



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA MICHELIN

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO EM PACIENTES
COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM DIFERENTES
ESTÁGIOS DE PRÉ-DIÁLISE**

Londrina
2019

ANA PAULA MICHELIN

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO EM PACIENTES
COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM DIFERENTES
ESTÁGIOS PRÉ-DIÁLISE**

Dissertação de mestrado apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa

Londrina
2019

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

Michelin, Ana Paula.

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE PRÉ-DIÁLISE / Ana Paula Michelin. - Londrina, 2019.
68 f. : il.

Orientador: Décio Sabbatini Barbosa.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, , 2019.

Inclui bibliografia.

1. Estresse Oxidativo - Tese. 2. Doença Renal Crônica - Tese. 3. Antioxidantes - Tese. 4. Radicais Livres - Tese. I. Sabbatini Barbosa, Décio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. . III. Título.

ANA PAULA MICHELIN

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO/NITROSATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL
CRÔNICA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE PRÉ-DIÁLISE**

Dissertação de mestrado apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Vinícius Álvares Daher Delfino
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Danielle Venturini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de junho de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais, Edvaldo e Marizi, que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pois, sem ele nada faria sentido.

Agradeço a toda minha família, por compreenderem minhas faltas em almoços, aniversários e feriados, principalmente aos meus pais, Marizi e Edvado, meu irmão Danilo e minha cunhada Adriana.

Aos amigos do Laboratório de Pós Graduação: Chiara, Kamila, Luciana, Carine, Vitor, Francis, Karine, André e Alissana, por sempre me ajudarem e compartilharem o conhecimento, não chegaria aqui sem a paciência e o ensinamento de cada um de vocês.

Gostaria de agradecer aos meus amigos, de Londrina e de Novo Itacolomi, por deixarem o peso dos estudos mais leve todos esses anos.

Agradeço ao meu orientador prof. Décio Sabbatini Barbosa, pela oportunidade de expandir meus conhecimentos como sua aluna de iniciação científica e poder continuar a caminhada como sua aluna de Mestrado.

Agradeço aos membros da Banca Examinadora por participarem desta etapa tão importante da minha formação.

Agradeço a Prof. Maria Emília, a Prof. Estefânia e a Prof. Rúbia, por estarem sempre dispostas a ajudar todos esses anos.

Agradeço a Laura, Kamila, Denise e ao Mariano por toda a atenção e amizade.

Gostaria de agradecer a minha amiga e colega de laboratório Andressa Keiko, com quem trabalhei lado a lado nos ambulatórios, salas de coleta e execução das técnicas. Sem nosso esforço mútuo, este trabalho não seria possível.

“Não existe um caminho para a felicidade.
A felicidade é o caminho”
(Mahatma Gandhi)

