later. After informed consent was given, the participants underwent clinical interviews and on the same day blood samples were collected while the intervention started the next day in the morning. A post-discontinuation interview and blood collection were conducted 12-weeks post-treatment. All patients from the extended intervention group had follow-up calls once a week. Treatment compliance was ascertained via pill counts and self-reporting.

Assays

Fasting blood was sampled from all individuals between 8.00 and 9.00 a.m. Blood was immediately centrifuged, and the serum was aliquoted and stored at -80°C until thawed for assays. Analyses of hematological parameters (Red blood cells [RBC] and reticulocytes analyses) were performed by Mindray BC-6800 autoanalyser (Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, Shenzhen, China). Folate levels measured by Microparticle

Immunoassay by Chemiluminescence (Alinity Abbott).

PON1 activities were determined by the rate of hydrolysis of 4-(chloromethyl)phenylacetate (CMPA, Sigma, USA) – CMPAase - as well as by the rate hydrolysis of phenylacetate under low salt condition (AREase). Analysis were conducted in a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer, USA) [37]. Analyses of serum creatinine were performed on the Dimension®, RxL Siemens (Deerfield, IL, USA). Hcy was measured by automated methodologies on the Architect i2000SR apparatus (Abbott, IL, USA).

This study was registered in the Brazilian Record of Clinical Trials (ReBEC), under n RBR-2bfthr.

Statistical analysis

Analysis of contingency tables (χ^2 test) was employed to assess the associations between categorical variables while analysis of variance (ANOVA) was employed to assess differences in continuous variables between treatment groups. Generalized estimating equation (GEE) analysis, repeated measures, was employed to assess the effects of folic acid on the eGFR and biomarkers. The pre-specified GEE analyses included categorical effects of folic acid treatment (yes/no), time and the time-by-treatment interaction. GEE analysis, repeated measures, was also used to examine the changes over time (from baseline to endpoint) in eGFR and biomarker data. All tests were two-tailed and a p-value of 0.05 was used for statistical significance. The statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 25. Two z unit-weighted composite scores were computed, a first reflecting an integrative index of PON1 activity computed as z score of CMPAase activity + z score of AREase activity, and the second reflecting a PROOX/ANTIOX computed as z score of Hcy – z score of (zCMPAase + zAREase).

Results

Consort flow diagram

Figure 1 shows the CONSORT flow diagram and the progress of the participants

through the randomized trial. Of the 209 CKD patients included in the study, 73 were excluded due to different exclusion criteria as shown in Figure 1. As a consequence, one hundred thirty-six participants were randomized in the study namely 82 (60.30%) patients were allocated to the intervention arm treated with folic acid and CAU, and 54 (39.70%) patients were allocated to the CAU only or control group. After randomization, 23 patients were excluded, i.e. 16 in the intervention and 7 in the control arm (see Figure 1). Finally, 113 patients completed the 12-weeks follow-up assessment and we analyzed the data of 66 patients treated with folic acid + CAU and 47 with CAU alone using a classical intention-to-treat-analysis. There were no missing data in both treatment arms either at baseline or after treatment.

Baseline characteristics of patients in both groups with and without intervention

Data on baseline characteristics of CKD patients treated with and without folic acid are described in Matsumoto et al. [38].

Effects of treatment with folic acid

Table 1 shows the results of GEE analysis, repeated measures, namely the effects of treatment with folic acid on the eGFR and biomarkers. We examined the effects of time (baseline versus 3 months later), treatment (study groups with or without folic acid), and the time X treatment group interaction. The first GEE analysis in Table 2 shows no significant effect of treatment, time, and the interaction pattern between time X treatment on the GFR values estimated by MDRD Study and CKD-EPI equation. The time X treatment interactions were significant for folic acid, PON1 CMPAase and AREase activities, Hcy, and the PROOX/ANTIOX. Post-treatment levels of folic acid, CMPAase and AREase were significantly increased in patients treated with folic acid as compared with their baseline levels and the pre- and post-treatment levels measured in patients who were not treated with folic acid. The post-treatment levels of Hcy and the PROOX/ANTIOX were significantly lower in

patients treated with folic acid as compared with their baseline levels and baseline and endpoint levels measured in patients who were not treated with folic acid. There were no significant effects of treatment, time or their interaction on vitamin B12 concentrations.

Associations between changes in folic acid, PON1 activities and Hcy

Employing GEE analysis, repeated measures, we examined the associations between the changes over time in PON1 activities, Hcy (introduced as dependent variables) and folic acid concentrations (introduced as explanatory variable). We found that the changes in folic acid from baseline to 3 months later were significantly and positively correlated with the changes in PON1 CMPAase and AREase activities and inversely with the changes in Hcy. We also found that the Hcy did not have any significant effects on PON1 enzyme activities after considering the effects of folic acid (**Table 2**).

Effects of treatment with folic acid on hematological parameters and iron metabolism

Table 3 shows the results of GEE analysis, repeated measures, treatment with folic acid levels of mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), serum iron, ferritin and transferrin saturation (TS) was significantly reduced in patients treated with folic acid as compared with their baseline levels and the pre-and post-treatment levels measured in patients without active treatment were not significant. We also found that the folic acid treatment did not have any significant effects on other hematological parameters was after considering the effects of folic acid.

Effects of GFR groups

Table 4 shows the differences in PON1 enzyme activities and Hcy between the three groups divided according to eGFR values into groups G3a, G3b and G4. PON1 CMPAase and AREase activities were significantly higher in group G3a than in groups G3b and G4. Hcy levels were significantly different between the three study samples with the lowest levels

in group G3a and the highest levels in group G4. There were highly significant differences in the PROOX/ANTIOX among the three groups with the lowest levels in group G3a and highest levels in group G4 with a difference between those groups of around 1.475 standard deviations. The values of hemoglobin, MCHC and total iron-binding capacity (TIBC), were significant increased in group G3a in comparison to groups G3b and G4. Serum iron levels were higher in G3a than G4 and Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH) in G3a in comparison to G3b. There was significantly reduction in Red Cell Distribution Width (RDW) in group G3a in comparison to group G3b and G4, and Immature Reticulocyte Fraction (IRF) was significantly less in G3a and G3b than in G4.

Table 5 shows this interaction pattern, namely that in patients treated with folic acid, the post-treatment PON1 activities are significantly higher than the baseline values in groups G3b and G4, but not in group G3a, while no significant effects were established in patients without active treatment indicating that treatment with folic acid increases PON1 activities only in patients belonging to groups G3b and G4, but not group G3a. In the hematological parameters analysis, the folic acid treatment significantly reduced post-treatment mean MCHC in stages 3a and 4, serum iron in G3a but not in G3b and G4, ferritin in stage G4 and TS in G3a.

Discussion

CKD patients usually have a prevalence of anemia depending to the definition, but generally increased in frequency and severity in the more advanced stages of CKD [39]. Therefore, alternatives that help in the prevention of anemia become important for these patients. Interestingly, in our study the CKD patients without anemia, the treatment with folic acid showed levels of MCHC (in stages 3a and 4), serum iron and TS in stage G3a and ferritin in stage G4 were significantly decreased as compared with their baseline levels. In addition, these alterations did not result in significant changes in the clinical conditions of these patients, because post-intervention hematological parameters continued not indicated

anemia.

Suliburska; Skrypnik; Chmurzyńska [40] showed that folic acid affects iron status in female rats deficient in these micronutrients in moderate and long-term supplementation. This study indicated that folic acid may decrease the bioavailability and distribution of iron in the organism, and found that during supplementation no interaction between iron and folic acid occurs on the level of duodenal transporters. It is certain that the mechanism that relates folate to iron status requires further investigation.

Our data showed that the hemoglobin, HCM, MCHC, serum iron and TIBC levels are significantly reduced from G3a to G3b to G4, but the RDW and IRF increased according to disease progression. In CKD anemia may occur the early stages (CKD stages 2 and 3). The hemoglobin levels decreases when the eGFR is around 70 ml/min/1.73 m² (men) and 50 ml/min/1.73 m² (women) [41]. However, anemia is more common in CKD stage 4 (even earlier in diabetic patients) and worsens as CKD progresses. In advanced stages of CKD and in the dialysis population anemia is present in as high as 90% of patients. Because of the frequency of iron deficiency in this population, iron indexes should be assessed in all patients with CKD and anemia [39]. In the general population, the serum ferritin concentration < 30 ng/mL is strongly suggestive of iron deficiency. However, this iron test tends to be inaccurate for the diagnosis of iron deficiency in patients with CKD [41].

Some studies confirm that extensive iron (oral or intravenous), erythropoietin preparations, vitamin C, folic acid and vitamin B12 supplementation should be considered in advanced CKD and in malignancy during chemotherapy [42, 43, 44]. In clinical observation, the implementation of such treatment significantly delays or prevents the occurrence of anemia in chronic diseases [45].

This study showed in analyses of baseline data of PON1 CMPAase and AREase activities were significantly higher in patients in stage G3a as compared with stages G3b and G4. Our results extend those of Karatas et al. [46] who reported that PON1 levels decreased with the increasing severity of CKD stages. Lowered levels of PON activity are frequently

associated with CKD. For example, AREase activities were significantly lowered in CKD patients as compared with non-CKD patients while lowered activity levels also predicted a poorer outcome [17]. Another study reported lowered levels of both CMPAase and AREase in CKD and End-Stage Renal Disease (ESRD) patients as compared with controls [47].

Furthermore, in CKD, PON1 AREase activity is significantly and negatively associated with creatinine concentrations [47]. Such findings indicate that PON1 enzyme activities are significantly reduced in association with increasing CKD severity with lower levels being established in ESRD. Therefore, the increasing severity of CKD appears to be accompanied by lowered total PON1 CMPAase and AREase activities and, consequently, lower lipid-associated antioxidant defences and an increased vulnerability to developing damage due to OS [48].