MICHELIN, Ana Paula. **Avaliação de Biomarcadores Bioquímicos e de Estresse Oxidativo/Nitrosativo em Pacientes com Doença Renal Crônica em Diferentes Estágios Pré-dialise**. 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é representada por um grupo de condições heterogêneas que afetam a estrutura e função dos rins. O estresse oxidativo/nitrosativo (EO/EN) é um desequilíbrio entre compostos antioxidantes e pró-oxidantes, sendo que este último pode causar danos irreversíveis à proteínas, lipídeos, DNA e, conseqüentemente, podendo contribuir para o aparecimento da DRC. Sabendo da importância deste processo na fisiologia da DRC, o objetivo deste estudo foi mensurar níveis de biomarcadores de EO/EN e parâmetros bioquímicos em pacientes em estágios pré-dialíticos, comparando-os entre si e entre indivíduos saudáveis com a finalidade de verificar o quanto a DRC altera estes biomarcadores bem como repercute em resultados laboratoriais de rotina. Para atingir este objetivo foi realizado um estudo controlado com amostra de 88 pacientes com DRC distribuídos em três grupos, de acordo com a classificação da sua taxa de filtração glomerular (TFG) 3a, 3b e 4 e comparados entre si e com um grupo controle formado por indivíduos que não possuem a doença. Foram realizadas análises bioquímicas de ácido úrico, creatinina, proteínas totais, glicose, homocisteína, perfil lipídico, PCR, AST e ALT e EO/EN biomarcadores SOD, CAT, PON, GT, GSH, GSSG, NOx, LOOH, SH e AOPP. A análise estatística foi realizada com o programa SPSS *Statistic*® 20 (IBM, Armonk, NY, EUA). As variáveis foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) complementada com teste de Tukey ou Dunnett T3 ou por Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn. Também foi realizada uma análise GLM multivariada (MANOVA) e uma curva característica de operação do receptor (ROC). O resultado de maior relevância deste estudo foi em relação aos níveis de AOPP, que apresentaram-se aumentados conforme a progressão da doença entre os estágios, bem como quando comparado aos indivíduos saudáveis. Ao comparar os estágios 3a, 3b e 4 da DRC com indivíduos saudáveis, observou-se também um aumento significativo nos biomarcadores antioxidantes SOD, GT e GSH, bem como um aumento nos níveis do biomarcador pró-oxidativo NOx. Em relação aos parâmetros bioquímicos, os estágios 3a, 3b e 4 apresentaram valores significativamente aumentados nos níveis de glicose, triglicérides, ácido úrico, creatinina, TFG e homocisteína, quando comparados a indivíduos saudáveis. Apenas os níveis de colesterol total e LDL apresentaram-se diminuídos quando comparados ao grupo controle, sendo esse resultado justificado pelo fato dos pacientes fazerem uso de estatinas, e o grupo controle não. Com os resultados foi possível concluir que existem diferenças entre os estágios da doença em relação ao grupo controle tanto no EO/EN como nos biomarcadores bioquímicos, e em relação ao EO/EN a AOPP foi o marcador que obteve melhores resultados. Novos estudos deverão ser realizados para a comprovação da utilização do biomarcador AOPP como ferramenta no acompanhamento da evolução da DRC.

Palavras-chave: Doença renal crônica. Pré-dialise. Estresse oxidativo/nitrosativo. Produtos avançados de oxidação proteica .

MICHELIN, Ana Paula. **Evaluation of Biochemical Biomarkers and Oxidative / Nitrosative Stress in Patients with Chronic Renal Disease in Different Pre-Dialysis Stages**. 2019. 55 p. Dissertation (Master's degree in Health Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is composed of a group of heterogeneous conditions that affect the structure and function of the kidneys. Oxidative / nitrosative stress (OS/NS) is an imbalance between antioxidant and pro-oxidant compounds, and the latter can cause irreversible damage to proteins, lipids, DNA and, consequently, leading to various diseases such as CKD. Knowing the importance of this process in CKD, the objective of this study was to measure levels of OS/NS biomarkers and biochemical parameters in predialytic stages, comparing them to each other and among healthy individuals in order to verify how much CKD changes these biomarkers as well as repercussions on routine laboratory results. To achieve this goal, a controlled study was conducted with a sample of 88 patients with CKD allocated to three groups according to the classification of their glomerular filtration rate (GFR) 3a, 3b and 4 and compared to each other and to a control group formed by healthy individuals. Biochemical analyzes of uric acid, creatinine, total proteins, glucose, homocysteine, lipid profile, PCR, AST and ALT and OS / NS biomarkers SOD, CAT, PON, GT, GSH, GSSG, NOx, LOOH, SH and AOPP were performed. Data and statistical management were performed with SPSS Statistic® 20 (IBM, Armonk, NY, USA). The variables were evaluated by analysis of variance (ANOVA) complemented with the Tukey or Dunnett T3 test or by Kruskal-Wallis complemented with the Dunn test. A multivariate GLM analysis was also performed (MANOVA and a receiver operating characteristic curve (ROC)). The most relevant result of this study was related to AOPP levels, which were increased according to the progression of the disease between the stages, as well as when compared to the healthy individuals. When comparing stages 3a, 3b and 4 of CKD with healthy subjects, a significant increase was also observed in the antioxidant biomarkers SOD, GT and GSH, as well as an increase in the levels of the pro-oxidative biomarker NOx. Regarding the biochemical parameters, stages 3a, 3b and 4 presented significantly increased levels of glucose, triglycerides, uric acid, creatinine, GFR and homocysteine when compared to healthy individuals. Only the total and LDL cholesterol levels were decreased when compared to the control group, and this result is justified by the fact that patients use statins, and the control group did not. With the results it was possible to conclude that there are differences between the stages of the disease in relation to the control group in both the EO / EN and the biochemical biomarkers, and in relation to the OS/NS the AOPP was the marker that obtained better results. Further studies should be performed to prove the use of the AOPP biomarker as a tool in monitoring the evolution of CKD.

Keywords: Chronic kidney disease. Pre-dialysis. Oxidative/nitrosative stress. AOPP.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Categorias da taxa de filtração glomerular (TFG) na doença renal crônica (DRC)	16
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação Esquemática do Ciclo Catalítico da Glutathione	21
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AOPP	Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CL-LOOH	Hidroperóxidos por Quimiluminescência
DRC	Doença Renal Crônica
DTNB	5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico
EN	Estresse Nitrosativo
EO	Estresse Oxidativo
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
g force	Força G
GLM	Multivariate General Linear
GOx	Glutaciona Oxidase
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSG	Glutaciona Oxidada
GT	Glutaciona Total
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcome s- CKD Evaluation and Management</i>
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
NOx	Metabólitos do Óxido Nítrico
PCR	Proteína C Reativa
PON-1	Paraoxonase-1
ROC	Curva Característica de Operação
SH	Grupamento Sulfidrila
SOD	Superóxido Dismutase
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TNB	Ácido Tionitrobenzóico
UV	Ultra Violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	DESENVOLVIMENTO	15
2.1	DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	15
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO	18
2.2.1	Sistema Antioxidante	20
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO E DOENÇA RENAL CRÔNICA	22
2.3.1	Oxidação Proteica e DRC	23
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4	MÉTODOS	27
4.1	AMOSTRAGEM	27
4.2	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	28
4.3	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO	28
4.3.1	Determinação de Hidroperóxidos por Quimiluminescência (CL-LOOH)	28
4.3.2	Metabólitos do Óxido Nítrico	28
4.3.3	Determinação de Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP)	28
4.3.4	Determinação de Grupamentos Sulfidril (SH)	29
4.3.5	Determinação da Atividade da Paraoxonase-1 (PON-1)	29
4.3.6	Determinação da Superóxido Dismutase (SOD).....	29
4.3.7	Determinação da Catalase (CAT)	29
4.3.8	Determinação de Glutathione Total (GT), Glutathione Reduzida (GSH) e Glutathione Oxidada (GSSG)	30
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5	RESULTADOS	31
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXOS	54

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é representada por um grupo de condições heterogêneas que afetam a estrutura e função do rim. A injúria renal aguda (IRA), a ingestão de nefrotoxinas, o aumento de peso, o tabagismo e o aumento da idade são os fatores ligados a ela (RASOOL et al., 2017).

O desenvolvimento da DRC é gradual e insidioso, onde metabólitos azotados (dentre outros) não são total ou suficientemente removidos. A taxa de mortalidade em pacientes com DRC é alta principalmente por causas como acidente vascular cerebral ou infarto agudo do miocárdio (SMALL et al., 2012). A idade, hipertensão, tabagismo, dislipidemia e *diabetes mellitus* (DM) são alguns dos fatores de risco conhecidos para DRC (ASLAM, 2008; LEVI et al., 2014).