Some studies show that OS is present even at the early stages of CKD and increases in parallel with the progression of CKD to achieve very high levels in ESRD [49, 50]. The latter authors review that the kidney is vulnerable to oxidative damage because it is a highly metabolic organ that is rich in mitochondrial oxidative reactions. All in all, our results indicate that lowered PON1 CMPAase and AREase activities may be a key component in the pathophysiology of CKD by aggravating the damage due to OS.

Our study showed that that treatment with folic acid significantly increased CMPAase and AREase especially in patients allocated to CKD classes G3b and G4, but not G3a, as we showed in our previous work [38]. Only a few studies examined the effects of folic acid on PON1 enzymatic activities and the few reported negative findings [51, 52, 53].

The possible antioxidant activity of folic acid is described to its free radical scavenging properties [26]. All the radicals (thiyl radicals $[RS^{\cdot}]$, peroxy radical $[CCl_3O_2^{\cdot}]$, azide radical $[N_3^{\cdot}]$, sulfate radical anions $[SO_4^{\cdot-}]$, bromine radical $[Br_2^{\cdot-}]$ and hydroxyl $[^{\cdot}OH]$ radicals) react with folic acid under ambient conditions at an almost diffusion-controlled rate. In addition, folic acid can not only scavenge RS^{\cdot} but can also repair those thiols at physiological pH. Folic acid can be converted into a coenzyme N5, N10-dimethylene-5,6,7,8-tetrahydrofolate *in vivo*

through a series of enzymatic transformations. It has purine and pyrazine-type rings and two amino acids on the pyrazine ring. Its lactim form has a hydroxyl group on the purine-type ring. When folic acid reacts with oxidizing free radicals, this hydroxyl group can play an important role in inhibiting the oxidation effect [54].

This study found that the Hcy levels are significantly increased from G3a to G3b to G4. In addition, patients in stage G4 showed lower PON1 activity and higher Hcy concentrations. The Hcy levels may be potential biomarkers to follow the progression of the CKD. Our data extend the study of Kerkeni et al. [55] and Choi et al. [56]. Some other studies reported that CKD is accompanied by hyperhomocysteinemia and that there are significant inverse associations between PON1 activity [57, 58]. Moreover, patients with CKD show increased Hcy levels as compared with the general population [15]. Van Guldener and Stehouwer [59] demonstrated that hyperhomocysteinemia in these patients may be induced by a dysregulated Hcy metabolism in the kidneys rather than by reduced eGFR. As such, it is difficult to conclude whether Hcy or eGFR is the explanatory variable. To complicate matters, Hcy may play a mechanistic role in suppressing PON1 activity [17] although in our study there were no significant effects of Hcy on PON1 enzymatic activities.

Moreover, it was found that folic acid treatment reduced plasma Hcy levels and the Hcy/PON1 activity and that the effects of folic acid increasing PON1 activities were not mediated by changes in Hcy. Our findings extend those of previous papers reporting that treatment with folic acid (2.5 - 15 mg/d) may reduce Hcy concentrations in CKD [18, 22-25]. Some reviews [19, 60, 61] discuss that the beneficial effects of folic acid therapy may be due to its direct effects or to a reduction of hyperhomocysteinemia in patients with CKD.

Our data significantly reduced plasma Hcy levels and serum iron may be correlated. Baggott and Tamura [62] study review proposed that an elevated amount of non-protein-bound iron (free iron) increases circulating Hcy. This hypothesis embased that methionine, S-adenosylhomocysteine and cystathionine are constantly exposed to free iron at acidic pHs during the iron exchange, leading to Hcy formation. Thus, it is possible that the serum iron

reduced by folic acid treatment in our study is correlationated to reduced Hcy levels.

Hcy may cause OS through different mechanisms including auto-oxidation, suppression of glutathione peroxidase and activation of superoxide dismutase [63], as we showed in our previous work [38]. Hcy showed a possible antioxidant activity [64, 65]. The metabolism of Hcy comprises two different pathways, namely remethylation and transsulfuration, requiring folate and vitamin B12 as cofactors [66, 67]. As such, folate is involved in Hcy remethylation to methionine [57]. Therefore, our results that folic acid treatment may reduce Hcy concentrations, suggest that the antioxidant properties of folate contribute directly to an improved prooxidant/antioxidant in CKD patients.

The other important finding was that short-term treatment with folic acid 5 mg daily for three consecutive months showed no significant changes in GFR value estimated either by MDRD Study and CKD-EPI equation. We adopted the eGFR from serum creatinine measurements using the 4-variable MDRD Study equation according to the National Kidney Foundation [3]. We adopted the CKD-EPI equation considering that it presents a smaller bias and potentially decreases false-positive diagnoses of stage 3 CKD [34]. In our study the follow-up period may have been too short to demonstrate any effect on the eGFR.

In additional, the results of another folate interventional in CKD patients are conflicting and some studies even reported a decrease in eGFR after treatment with different doses (0.8 mg/d and 2.5 mg/d) of folic acid in a single tablet containing high doses of combined B vitamins (folic acid, vitamin B6, and vitamin B12) in patients with advanced CKD [25]. Nanayakkara et al. [36] study with no-dialysis patients supplemented with folic acid 5 mg/d (24 months) induced a moderate increase in eGFR levels although the overall effect was not significant. Nevertheless, the contradictory results may be a consequence of differences in dose namely 5 mg daily in the studies that reported an improvement in eGFR versus < 5 mg daily in the negative studies. Even more important is a possible difference in CKD subgroups among studies.

This study has some limitations that must be considered when interpreting the data.

The limitations are: (1) non-blinded study; (2) non-placebo study; (3) non-healthy control group; (4) the smaller number of participants in stage 3a CKD patients.

In conclusion, treatment with folic acid did not significantly change the eGFR levels, but increased CMPAase and AREase activities and additionally decreases Hcy levels. The Hcy levels were significantly increased from G3a to G3b to G4 and PON1 activity decreased according to disease progression. Then, maybe they are may be potentials biomarkers to follow the progression of CKD.

Folic acid treatment of CKD patients in early/intermediate stages of CKD patients improves the prooxidant (Hcy) / antioxidant (PON1 activities). Treatment with folic acid in phases G3b and G4 may enhance antioxidant defences in CKD patients and may be a strategy to help to decrease oxidative/nitrosative stress in these patients and the damages associated with this phenomenon. Curiously, the folic acid treatment reduced serum iron, MCHC, ferritin and TS in the early and moderate stages of CKD. Although these alterations did not result in significant changes in the clinical conditions of these patients, because post-intervention hematological parameters continued not to indicate anemia. Additional studies in this field are needed.

Practical application

Treatment with folic acid in no dialyses CKD patients offers a new approach for treating hyperhomocysteinemia and improving the antioxidant capacity of these patients, thereby attenuated the complications resulting from the illness.

Support and financial disclosure

The authors have no conflict of interest with any commercial or other association in connection with the submitted article. The research did not have financial support.

References

1. Neuen NB, Chadban SJ, Demaio AR, Johnson DW, Perkovic V. Chronic kidney disease and the global NCDs agenda. *BMJ Global Health*. 2017.

2. GBD 2015. Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388:1459–544.
3. KDIGO Work Group (2021). KDIGO 2021 clinical practice guideline for the management of glomerular diseases. *Kidney International*, v. 100, p. S1–S276. 2021.
4. Aslam S. Cardiovascular disease in dialysis patients: do some antihypertensive drugs have specific antioxidant effects or is it just blood pressure reduction? Does antioxidant treatment reduce the risk for cardiovascular disease? *Nephrology and Hypertension*. 2008; 17:99-105.
5. Levi A, Cohen E, Levi M, Goldberg E, Garty M, Krause I. Elevated serum homocysteine is a predictor of accelerated decline in renal function and chronic kidney disease: A historical prospective study. *European Journal of Internal Medicine*. 2014; 25:951–955.
6. Bergamaschi G, Vilani L. Serum hepcidin: A novel diagnostic tool in disorders of iron metabolism. *Haematologica* 2009, 94:1631–1633.
7. Sheikh N, Dudas J, Ramadori G. Changes of gene expression of iron regulatory proteins during turpentine oil-induced acute-phase response in the rat. *Lab. Investig.* 2007, 87; 713–725.
8. Wicinski M, Liczner G, Cadelski K, Kołnierzak T, Nowaczewska M, Malinowski B. Anemia of Chronic Diseases: Wider Diagnostics—Better Treatment? *Nutrients*, 2020, 12:1784.
9. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney International*. 2004; 65:1009–16.
10. Barreto FC, Stinghen AEM, Oliveira RB, et al. The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins. *Brazilian Journal of Nephrology*. 2014; 36(2).
11. Stępniewska J, Gołembiewska E, Dolegowska B, Domański M, Ciechanowski K. Oxidative Stress and Antioxidative Enzyme Activities in Chronic Kidney Disease and Different Types of Renal Replacement Therapy. *Current Protein and Peptide Science*. 2015; 16.
12. Duni A, Liakopoulos V, Rapsomanikis KP, Dounousi E. Chronic Kidney Disease and Disproportionally Increased Cardiovascular Damage: Does Oxidative Stress Explain the Burden? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017; 1–15.
13. Taylor D, Bhandari S, Seymour AML. Mitochondrial dysfunction in uremic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2015; 308:579–587.
14. Yilmaz N. Relationship between paraoxonase and homocysteine: crossroads of oxidative diseases. *Archives of Medical Science*. 2012; 138-153.