O DM pode contribuir para a lesão de vasos sanguíneos glomerulares sendo que o primeiro sinal de problema renal é a presença de proteinúria anormal. Cerca de um terço das pessoas com essa doença podem, eventualmente, desenvolver DRC. 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 ou por meio de cálculos como pelas fórmulas de *Cockcroft-Gault* ou *Modification of Diet in Renal Disease - MDRD* (“KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease”, 2012).

O aumento nos níveis de homocisteína está associado com microalbuminúria e lesão glomerular na maioria da população diabética, sendo a hiperhomocisteinemia um fator de risco para o declínio da função renal e desenvolvimento da DRC (XIE et al., 2015).

O estresse oxidativo e o estresse nitrosativo (EO/EN) consistem no desequilíbrio entre substâncias pró e antioxidantes intracelulares ou de forma sistêmica resultando na superprodução de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ERO/ERN) e diminuição do sistema de defesas antioxidantes. O EO/EN é um fator importante na patogênese da lesão renal (WAN; SU; ZHANG, 2016).

Toxinas urêmicas (ureia, creatinina, homocisteína, oxalato, fósforo, guanidinas, entre outras) são metabólitos que podem propiciar a peroxidação lipídica, oxidação proteica e redução na concentração de enzimas antioxidantes levando ao EO/EN em pacientes com DRC (STEPNIEWSKA, 2015). O EO/EN promove apoptose de células renais, diminuição da capacidade regenerativa das células e fibrose, apresentando um efeito deletério sobre a função renal (SMALL et al., 2012). A intensidade do EO/EN urêmico pode ser medida utilizando-se marcadores específicos, conforme a progressão da doença e idade. (TBAHRITI, 2013).

Algumas estratégias podem retardar a progressão da DRC e reduzir os riscos da mortalidade por doenças cardiovasculares. Essas estratégias englobam o controle da pressão arterial com agentes que bloqueiam a via renina-angiotensina, controle glicêmico e hipolipemiantes reduzindo a incidência de eventos ateroscleróticos (JHA et al., 2013).

Diante do exposto e pelo fato da literatura ser escassa no entendimento do papel do EO na evolução da DRC, esse trabalho poderá trazer novas informações a cerca do envolvimento do EO na patogenia da DRC.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. DOENÇA RENAL CRÔNICA

Os rins são órgãos fundamentais para a manutenção da homeostase do organismo, possuindo funções de regulação e excreção, bem como funções endócrinas. A diminuição da TFG ou perda direta da função dos rins são observadas na DRC, comprometendo assim, a homeostase do organismo (MARQUITO et al., 2014).

Nesse contexto, os rins são responsáveis por outros mecanismo de controle do organismo, como regulação da atividade cardíaca através do equilíbrio do potássio, regulação do pH sanguíneo por meio da regeneração dos íons bicarbonato, controle da pressão arterial devido da remoção do sódio e o equilíbrio de água. Além disso, os rins tem importante função na formação do sangue pois são responsáveis pela síntese de eritropoietina, possui relação com a estrutura óssea, regulando o equilíbrio do cálcio e pela ativação da vitamina D. Sendo assim, os rins são órgãos muito importantes, e podem sofrer alterações de função e estrutura, diminuindo sua capacidade de efetuar todas essas funções (SILVERTHORN, 2010).

O cuidado com os pacientes com DRC é complexo e exige tratamento concomitante com vários medicamentos. Além disso, na presença de outras doenças e com o avançar da idade, aumenta-se o risco de desenvolvimento de outras comorbidades relacionadas às interações medicamentosas (SGNAOLIN et al., 2014). Nesse sentido, toda substância que se encontra na circulação e são depuradas via excreção renal, passará pelos rins. Isso significa que grandes concentrações de medicamentos dentro dos túbulos renais podem promover respostas inflamatórias e comprometer a filtração (MELGAÇO et al., 2010).

A DRC está associada a desfechos clínicos prejudiciais, dentre eles o aumento do risco de infecções e doenças cardiovasculares (ALI et al., 2017). Os sintomas da DRC são normalmente inespecíficos, entretanto, alguns pacientes relatam agrupamentos de sintomas como sonolência, prurido e pele seca (AIYEGBUSI et al., 2017).

A mortalidade na DRC permanece elevada, estando associada a eventos cardiovasculares na maioria dos pacientes. DM e hipertensão também são fatores de risco que predispõe o desenvolvimento e progressão da DRC (SAYANTHOORAN et al., 2016).

No Brasil, a DRC vem ganhando destaque nos últimos anos, por se tratar de uma doença cada vez mais comum na população e por estar associada a uma alta taxa de mortalidade (BATISTA et al., 2017). A incidência e a prevalência da DRC cresceram vertiginosamente, tendo em vista que no ano 2000 o número de pacientes em terapia de substituição renal (hemodiálise) era de 42.695 e no ano de 2012 este número alcançou a margem de 97.500 pacientes (PEREIRA et al., 2016). Entre as causas primárias da DRC no Brasil no ano de 2017, a hipertensão está em primeiro lugar com 34%, seguido do diabetes com 31%. Além disso, o número estimado de mortes de indivíduos com DRC em 2017 foi de 25.187, que alcançou uma porcentagem de mortalidade bruta de 19,9% (THOMÉ et al., 2019).

Para categorizar e acompanhar a evolução da doença além de mensurar a eficiência da intervenção terapêutica bem como mudanças no estilo de vida dos pacientes com DRC foi criado o KDIGO “*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*”, que desenvolve e implementa diretrizes globais de prática clínica para com esses pacientes. Existem vários de guidelines criados pelo KDIGO com a atenção voltada para pacientes com DRC, como pode-se citar o “*Diabetes and CKD*”, “*Lipids and CKD*” e “*Anemia in CKD*” (KDIGO, 2012).

O KDIGO no que diz respeito ao *guideline* “*CKD Evaluation and Management*” define a DRC como anormalidades da estrutura ou de função renal, presente por 3 meses, com implicações para a saúde (KDIGO, 2012).

As anormalidades da estrutura ou função renal podem ser reconhecidas clinicamente por diferentes critérios, sendo necessário apenas um desses critérios para se diagnosticar a DRC. Os critérios incluem diminuição TFG ($<60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$) ou evidência de dano renal, como albuminúria, anormalidades do sedimento urinário, eletrólitos e outras anormalidades devido a distúrbios tubulares. Além disso, anormalidades detectadas pela histologia e anormalidades estruturais detectadas por exames de imagem também são suficientes para o diagnóstico. Na clínica, isso significa que para diagnosticar DRC em um indivíduo com TFG normal ou com $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$, é necessária uma análise de urina ou teste de imagem renal (PEREZ-GOMEZ et al., 2019).

Esse sistema de estadiamento (tabela1) padronizou a definição de DRC e, ao fazê-lo, iniciou-se um discurso público e científico produtivo sobre a DRC (KOMENDA; RIGATTO; TANGRI, 2014).

Tabela 1: Categorias da taxa de filtração glomerular (TFG) na doença renal crônica (DRC).

Categoria		
TFG	TFG (ml/min/1.73 m ²)	Termos
1	≥ 90	Normal ou alto
2	60-89	Ligeira diminuição
3a	45-59	De leve a moderadamente diminuída
3b	30-44	Moderadamente a severamente diminuído
4	15-29	Gravemente diminuído
5	<15	Insuficiência Renal

Adaptação KDIGO (2012). TFG: taxa de filtração glomerular; tabela relativa a jovens adultos.