15. Perna AF, Sepe I, Lanza D, et al. The gasotransmitter hydrogen sulfide in hemodialysis patients. *Journal of Nephrology*. 2010; 23:S92–S96.
16. Long Y, Nie J. Homocysteine in Renal Injury. *Kidney Disease*. 2016; 2:80–87, 2016.
17. Kennedy DJ, Tang WHW, Fan Y, et al. Diminished Antioxidant Activity of High-Density Lipoprotein– Associated Proteins Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Heart Association*. 2013:1-7.
18. Cianciolo G, La Manna G, Coli L, et al. 5-methyltetrahydrofolate administration is associated with prolonged survival and reduced inflammation in ESRD patients. *American Journal of Nephrology*. 2008; 28: 941–948.
19. Cianciolo G, De Pascalis A, Di Iullo L, Ronco C, Zannini C, LA Manna G. Folic Acid and Homocysteine in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease Progression: Which Comes First? *Cardiorenal Medicine*. 2017; 7:255–266.
20. Pietrzik K, Bailey L, Shane B. Folic Acid and L-5-Methyltetrahydrofolate: Comparison of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clinical Pharmacokinetics*. 2010; 49:535–548.
21. Zha Y, Qian Q. Protein Nutrition and Malnutrition in CKD and ESRD. *Nutrients*. 2017; 27:208.
22. Righetti M, Ferrario GM, Milani S, et al. Effects of folic acid treatment on homocysteine levels and vascular disease in hemodialysis patients. *Medical Science Monitor*. 2003; 9:19–24.
23. Vianna AC, Mocelin AJ, Matsuo T, et al. Uremic hyperhomocysteinemia: A randomized trial of folate treatment for the prevention of cardiovascular events. *Hemodialysis International*. 2007; 11:210–216.
24. House AA, Eliasziw M, Cattran DC, et al. Effect of B-vitamin therapy on progression of diabetic nephropathy: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010; 303(16):1603-1609.
25. Wu CC, Zheng CM, Lin YF, et al. Role of homocysteine in end-stage renal disease. *Clinical Biochemistry*. 2012; 45:1286–1294.
26. Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001; 30:1390–1399.
27. Nakano E, Higgins JA, Powers HJ. Folate protects against oxidative modification of human LDL. *British Journal of Nutrition*. 2001; 86: 637–639.
28. Locatelli F, Canaud B, Eckardt K, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2003; 18:1272–1280.

29. Costa LG, Giordano G, Furlong CE. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: The hunt goes on. *Biochemical Pharmacology*. 2001; 81:337–344.
30. Efrat M, Aviram M. Macrophage paraoxonase 1 (PON1) binding sites. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008; 376(1):105–110.
31. Rosenblat M, Volkova N, Ward J, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) inhibits monocyte-to-macrophage differentiation. *Atherosclerosis*. 2001; 219(1):49–56.
32. Yilmaz N, Cicek HK, Celik A, Davutoglu V. Diagnostic value of bilirubin concentrations compared with novel and traditional biomarkers in atherosclerosis with coronary artery disease. *Saudi Medical Journal*. 2006; 27:1262-4.
33. Marsillach J, Aragonès G, Beltrán R, et al. The measurement of the lactonase activity of paraoxonase-1 in the clinical evaluation of patients with chronic liver impairment. *Clinical Biochemistry*. 2009; 42(1-2):91-8.
34. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Annals of Internal Medicine*. 1999; 130(6):461-70.
35. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009; 150:604 – 612.
36. Nanayakkara PWB, Van Guldener C, Ter Wee PM, et al. Effect of a Treatment Strategy Consisting of Pravastatin, Vitamin E, and Homocysteine Lowering on Carotid Intima-Media Thickness, Endothelial Function, and Renal Function in Patients With Mild to Moderate Chronic Kidney Disease. *Archives of Internal Medicine*. 2007; 167: 1262-1270, 2007.
37. Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2008; 1(2):147-152.
38. Matsumoto AK, Michelin AP, Semeão LO, et al. A randomized trial of short-term treatment with folic acid to reduce the oxidative stress of patients with chronic kidney disease. *Current Drug Metabolism*, 2021; 23 (3): 242-247.
39. Fishbane S, Spinowitz B. Update on Anemia in ESRD and Earlier Stages of CKD: Core Curriculum 2018. *American Journal of Kidney Diseases*, 2018, 71 (3):423-435.
40. Suliburska J, Skrypnik K, Chmurzyńska, A. Folic Acid Affects Iron Status in Female Rats with Deficiency of These Micronutrients. *Biological Trace Element Research*, 2020, 195:551–558.
41. Stancu S, Stanciu A, Zugravu A, et al. Bone marrow iron, iron indices, and the response to intravenous iron in patients with non-dialysis-dependent CKD. *Am J Kidney Dis*. 2010;55(4):639-647.
42. Winczura, P.; Jassem, J. Recombinant human erythropoietin in treatment of the cancer

- patients with anemia: Hopes and threats. *Oncol. Clin. Pract.* 2007, 3, 198–204.
43. Davis, S.L.; Littlewood, T.J. The investigation and treatment of secondary anaemia. *Blood Rev.* 2012, 26: 65–71.
 44. Joshi, A.D.; Holdford, D.A.; Brophy, D.F.; Harpe, S.E.; Mays, D.; Gehr, T.W. Utilization Patterns of IV Iron and Erythropoiesis Stimulating Agents in Anemic Chronic Kidney Disease Patients: A Multihospital Study. *Anaemia* 2012, 2012: 1–11.
 45. Styszynski, A. Anemia of inflammation in older persons. Part II. Impact of age-dependent diseases, diagnostic and therapeutic options. *Geriatrics* 2013, 7: 1–8.
 46. Karatas A, Bayrak A, Bayrak T, Canakci E. Oxidant and antioxidant mechanisms in chronic kidney disease. *Annals of Medical Research.* 2019; 26(2): 270-4.
 47. Miljkovic M, Stefanovic A, Vekic J, et al. Activity of paraoxonase 1 (PON1) on HDL2 and HDL3 subclasses in renal disease. *Clinical Biochemistry.* 2018; 60:52-58.
 48. Moreira EG, Boll CM, Correia DG, Soares JF, Rigobello C, Maes M. Why Should Psychiatrists and Neuroscientists Worry about Paraoxonase 1? *Current Neuropharmacology.* 2019; 17.
 49. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, et al. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 48, no. 5, pp. 752-60, 2006.
 50. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Bozikas A, Eleftheriadis T, Dounousi E. Antioxidant Supplementation in Renal Replacement Therapy Patients: Is There Evidence? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
 51. Vanzin CS, Mescka CP, Donida B, et al. Lipid, Oxidative and Inflammatory Profile and Alterations in the Enzymes Paraoxonase and Butyrylcholinesterase in Plasma of Patients with Homocystinuria Due CBS Deficiency: The Vit;min B12 and Folic Acid Importance. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 2015; 35:899–911.
 52. Perła-Kajań J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans. *The FASEB Journal*, vol. 24, no.3, pp. 931-936, 2010.
 53. Gursu MF, Onderci M, Gulcu F, Sahin K. Effects of vitamin C and folic acid supplementation on serum paraoxonase activity and metabolites induced by heat stress in vivo. *Nutrition Research.* 2004; 24(2): 157-164.
 54. Qin L, Wang W, You S, Dong J, Zhou Y, Wang J. In vitro antioxidant activity and in vivo antifatigue effect of layered double hydroxide nanoparticles as delivery vehicles for folic acid. *International Journal of Nanomedicine.* 2014; 9:5701–5710.
 55. Kerkeni M, Letaief A, Achour A, Miled A, Trivin F, Maaroufi K. Hyperhomocysteinemia, paraoxonase concentration and cardiovascular complications in Tunisian patients with nondiabetic renal disease. *Clinical Biochemistry.* 2009; 42 (09):77-82.

56. Choi ST, KIm JS, Song J. Elevated serum homocysteine levels were not correlated with serum uric acid levels, but with decreased renal function in gouty patients. *Journal of Korean Medical Science*. 2014; 29: 788-792, 2014.
57. Perła-Kajań J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino Acids*. 2012; 43:1405–1417.
58. Koyama K, Yoshida A, Takeda A, Morozumi K, Fujinami T, Tanaka N. Abnormal cyanide metabolism in uraemic patients. *Nephrol Dial Transpl*. 1997; 12:1622–1628.
59. Van Guldener C, Stehouwer CD. Homocysteine metabolism in renal disease. *Journal of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2003; 41:1412–1417.
60. Clase CM, Ki V, Holden RM. Water-Soluble Vitamins in People with Low Glomerular Filtration Rate or On Dialysis: A Review. *Seminars in Dialysis*. 2013; 26(5):546–567.
61. Capelli I, Cianciolo G, Gasperoni L, et al. Folic Acid and Vitamin B12 Administration in CKD, Why Not? *Nutrients*. 2019; 11:383.
62. Baggott, J.E.; Tamura, T. Homocysteine, Iron and Cardiovascular Disease: A Hypothesis. *Nutrients* 2015, 7: 1108-1118.
63. Cristiana F, Nina Z, Elena A. Homocysteine in red blood cells metabolism - pharmacological approaches. *Blood Cell: An Overview of Studies in Hematology*. Cap. 3. Ed. Intech. 2012.
64. Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress time for a reality check? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000; 20:1182-4.
65. Poole LB. The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry *Free Radical Biology & Medicine*. 2015;148–157.
66. Van Guldener, C.; Stam, F.; Stehouwer, C. D. Hyperhomocysteinaemia in chronic kidney disease: Focus on transmethylation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* vol. 2005; 43:1026–1031.
67. Obeid R, Kirsch SH, Dilmann S, Klein C, Eckert R, Geisel J, Herrmann W. Folic acid causes higher prevalence of detectable unmetabolized folic acid in serum than B-complex: a randomized trial. *European Journal of Nutrition*. 2016; 55:1021–1028.