Em relação ao prognóstico dos pacientes com DRC, além da avaliação dos níveis de creatinina e o estadiamento da doença, também utiliza-se os valores de albuminúria. A partir de os valores de creatinina sérica e albuminúria estipula-se a frequência de avaliação desses marcadores ao decorrer do ano, a fim de obter um melhor acompanhamento desses pacientes (KDIGO, 2012).

Levando-se em consideração os principais desfechos da DRC, como doença cardiovascular, mortalidade e a própria progressão da doença e por haver uma estreita relação entre o estágio da DRC e os desfechos clínicos, o cuidado no controle dos fatores de progressão da DRC devem ser sempre intensificados, de acordo com a evolução da doença (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2014).

Além disso, a classificação deve ser aplicada para tomada de decisão no que diz respeito ao encaminhamento para os serviços de referência, para fins de organização do atendimento integral ao paciente. Nesse sentido, a maioria das pesquisas envolvem pacientes que se encontram nos estágios mais graves da doença, não sendo possível encontrar muitos estudos com o estadiamento inicial e intermediário (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2014).

A creatinina sérica, juntamente com a albumina urinária, é utilizada universalmente para se estimar a TFG. Os danos glomerulares acarretam a diminuição da seletividade de tamanho e carga das substâncias filtradas nos rins, e isso resulta em uma maior concentração de albumina na urina, conhecida como albuminúria. Entretanto, independente do motivo de excreção elevada de albumina, esta, tem efeito tóxico direto no tecido renal, contribuindo para a perda progressiva da função deste órgão. Os mecanismos pelos quais a albuminúria aumentada causa ou acelera a lesão renal envolvem múltiplas vias que culminam em lesões tubulointersticiais (HEERSPINK; GANSEVOORT, 2015).

Atualmente, já é de conhecimento que níveis mais elevados de albuminúria precedem e predizem uma taxa mais rápida do declínio da função renal e aumento do risco da DRC chegar ao estágio final em menor tempo. Além disso, não é só na DRC que a albuminúria tem importância, mas sim em várias condições fisiopatológicas, como diabetes, hipertensão e doenças glomerulares primárias (HEERSPINK; GANSEVOORT, 2015).

A ureia encontra-se aumentada em grande parte dos pacientes com DRC prejudicando o metabolismo do ácido fólico. Isso ocorre pelo fato de que os ânions orgânicos e inorgânicos têm sua depuração reduzida nesses pacientes, inibindo o transporte do metabólito do ácido fólico para dentro da membrana celular. Sendo assim, o transporte de folatos fica mais lento em pacientes urêmicos, resultando na baixa absorção de folatos mesmos em concentrações plasmáticas normais (CAPELLI et al., 2019).

A homocisteína é um aminoácido sulfurado que não está envolvido na síntese de proteínas, sendo um intermediário no metabolismo da metionina. Na DRC existe um aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína (hiperhomocisteinemia), que são determinados por vários fatores, como a diminuição de sua excreção, alterações genéticas de enzimas do metabolismo da metionina e deficiência de vitamina B12, B6 e ácido fólico (YE et al., 2016).

A hiperhomocisteinemia exerce ação patogênica nos processos de dano vascular, o que a torna mais grave nos pacientes com DRC. Ela é capaz de induzir o EO/EN e atua como antagonista das propriedades vasodilatadoras do óxido nítrico endotelial (CAPELLI et al., 2019; CIANCIOLO et al., 2017). Além disso, ela está relacionada com fatores inflamatórios e com a ativação de metaloproteinases, que induzem a síntese de colágeno e diminuem a elasticidade vascular,

culminando com o aumento da pressão arterial (CIANCIOLO et al., 2017).