Figure 1: Consort flow diagram.

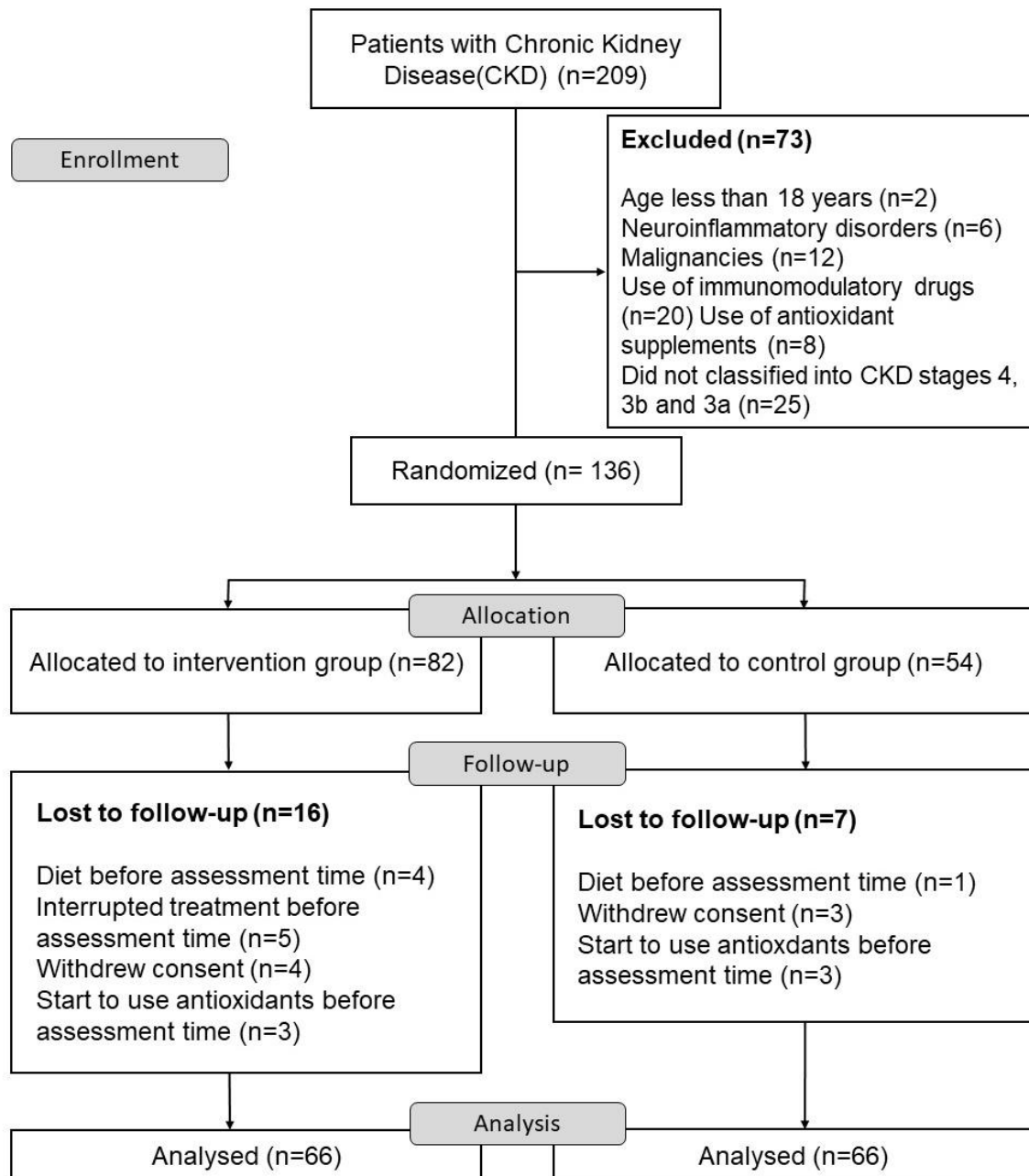


Table 1: Effect of folic acid treatment on estimated glomerular filtration rate (eGFR), paraoxonase (PON)1 CMPAase and AREase activities, homocysteine and vitamin B12: results of generalized estimating equation (GEE) analysis, repeated measures.

Variables	Active Treatment	Basal	Post treatment	Treatment		Time		Treatment x time	
				F	p	F	P	F	p
eGFR (mL/min/1.73m ²) ϕ	No	36.7 (1.8)	37.2 (2.2)	0.83	0.362	0.94	0.926	0.26	0.926
	Yes	34.9 (1.3)	34.6 (1.6)						
eGFR (mL/min/1.73m ²) ϵ	No	37.27 (2.0)	37.52 (2.2)	0.90	0.341	0.37	0.715	0.15	0.698
	Yes	35.13 (1.4)	34.75 (1.76)						
Folic Acid (mg/mL)	No	7.79 (0.49)	9.04 (0.81)	100.1	<0.001	126.6	<0.001	88.83	<0.001
	Yes	8.55 (0.56)	37.77 (3.07) ^{***}						
PON1 CMPAase (U/mL)	No	32.7 (1.4)	34.4 (1.6)	1.38	0.240	9.14	0.003	3.84	0.05
	Yes	34.4 (1.6)	39.1 (1.5) [*]						
PON1 AREase (U/mL)	No	193.0 (6.4)	189.9 (7.9)	3.79	0.052	9.16	0.002	13.46	<0.001
	Yes	189.5 (6.1)	221.9 (5.6) ^{**}						
CMPAase + AREase (z scores)	No	0.25 (0.18)	0.32 (0.21)	4.96	0.026	17.70	<0.001	14.26	<0.001
	Yes	0.08 (0.17)	1.38 (0.17) ^{***}						
Homocysteine (mmol/L)	No	18.79 (1.78)	16.87 (0.74)	0.64	0.423	18.02	<0.001	8.23	0.004
	Yes	18.87 (0.68)	14.49 (0.46) ^{**}						
PROOX / ANTIOX	No	0.069 (0.213)	-0.117 (0.181)	3.32	0.069	34.20	<0.001	20.83	<0.001
	Yes	0.251 (0.163)	-1.349 (0.166) ^{***}						
Vitamin B12 (mg/mL)	No	408.6 (30.2)	421.3 (50.0)	0.09	0.765	0.34	0.558	2.60	0.107
	Yes	372.6 (29.8)	504.9 (82.9)						

Results are shown as estimated marginal means (SE) obtained by GEE analyses after covarying for PON1 genotype and GFR groups. CMPAase + AREase: index of overall PON1 enzyme activity computed as z value of CMPAase (zCMPAase) + z AREase. PROOX/ANTIOX: computed as z homocysteine -

z(zCMPAase + zAREase). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001: significantly different from the other three conditions. Folic acid reference range: 2-20 mg/dL. Homocysteine levels elevated if > 12 mmol/L. ϕ GFR estimated by MDRD equation. ϵ GFR estimated by CKD-EPI equation.

Table 2: Associations between changes in folic acid, homocysteine and PON1 CMPAase and AREase enzyme activities from baseline to post-treatment: results of GEE analyses, repeated measures.

Dependent variable	Explanatory variable	B	SE	Wald	df	P
PON1 AREase*	Folic Acid	0.268	0.0571	22.02	1	<0.001
PON1 CMPAase*	Folic Acid	0.172	0.0642	7.15	1	0.008
CMPAase + AREase*	Folic Acid	0.304	0.0577	27.74	1	<0.001
CMPAase + AREase*	Homocysteine	-0.115	0.0649	3.16	1	0.075
Homocysteine	Folic Acid	-0.419	0.0857	23.98	1	<0.001

All variables are entered as z scores. * adjusted for PON1 genotypes and GFR groups. CMPAase + AREase: index of overall PON1 enzyme activity computed as z value of CMPAase (zCMPAase) + z AREase.

Table 3: Effect of folic acid treatment on hematological parameters in CKD patients.

Variables	Active Treatment	Basal	Post treatment	F	df	P
RBC (millions/uL)	No	4.55 (0.07)	4.59 (0.06)	0.440	1	0.510
	Yes	4.47 (0.07)	4.46 (0.06)	0.097		0.756
Hemoglobin (g/dL)	No	13.52 (0.19)	13.68 (0.18)	1.204	1	0.278
	Yes	13.39 (0.21)	13.30 (0.19)	0.645		0.425
MCV (fL)	No	89.69 (0.90)	90.26 (0.89)	0.751	1	0.391
	Yes	89.55 (0.64)	89.94 (0.63)	1.072		0.155
MCH (pg)	No	30.01 (0.32)	30.17 (0.32)	0.672	1	0.417
	Yes	30.27 (0.250)	30.10 (0.25)	3.825		0.055
MCHC (g/dL)	No	33.46 (0.13)	33.41 (0.13)	0.001	1	0.977
	Yes	33.79 (0.09)	33.45 (0.11)	13.744		0.001
RDW (%)*	No	14.10 (0.17)	13.98 (0.17)	0.526	1	0.472
	Yes	13.60 (0.11)	13.64 (0.11)	0.310		0.579
Hematocrit (g/U)	No	40.33 (0.56)	40.83 (0.53)	1.399	1	0.243
	Yes	39.66 (0.58)	39.82 (0.056)	0.203		0.654
Serum iron (µg/dL)	No	74.65 (3.93)	74.14 (3.76)	0.011	1	0.917
	Yes	76.80 (3.45)	70.09 (3.20)	4.169		0.045
Ferritin (ng/mL)#	No	135.46 (18.86 – 688.18)	135.65 (31.63 – 375.50)	0.354	1	0.555
	Yes	119.53 (13.74 – 369.62)	81.89 (11.39 – 437.74)	2.124		0.034
TS (%)	No	25.99 (1.46)	23.99 (1.06)	0.191	1	0.664
	Yes	26.09 (1.18)	23.84 (1.08)	5.049		0.028
TIBC (mcg/dL)	No	292.90 (6.78)	305.70 (7.53)	1.578	1	0.215
	Yes	299.12 (6.48)	299.74 (6.01)	0.027		0.870
Reticulocytes (%)	No	1.21 (0.06)	1.22 (0.06)	0.005	1	0.946
	Yes	1.32 (0.04)	1.31 (0.04)	0.037		0.849
IRF (%)	No	9.54 (0.75)	9.35 (0.69)	0.142	1	0.708

Yes	9.04 (0.55)	8.86 (0.60)	0.656	0.421
-----	-------------	-------------	-------	-------

Results are shown as estimated marginal means (SE) obtained by GEE analyses; median (maximum value - minimum value) by Friedman analyses. RBC: Red blood cell, MCV: Mean Corpuscular Volume, MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin, MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, RDW: Red Cell Distribution Width, TS: Transferrin saturation, TIBC: Total iron-binding capacity, IRF: Immature Reticulocyte Fraction. *Ln transformation. #Non-parametric data. References values: RBC= 3.9-5.0 millions/uL (women) / 4.3-5.7 millions/uL (men); Hemoglobin= 12.0-15.5 g/dL (women) / 13.5-17.5 g/dL (men); MCV= 80-100 fL; MCH= 26-34 pg; MCHC= 31-36 g/dL; RDW= 10-16%; Hematocrit= 35-45 % (women) / 38-50 % (men); Seric iron= 50-170 µg/dL (women) / 65-175 µg/dL(men); Ferritin= 5-204 ng/mL (women) / 22-275 ng/mL (men); Transferrin= 20-50 %; TIBC= 250-450 mcg/dL; Reticulocytes= 0.5-1.5 %; IRF=1.4-13%.

Table 4. Differences in baseline PON1 activity, homocysteine levels and hematological parameters between study groups based on estimated glomerular filtration rate (eGFR) cut-off values.

Variables	GFR groups			F	df	P
	G3a ^A	G3b ^B	G4 ^C			
PON1 CMPAase (U/mL)	36.5 (1.5) ^{B,C}	35.8 (1.3) ^A	31.3 (0.9) ^A	15.7	2	0.001
PON1 AREase (U/mL)	207.9 (7.0) ^{B,C}	205.0 (7.1) ^A	183.4 (5.7) ^A	10.25	2	0.006
CMPAase + AREase (z scores)	0.559 (0.115) ^{B,C}	0.468 (0.119) ^A	-0.058 (0.091) ^A	22.32	2	<0.001
Homocysteine (mmol/L)	15.54 (0.65) ^{B,C}	16.86 (0.58) ^{A,C}	20.58 (1.13) ^{A,B}	35.36	2	<0.001
PROOX/ANTIOX	-0.998 (0.184) ^{B,C}	-0.452 (0.169) ^{A,C}	0.577 (0.164) ^{A,B}	46.90	2	<0.001
RBC (millions/uL)	4.54 (0.07)	4.46 (0.10)	4.32 (0.10)	1.151	2	0.320
Hemoglobin (g/dL)	14.03 (0.22) ^{B,C}	13.03 (0.29) ^A	12.87 (0.28) ^A	4.778	2	0.010
VCM (fL)	90.89 (0.76)	88.01 (0.97)	89.45 (1.05)	2.177	2	0.118
HCM (pg)	30.91 (0.26) ^B	29.37 (0.39) ^A	29.96 (0.40)	4.254	2	0.017
CHCM (g/dL)	34.01 (0.17) ^{B,C}	33.34 (0.14) ^A	33.47 (0.81) ^A	5.932	2	0.004
RDW (%)*	13.44 (0.17) ^{B,C}	14.09 (1.36) ^A	14.09 (0.16) ^A	3.632	2	0.030
Iron (µg/dL)	86.84 (4.60) ^C	70.75 (4.34)	68.65 (4.27)	3.90	2	0.037

Ferritin (ng/mL) #	147.15 (48.98 – 533.83)	105.05 (13.74 – 503.43)	81.76 (21.18 – 497.53)	2.321	2	0.122
TS (%)	27.92 (1.53)	25.32 (1.61)	23.86 (1.50)	1.115	2	0.446
TIBC (mcg/dL)	315.18 (9.32) ^{B,C}	287.53 (7.06) ^A	285.94 (7.51) ^A	4.048	2	0.020
Reticulocytes (%)	1.24 (0.07)	1.31 (0.07)	1.48 (0.12)	1.555	2	0.216
IRF (%)	8.83 (0.85) ^C	8.92 (0.65) ^C	11.35 (0.87) ^{A,B}	3.282	2	0.041

All results of GEE analyses with the estimated marginal means (SE) after adjustment for treatment, time, PON1 genotype, age, sex and body mass index. CMPAase + AREase: index of overall PON1 enzyme activity computed as z value of CMPAase (zCMPAase) + z AREase. PROOX/ANTIOX: computed as z homocysteine - z(zCMPAase + zAREase). RBC: Red blood cell, MCV: Mean Corpuscular Volume, MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin, MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, RDW: Red Cell Distribution Width, TS: Transferrin saturation, TIBC: Total iron-binding capacity, IRF: Immature reticulocyte fraction. Stages of CKD, G3a: 33; G3b: 41; G4: 39. *Ln transformation. #Non-parametric data by Kruskal-Wallis test.

Table 5. Three-way interaction with effects of treatment, time and GFR groups on the integrated index of CMPAase + AREase activities, homocysteine levels and hematological parameters.

Variables	GFR groups	Pre-treatment	Post-treatment	P
CMPAase + AREase (z scores)	G3a	0.44 (0.23)	0.54 (0.21)	0.942
	G3b	-0.02 (0.19)	0.94 (0.19)*	0.001
	G4	-0.30 (0.17)	0.80 (0.12)*	0.001
Homocysteine (mmol/L)	G3a	15.68 (1.05)	14.20 (1.34)	0.110
	G3b	18.39 (1.44)	15.91 (0.79)	0.101
	G4	18.78 (1.25)	16.39 (1.16)	0.006
MCHC (g/dL)	G3a	34.15 (0.17)	33.63 (0.25)	0.006
	G3b	33.50 (0.17)	33.28 (0.20)	0.125
	G4	33.68 (0.14)	33.36 (0.18)	0.034
Iron (µg/dL)	G3a	91.43 (7.26)	77.75 (8.70)	0.046
	G3b	74.84 (5.69)	69.52 (4.09)	0.327
	G4	69.19 (4.62)	67.15 (5.28)	0.754
Ferritin (ng/mL) [#]	G3a	155.48 (49.92 – 369.62)	151.16 (11.39 – 437.74)	0.709
	G3b	103.29 (13.74 – 319.49)	97.02 (19.47 – 275.62)	0.093
	G4	65.70 (21.18 – 189.96)	58.26 (20.87 – 197.22)	0.032
TS (%)	G3a	27.06 (1.94)	24.30 (1.60)	0.500
	G3b	27.32 (2.22)	24.97 (1.53)	0.616
	G4	24.03 (1.81)	23.03 (2.07)	0.419

All results are shown as mean z scores (SE), all estimated marginal means obtained by GEE analyses; median (maximum value - minimum value) by Friedman analyses. MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, TS: Transferrin saturation. Stages of CKD in active treatment group, G3a: 16; G3b: 25; G4: 25, and no active treatment, G3a: 17; G3b: 16; G4: 14.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados apresentados, avaliando o perfil clínico e laboratorial dos pacientes nos diferentes estágios da DRC, supõe-se que o tratamento com 5mg/d de ácido fólico em paciente não dialíticos nos estágios 3-4 da DRC oferece uma nova abordagem para o tratamento da hiperhomocisteinemia e pode ser uma importante estratégia para melhorar o EO/EN dos pacientes e os danos associados a esse fenômeno. A intervenção com ácido fólico em um curto período de tempo foi eficaz em aumentar a atividade das enzimas antioxidantes e diminuir os níveis de biomarcadores pró-oxidantes em pacientes com DRC nos estágios G3a e G3b.

Da mesma forma, evidencia-se a importância da busca por novos biomarcadores para acompanhar a progressão da DRC. No presente estudo, a análise intergrupo mostrou que os níveis de Hci aumentaram significativamente de G3a para G3b para G4 e a atividade de PON1 diminuiu de acordo com o avanço dos estágios da doença. Com isso, defende-se a hipótese dos níveis de Hci e atividades da PON1 serem potenciais biomarcadores no auxílio do acompanhamento da progressão da DRC em pacientes pré-dialíticos.

Contudo, curiosamente o tratamento com ácido fólico reduziu o ferro sérico, MCHC, ferritina e TS nos estágios inicial e moderado da DRC. Entretanto, essas alterações não resultaram em mudanças significativas nas condições clínicas dos pacientes, uma vez que os níveis dos parâmetros hematológicos não indicaram quadro de anemia, estudos adicionais neste campo são necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H.E. Catalase *in vitro*. in: PACKER, Lester. **Methods Enzymol.**, v.105, p.121-126, 1984.
- AHMADI, F.; ABBASZADEH, M.; RAZEGHI, M.; MAZIAR, S.; KHOIDAKI, S. D.; NAJAFI, M. L. Effectiveness of N-acetylcysteine for preserving residual renal function in patients undergoing maintenance hemodialysis: multicenter randomized clinical trial. **Japanese Society of Nephrology**. 2016.
- ANDERSON M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymol.**, v. 113, p. 548-555. 1985.
- BASTOS, A.S, *et al.* Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. **Anal. Chem.**, v. 423, n. 1, p.141-146, 2012.
- BENEDETTI, T.R.B.; ANTUNES, P.C.; RODRIGUEZ-AÑEZ, C.R.; MAZO, G.Z.; PETROSKI, E.L. Reproducibility and validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) in elderly men. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 13, n. 1, 2007.
- BERK, M.; MALHI, G.S.; GRAY, L.J.; DEAN, O.M. I. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 34, n. 3, p. 167-176, 2013.
- BIKBOV B, PURCELL CA, LEVEY AS, SMITH M, ABDOLI A, ABEBE M, *et al.* Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**, v.395, p. 709–33. 2020.
- BJORK, J.; NYMAN, U.; BERG, U.; *et al.* Validation of standardized creatinine and cystatin C GFR estimating equations in a large multicentre European cohort of children. **Pediatr. Nephrol.**, v. 34, p:1087–1098. 2019.
- BOSSOLA, M.; TAZZA, L. Wishful thinking: the surprisingly sparse evidence for a relationship between oxidative stress and cardiovascular disease in hemodialysis patients. **Semin. Dial.** v. 28, p. 224–230. 2015.
- CACHOFEIRO, V.; GOICOCHEA, M.; DE VINUESA, S.G.; OUBIÑA, P.; LAHERA, V.; LUÑO, J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. **Kidney Int.**, v. 111, supplement, p S4–S9, 2008.
- CHAO, M.C.; *et al.* Serum homocysteine level is positively associated with chronic kidney disease in a Taiwan Chinese population. **J. Nephrol.**, v. 27, p. 299–305, 2014.
- CHISTIAKOV, D.A.; MELNICHENKO, A.A.; OREKHOV, A.N.; BOBRYSEV, Y.V. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. **Biochimie**. v.132, p. 19–27. 2017.
- CHOUMENKOVITCH, S.F.; JACQUES, P.F.; NADEAU, M.R.; WILSON, P.W.; ROSENBERG, I.H.; SELHUB. J.: Folic acid fortification increases red blood cell folate concentrations in the Framingham study. **J. Nutr.**, v. 131, p. 3277– 3280, 2001.
- CLOSA, D.; FOLCH-PUY, E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. **IUBMB Life**, v. 56, n. 4, p. 185–191, 2004.

- DAN, K.; MIYOSHI, T.; NAKAHAMA, M.; et al. Impact of Chronic Kidney Disease on Cardiovascular and Renal Events in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention with Everolimus-Eluting Stent: Risk Stratification with C-Reactive Protein. **Cardiorenal Med.**, v.8, p. 151–159. 2018.
- DELFINO, C.D.A.; VIANNA, A.C.A.; MOCELIN, A.J.; BARBOSA, D.S.; MISE, R.A.; MATSUO, T. Folic acid therapy reduces plasma homocysteine levels and improves plasma antioxidant capacity in hemodialysis patients. **Nutrition**, v. 23, p.242–247. 2007.
- DI MEO, S.; REED, T.T.; VENDITTI, P.; VICTOR, V.M. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. **Oxidative Med. Cell. Longev.**p. 1–44. 2016.
- DOUNOUSHI, E.; PAPAVALIOU, E.; MAKEDOU, A.; et al. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 48, n. 5, p. 752–760, 2006.
- DUNI, A., LIAKOPOULOS, V., RAPSOMANIKIS, K. P., AND DOUNOUSHI, E. Chronic kidney disease and disproportionately increased cardiovascular damage: does oxidative stress explain the burden? **Oxid. Med. Cell. Longev.** 2017.
- ENE-IORDACHE, B.; PERICO, N.; BIKBOV, B.; CARMINATI, S.; REMUZZI, A.; PERNA, A.; et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk in six regions of the world (ISN-KDDC): a cross-sectional study. **Lancet Glob Health**, v. 4, n. 5, p. 307-19. 2016.
- FISCHBACH, F.T.; DUNNING, M.B. (eds). **Vitamins in human nutrition**. In: A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2008: 1193
- FLECHA, B. G.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radic. Biol. Med.**, v.10, n. 2, p.93-100, 1991.
- FREITAS, M. *et al.* Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. **Clin. Biochem.**, v.41, n.7-8, p.570-575, 2008.
- FROISSART, M.; ROSSERT, J.; JACQUOT, C.; PAILLARD, M.; HOUILLIER, P. Predictive performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations for estimating renal function. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 16, p. 763–773, 2005.
- FURLONG, C.E.; MARSILLACH, J.; JARVIK, G.P.; COSTA, L.G. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their Functions? **Chem. Biol. Interact.** 2016, 259, 51–62.
- GABRIEL, I.C.; NISHIDA, S.K.; KIRSZTAJN, G.M. Cistatina C sérica: uma alternativa prática para avaliação de função renal? **Braz. J. Nephrol**, v. 33, n. 2, 2011.
- GARCIA, L.M.T.; OSTI, R.F.I.; RIBEIRO, E.H.C.; FLORINDO, A.A. Validação de dois questionários para a avaliação da atividade física em adultos. **Rev. Bras. Ativ. Fis. e Saúde.** 2013;18(3):317-318.
- GUPTA, J.; Mitra, N.; Kanetsky, P.A.; Devaney, J. Wing, M.R.; *et al.* Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 7, p. 1938-46, 2012.

- HANDELMAN, G.J. Evaluation of oxidant stress in dialysis patients. **Blood Purif.** v. 18, p. 343–349. 2000.
- HOUSE, A.A., ELIASZIW, M., CATTRAN, D.C., et al. Effect of B-vitamin therapy on progression of diabetic nephropathy: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 303, n. 16, p. 1603-1609, 2010.
- HUSAIN-SYED, F., MCCULLOUGH, P. A., BIRK, H. W., RENKER, M., BROCCA, A., SEEGER, W., et al. Cardio-Pulmonary-Renal interactions: a multidisciplinary approach. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 65, p. 2433–2448. 2015.
- HU, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN and Simon MI (eds). **Methods Enzymol.** California: Academic Press, p.380-382, 1994.
- JIANG, Z.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–9. 1992.
- JOSHI, R.; ADHIKARI, S.; PATRO, B.S.; CHATTOPADHYAY, S.; MUKHERJEE, T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, p:1390–1399. 2001.
- KIRSZTAJN, G.M.; SALGADO FILHO, N.; DRAIBE, S.A.; DE PÁDUA NETTO, M.V.; THOMÉ, F.S.; SOUZA, E.; BASTOS, M.G. Leitura rápida do KDIGO 2012: Diretrizes para avaliação e manuseio da doença renal crônica na prática clínica. **J. Bras. Nefrol.**, v. 36, n. 1, p:63-73, 2014.
- KENNEDY, D. J.; TANG, W. H. W.; FAN, Y.; WU Y.; MANN, S.; PEPOY, M.; HAZEN, S. L. Diminished Antioxidant Activity of High-Density Lipoprotein– Associated Proteins Chronic Kidney Disease. **J. Am. Heart Assoc.**, p. 1-7, 2013.
- LA DU, B.N.; AVIRAM, M.; BILLECKE, S.; NAVAB, M.; PRIMO-PARMO, S.; SORENSON, R.C.; STANDIFORD, T.J. On the physiological role(s) of the paraoxonases. **Chem. Biol. Interact.**, v. 119, n.120, p: 379–388. 1999.
- LEVEY, A.S.; BOSCH, J.P.; LEWIS, J.B.; GREENE, T.; ROGERS, N.; ROTH, D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. **Ann. Intern. Med.**, v. 130, n. 6, pp 461-70, 1999.
- LEVEY, A.S.; STEVENS, L.A.; SCHMID, C.H.; ZHANG, Y.L.; CASTRO, A.F.; FELDMAN, H.I.; KUSEK, J.W, EGGERS, P.; VAN, L.F.; GREENE, T.; CORESH, J. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Ann. Intern. Med.**, v. 150, p. 604 – 612, 2009.
- LEVI, A.; COHEN, E.; LEVI, M.; GOLDBERG, E.; GARTY, M.; KRAUSE, I. Elevated serum homocysteine is a predictor of accelerated decline in renal function and chronic kidney disease: A historical prospective study. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 25, p. 951–955. 2014.
- LEWIS D, HAYNES R, LANDRAY M. Lipids in chronic kidney disease. **J. Ren. Care**, v. 36, p:27–33. 2010.
- LIAKOPOULOS V, ROUMELIOTIS S, BOZIKAS A, ELEFThERIADIS T, DOUNOUSI E. Antioxidant Supplementation in Renal Replacement Therapy Patients: Is There Evidence?

Oxidative Medicine and Cellular Longevity, p. 1-23. 2019.

LIN, CHEN L, MUH RW, LI PL: Hyperhomocysteinemia associated with decreased renal transsulfuration activity in Dahl S rats. **Hypertension**. v. 47, p. 1094–1100. 2006.

LIYANAGE, T.; NINOMIYA, T.; JHA, V.; NEAL, B.; PATRICE, H;M.; OKPECHI, I.; et al. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. **Lancet**, v. 385, n. 9981, p. 1975-82. 2015.

LONN, E.; *et al.* Homocysteine Lowering with Folic Acid and B Vitamins in Vascular Disease. **N. Engl. J. Med.**, 2006.

MALOUF M, GRIMLEY EJ, AREOSA SA: Folic acid with or without vitamin B12 for cognition and dementia. **Cochrane Database Syst. Rev.** 4:CD004514, 2003.

MALTA, D.C.; MACHADO, I.E.; PEREIRA, C.A.; FIGUEIREDO, A.W.; AGUIAR, L.K.; ALMEIDA, W.S.; et al. Avaliação da função renal na população adulta brasileira, segundo critérios laboratoriais da Pesquisa Nacional de Saúde. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 22, Supl 2, p. E190010. 2019.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide dismutase anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur. Journal of Biochem.**, v. 47 p. 469-471, 1974.

MATTSON, M.P.; SHEA, T.B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends Neurosci**, v. 26, p. 137–46, 2003.

MANOLESCU, B.N.; OPREA, E.; FARCASANU, I.C.; BERTEANU, M.; CERCASOV, C. Homocysteine and vitamin therapy in stroke prevention and treatment: a review. **Acta Biochim. Pol.**, v. 57, n. 4, p. 467–477. 2010.

MARTINELLI, N.; CONSOLI, L.; GIRELLI, D.; GRISON, E.; CORROCHER, R.; OLIVIERI, O. Paraoxonases: Ancient substrate hunters and their evolving role in ischemic heart disease. **Adv. Clin. Chem.**, v. 59, p. 65–100. 2013.

MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Paraoxonase 1 in neurological disorders. **Redox Rep.**, v. 19, n. 2, p. 49-58. 2014.

MILJKOVIC, M.; STEFANOVIC, A.; VEKIC, J.; ZELJKOVIC, A.; GOJKOVIC, T.; SIMIC-OGRIZOVIC, S.; BOGAVAC-STANOJEVIC, N.; CERNE, D.; ILIC, J.; STEFANOVIC, I.; JELIC-IVANOVIC, J.; SPASOJEVIC-KALIMANOVSKA, V.; KOTUR-STEVLJEVIC, J. Activity of paraoxonase 1 (PON1) on HDL2 and HDL3 subclasses in renal disease. **Clin. Biochem.**, v. 60, p. 52-58. 2018.

MOYA, C.; MÁÑEZ, S. Paraoxonases: metabolic role and pharmacological projection. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol**, v. 391, n. 4, p. 349-359. 2018.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clin. Chem.**, v. 44, p.679-681, 1998.

NELEN, W.D.M.; BLOM, H.J.; STEEGER, E.A.P.; HEIJER M.D.; THOMAS, C.M.G.; ESKEES, T.K.A.B. Homocysteine and Folate Levels as Risk Factors for Recurrent Early Pregnancy Loss. **The Netherlands**, v. 95, 2000.

- NEUEN, N. B.; CHADBAN, S. J.; DEMAIIO, A. R.; JOHNSON, D. W.; PERKOVIC, V.; Chronic kidney disease and the global NCDs agenda. *BMJ Global Health*. 2017.
- NEVES, L.B.; MACEDO, D.M.; LOPES, A.C. Homocysteine. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 40, n. 5, p. 311-20, 2004.
- OIKONOMIDI A, LEWCZUK P, KORNHUBER J, SMULDERS Y, LINNEBANK M, SEMMLER A, POPP J. Homocysteine metabolism is associated with cerebrospinal fluid levels of soluble amyloid precursor protein and amyloid beta. *J. Neurochem.*, v. 139, v. 2, p. 324-332, 2016.
- PERNA, A.; INGROSSO, D. Homocysteine and chronic kidney disease: an ongoing narrative. *J. Nephrol.*, v. 32, p. 673–675, 2009.
- RACEK, J., RUSNAKOVA, H., TREFIL, L., SIALA, K.K. The influence of folate and antioxidants on homocysteine levels and oxidative stress in patients with hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia. *Physiol. Res.*, v. 54, p. 87–95, 2005.
- REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin. Chim. Acta.*, v.255, p.107-117, 1996.
- RICHTER, R. J.; JARVINK, G.P.; FURLONG, C.E. Determination of paraoxonase status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, v. 1, p.147-152, 2008.
- ROVIN, B.H.; CASTER, D.J.; CATTRAN, D.C.; GIBSON, K.L.; HOGAN, J.J.; MOELLER, M.; ROCCATELLO, D.; CHEUNG, M.; WHEELER, D.C.; WINKELMAYER, W.C.; FLOEGE, J. Management and treatment of glomerular diseases (part 2): conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.*, v. 95, n. 2, p. 281-295, 2019.
- SAMOUILIDOU E, KOSTOPOULOS V, LIAOURI A, KIOUSSI E, VASSILIOU K, BOUNTOU E, GRAPSA E. Association of lipid profile with serum PON1 concentration in patients with chronic kidney disease. *Renal Failure*, v. 38, n. 10, p:1601-1606, 2016.
- SAMOUILIDOU, E.; BOUNTOU, E.; PAPANDROULAKI, F.; PAPAMANOLIS, M.; PPAKOSTAS, D.; GRAPSA, E. Serum Endocan Levels are Associated With Paraoxonase 1 Concentration in Patients With Chronic Kidney Disease. *Ther. Apher. Dial.*; n. 22, v. 4, p. 325–331. 2018.
- SANTOS EJ; HORTEGAL EV, SERRA HO, LAGES JS, SALGADO-FILHO N, DOS SANTOS, AM. Epoetin alfa resistance in hemodialysis patients with chronic kidney disease: a longitudinal study. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 51, n .7, 2018.
- SCHAEFER RM, KOSCH M, TESCHNER M: Folate metabolism in renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v. 17, n. 5, p. 24–27, 2002.
- SESSO, R.C.; LOPES, A.A.; THOMÉ, F.S.; LUGON, J.R.; MARTINS, C.T. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2014. *J. Bras. Nefrol.*, v. 38, n. 1, 2016.
- SHASTRY S, INGRAM AJ, SCHOLEY JW, JAMES LR: Homocysteine induces mesangial cell apoptosis via activation of p38-mitogen-activated protein kinase. *Kidney Int.*, v. 71, p. 304–311, 2007.

SHEVCHUK, S.V.; KATERYNA, P.P.; IRYNA, A.I.; HALYNA, V.B.; BEZSMERTNYI, Y.O.; KURYLENKO, I.V.; BILOSHYTSKA, A.V, BARANOVA, I.V. The relationship between homocysteine level and vitamins B12, B9 and B6 status in patients with chronic kidney disease. **Wiadomości Lekarskie**, v. 72, n. 4. 2019.

SIES, H. *et al.* Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBES Lett.**, v.103, p.287-290, 1979.

SILVERBERG, D.S.; WEXLER, D.; IAINA, A.; SCHWARTZ, D. Correction of iron deficiency in the cardiorenal syndrome. **Int. J. Nephrol.**, p. 365301. 2011

STĘPNIEWSKA, J. *et al.* Oxidative Stress and Antioxidative Enzyme Activities in Chronic Kidney Disease and Different Types of Renal Replacement Therapy. **Curr. Protein Pept. Sci.** v. 16, 2015.

SURESHBABU A, RYTER SW, CHOI ME. Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury. **Redox Biol.**, v. 4, p. 208–214, 2015.

TBAHRITI, H. F.; KADDOUS, A.; BOUCHENAK, M.; MEKKI, K. Effect of Different Stages of Chronic Kidney Disease and Renal Replacement Therapies on Oxidant-Antioxidant Balance in Uremic Patients. **Hindawi Publishing Corporation**. 2013.

TIETZE F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem.** v. 27, n. 3, p. 502-522. 1969.

TYAGI N, SEDORIS KC, STEED M, OVECHKIN AV, MOSHAL KS, TYAGI SC: Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 289, p. H2649–H2656. 2005.

WITKO-SARSAT, *et al.* Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int.**, v. 49, p.1304-1313, 1996.

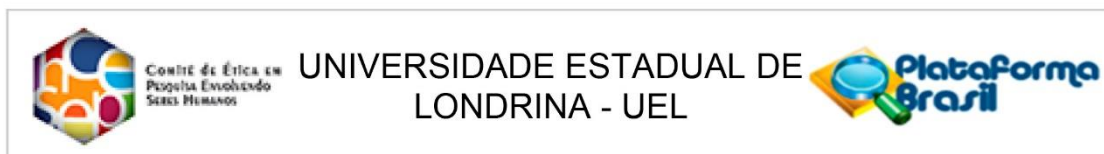
YUAN, J.; ZOU, X.; HAN, S.; CHENG, H.; WANG, L.; WANG, J.; ZHANG, L.; ZHAO, M.; WANG, X. Prevalence and risk factors for cardiovascular disease among chronic kidney disease patients: results from the Chinese cohort study of chronic kidney disease (C-STRIDE). **BMC Nephrology**.v. 18, n. 23. 2017.

XIE, D. *et al.* Hyperhomocysteinemia predicts renal function decline: a prospective study in hypertensive adults. **Sci. Rep.** 2015.

WAN, C.; SU, H.; ZHANG. C. Role of NADPH Oxidase in Metabolic Disease-Related Renal Injury: An Update. **Oxid. Med. Cell. Longev.** 2016.

WEISS; G. Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease. **Blood Rev.**, v. 16, p. 87-96. 2002.

ANEXOS

ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Ensaio clínico com n-acetilcisteína associada ao ácido fólico em pacientes com doença renal crônica no estágio pré-dialítico: análise de biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo e avaliação in vitro do potencial antioxidante de medicamentos comumente utilizados nesta.

Pesquisador: ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO

Área Temática:

Versão: 3

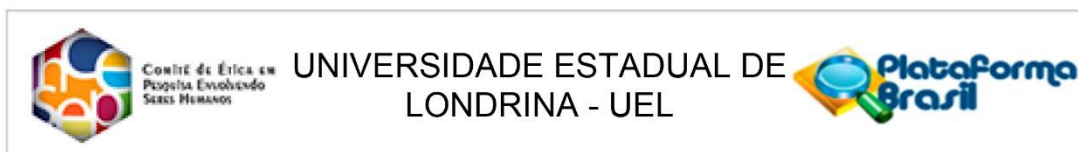
CAAE: 63097216.1.0000.5231

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.047.918



Continuação do Parecer: 2.047.918

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_819385.pdf	03/05/2017 17:01:42		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_consentimento_tratamento.docx	03/05/2017 17:00:07	ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_consentimento_controles.docx	03/05/2017 16:56:38	ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_ANDRESSA_KEIKO_MATSUMOTO.docx	20/03/2017 12:02:50	ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO	Aceito
Outros	Termo_de_Sigilo_e_confidencialidade.pdf	16/12/2016 12:05:27	ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_Andressa_Keiko_Matsumoto.pdf	16/12/2016 11:42:49	ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	16/12/2016 11:38:25	ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br

APÊNDICES

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO GRUPO INTERVENÇÃO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

“Análise de biomarcadores inflamatórios, bioquímicos e de estresse oxidativo em pacientes com a doença renal crônica (DRC) em diferentes estágios da filtração glomerular”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (la) a participar da pesquisa “Ensaio clínico com n-acetilcisteína associada ao ácido fólico em pacientes com doença renal crônica no estágio pré-dialítico: análise de biomarcadores de estresse oxidativo e inflamatórios e avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de medicamentos comumente utilizados”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 63097216.1.0000.5231), realizada no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é avaliar a intervenção terapêutica com ácido fólico e n-acetilcisteína em pacientes com DRC nos estágios 3a, 3b e 4 segundo a Fundação Nacional do Rim, quantificando marcadores bioquímicos, de estresse oxidativo e inflamatórios buscando correlacionar os resultados encontrados com a progressão da doença assim como também em pacientes sem essa intervenção. A sua participação é muito importante e ela se daria pela doação de 45 mL de sangue por punção venosa (15mL de sangue com EDTA, 25mL de soro e 5mL de sangue com fluoreto) em uma única etapa, em apenas um momento, sendo todos os materiais usados descartáveis. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas para fins desta e de outras pesquisas que, eventualmente, poderão ser realizadas utilizando-se o banco de dados/amostras obtidas neste trabalho, e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Esperamos que essa pesquisa permita verificar se os marcadores bioquímicos, de estresse oxidativo e inflamatórios propostos são interessantes para averiguar se há algum destes que possa contribuir no acompanhamento, terapêutica e na redução da progressão da DRC.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação nesta.

Os benefícios esperados são que de acordo com os resultados obtidos, uma nova abordagem terapêutica para a DRC poderá ser desenvolvida. Quanto aos riscos, nenhum dos procedimentos utilizados constitui risco direto para a integridade física ou moral dos participantes. Entretanto, em alguns pacientes mais sensíveis pode ocorrer certo desconforto no momento da coleta de sangue como a lipotimia, que é uma sensação de mal estar levando a pessoa a um estado de quase desmaio. Nesta situação, a equipe de coleta que está treinada para esta intercorrência, prontamente prestará atendimento adequado.

Asseguramos a todos os participantes ao final do estudo, acesso gratuito em um período equivalente a três meses de tratamento, aos melhores métodos profiláticos, diagnósticos e terapêuticos que se demonstraram eficazes.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos, pode nos contatar: professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa ((43) 3371-2451), Farmacêutico Andressa Keiko Matsumoto ((43) 9601-6344), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa

Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 20__.

Rubrica pesquisador

Décio Sabbatini Barbosa

(RG: 13.163.452 SSP-SP)

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Retorno: _____

Telefone para contato: _____

APÊNDICE B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO GRUPO CONTROLE

Termo de consentimento livre e esclarecido

“Análise de biomarcadores inflamatórios, bioquímicos e de estresse oxidativo em pacientes com a doença renal crônica (DRC) em diferentes estágios da filtração glomerular”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(la) a participar da pesquisa “Ensaio clínico com n-acetilcisteína associada ao ácido fólico em pacientes com doença renal crônica no estágio pré-dialítico: análise de biomarcadores de estresse oxidativo e inflamatórios e avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de medicamentos comumente utilizados”, realizada no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é avaliar a intervenção terapêutica com ácido fólico e n-acetilcisteína em pacientes com DRC nos estágios 3a, 3b e 4 segundo a Fundação Nacional do Rim, quantificando marcadores bioquímicos, de estresse oxidativo e inflamatórios buscando correlacionar os resultados encontrados com a progressão da doença assim como também em pacientes sem essa intervenção. A sua participação é muito importante, pois precisamos de indivíduos sem a doença, para nos guiar como parâmetro, constituindo o que chamamos de **grupo controle**, e isso se daria pela doação de 45 mL de sangue por punção venosa (15mL de sangue com EDTA, 25mL de soro e 5mL de sangue com fluoreto) em uma única etapa, em apenas um momento, sendo todos os materiais usados descartáveis. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Se houver qualquer desconforto durante ou após a coleta, nossa equipe está preparada para atendê-lo da melhor forma possível. Informamos ainda que as informações serão utilizadas para fins desta e de outras pesquisas que, eventualmente, poderão ser realizadas utilizando-se o banco de dados/amstras obtidas neste trabalho, e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Esperamos que essa pesquisa permita verificar se os marcadores bioquímicos, de estresse oxidativo e inflamatórios propostos são interessantes para averiguar se há algum destes que possa contribuir na prevenção, acompanhamento e terapêutica na DRC.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação nesta.

Os benefícios esperados são que de acordo com os resultados obtidos, uma nova abordagem terapêutica para a DRC poderá ser desenvolvida. Quanto aos riscos, nenhum dos procedimentos utilizados constitui risco direto para a integridade física ou moral dos participantes. Entretanto, em alguns pacientes mais sensíveis pode ocorrer certo desconforto no momento da coleta de sangue como a lipotimia, que é uma sensação de mal estar levando a pessoa a um estado de quase

desmaio. Nesta situação, a equipe de coleta que está treinada para esta intercorrência, prontamente prestará atendimento adequado.

Asseguramos a todos os participantes ao final do estudo, acesso gratuito em um período equivalente a três meses de tratamento, aos melhores métodos profiláticos, diagnósticos e terapêuticos que se demonstraram eficazes.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos, pode nos contatar: professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa ((43) 3371-2451), Farmacêutico Andressa Keiko Matsumoto ((43) 9601-6344), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 20__.

Rubrica pesquisador

Décio Sabbatini Barbosa

(RG: 13.163.452 SSP-SP)

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Retorno: _____

Telefone para contato: _____

APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – IPAQ

IPAQ– International Physical Activity Questionnaire – versão 6

Nós queremos saber quanto tempo você gasta fazendo atividade física em uma semana NORMAL. Por favor responda cada questão *mesmo* que considere que não seja ativo. Para responder considere as atividades comomeio de transporte, no trabalho, exercício e esporte.

IPAQ1a - Em quantos dias de uma semana normal, você realiza atividades LEVES ou MODERADAS por pelo menos 10 minutos, que façam você suar POUCO ou aumentem LEVEMENTE sua respiração ou batimentos do coração, como nadar, pedalar ou varrer:

IPAQ1b - Nos dias em que você faz este tipo de atividade, quanto tempo você gasta fazendo essas atividades POR DIA no total, em minutos?

IPAQ2a – Em quantos dias da última semana, você realizou atividades VIGOROSAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar MUITO sua respiração ou batimentos do coração.

IPAQ2b - Nos dias em que você faz essas atividades por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total, em minutos, você gastou?

II - ATIVIDADE FÍSICA NO TRABALHO

IPAQII.1a. Atualmente você trabalha ou faz trabalho voluntário fora de sua casa?

0 – Não

1 – Sim

IPAQII.1b. Quantos dias de uma semana normal você trabalha?

Durante um dia normal de trabalho, quanto tempo você gasta, em minutos:

IPACII.1c . Andando rápido

IPACII.1d. Fazendo atividades de esforço moderado como subir escadas ou carregar pesos leves

IPACII.1e. Fazendo atividades vigorosas como trabalho de construção pesada ou trabalhar com enxada, escavar

ATIVIDADE FÍSICA EM CASA

Agora, pensando em todas as atividades que você tem feito *em casa* durante uma semana normal:

IPACII.2a . Em quantos dias de uma semana normal você faz atividades dentro da sua casa por pelo menos 10 minutos de esforço moderado como aspirar, varrer ou esfregar:

IPAQII.2b. Nos dias que você faz este tipo de atividades quanto tempo você gasta fazendo essas atividades POR DIA, em minutos?

IPAQII.2c. Em quantos dias de uma semana normal você faz atividades no jardim ou quintal por pelo menos 10 minutos de esforço *moderado* como varrer, rastelar, podar:

IPAQII.2d. Nos dias que você faz este tipo de atividades quanto tempo você gasta POR DIA, em minutos?

IPAQII.2e. Em quantos dias de uma semana normal você faz atividades no jardim ou quintal por pelo menos 10 minutos de esforço vigoroso ou forte como carpir, arar, lavar o quintal:

IPAQII.2f. Nos dias que você faz este tipo de atividades quanto tempo você gasta POR DIA, em minutos?

ATIVIDADE FÍSICA COMO MEIO DE TRANSPORTE

Agora pense em relação a caminhar ou pedalar para ir de um lugar a outro em uma semana normal.

IPAQ.3a. Em quantos dias de uma semana normal você caminha de forma rápida por pelo menos 10 minutos para ir de um lugar para outro? (Não inclua as caminhadas por prazer ou exercício)

IPAQ.3b. Nos dias que você caminha para ir de um lugar para outro quanto tempo POR DIA você gasta caminhando? (Não inclua as caminhadas por prazer ou exercício)

IPAQ.3c. Em quantos dias de uma semana normal você pedala rápido por pelo menos 10 minutos para ir de um lugar para outro? (Não inclua o pedalar por prazer ou exercício)

IPAQ.3d. Nos dias que você pedala para ir de um lugar para outro quanto tempo POR DIA você gasta pedalando? (Não inclua o pedalar por prazer ou exercício)