Um possível mecanismo de lesão da homocisteína é a indução de EO/EN local, gerando espécies reativas, por causa do grupo tiol presente na molécula, que sofre rápida auto-oxidação na presença de oxigênio e íons metálicos. Além disso, a homocisteína elevada promove a atividade da NADPH-oxidase com aumento adicional na geração de ERO/ERN (CAPELLI et al., 2019). A homocisteína promove a proliferação de células musculares lisas, fazendo com que ocorra interações com plaquetas, lipídeos e fatores de coagulação. Ela também pode estar associada com a ação dos sequestradores de LDL oxidada - tais como CD36 e proteína de ligação à LDL oxidada tipo lectina-1 - por macrófagos, resultando em células espumosas (THAMPI et al., 2008).

Nos pacientes com DRC nos estágios intermediários e avançados são encontradas alterações metabólicas como acidose, inflamação sistêmica, desregulação hormonal e algumas outras comorbidades relacionadas à doença e a prática da polifarmácia. Esses fatores podem desencadear desnutrição e associam-se com a diminuição nos níveis de ácido fólico e vitamina B12, ocasionando um aumento dos níveis de homocisteína, tendo em vista que essas vitaminas atuam como cofatores durante a remetilização da mesma. (CAPELLI et al., 2019).

Outra alteração laboratorial muito encontrada nesses pacientes é o aumento nos níveis de ácido úrico (hiperuricemia), um produto final do metabolismo dos nucleótidos purínicos (adenina e guanina) (MUN et al., 2018).

A dislipidemia é comum na DRC e já foi demonstrado que a incidência da DRC está associada ao aumento de triglicérides plasmáticos e com a diminuição do colesterol HDL, embora os níveis de colesterol LDL são menos preditivos de risco cardiovascular na DRC, especialmente naqueles com TFG mais baixa. Sendo assim, é importante o controle da dislipidemia nesses pacientes (REISS et al., 2016).

2.2. ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO

O corpo humano produz radicais livres continuamente, pois são substâncias importantes para a defesa do organismo contra microorganismos e também para a sinalização celular (FRANÇA et al., 2013). Algumas células de defesa, como neutrófilos, macrófagos e células do endotélio produzem espécies radicalares durante o processo de cicatrização dos tecidos. Além disso, os agentes oxidantes possuem um papel importante no processo de coagulação, aumentando o recrutamento e a ativação de plaquetas induzida por colágeno (NERY et al., 2015).

Existe uma estimativa que para cada 25 moléculas de oxigênio (O_2) consumidas durante uma respiração normal, 1 radical livre seja produzido (PEREIRA, 2013). Radicais livres podem ser definidos como qualquer espécie com existência independente como moléculas, átomos ou íons, que contenha O_2 com um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo (KRÜGER et al., 2015). Essas substâncias são muito reativas e instáveis, podendo realizar ligações com moléculas próximas (PEREIRA, 2013).

Nesse sentido, o EO/EN pode ser estabelecido como uma desordem das funções moleculares e celulares, acarretada por um desequilíbrio entre a produção de ERO e ERN e a capacidade de produção de antioxidantes do organismo (OLIVEIRA et al., 2013).

Nos processos metabólicos os radicais livres exercem função de mediadores químicos em reações de transferência de elétrons, mas sua produção em excesso pode acarretar lesões oxidativas ao organismo (FRANÇA et al., 2013). Uma das características dos radicais livres é sua meia-vida que é relativamente curta, podendo ser de minutos, ou até mesmo de segundos em determinadas substâncias reativas (PEREIRA, 2013).

A capacidade de utilizar O_2 para sintetizar energia representa um dos principais avanços dos organismos vivos. Sendo o O_2 considerado um acceptor universal de elétrons, o metabolismo oxidativo é reponsável pela produção de várias substâncias como os radicais livres e ERO e ERN (PETRY et al., 2013).

A geração de radicais livres e consequentemente do EO/EN, estão interligadas com fatores exógenos, como poluição, raios ultravioleta (UV), medicamentos, bebidas alcoólicas e também o uso do cigarro (PEREIRA, 2013). Nesse contexto, a peroxidação lipídica está relacionada à uma reação em cadeia dos ácidos graxos poli-insaturados nas membranas celulares, gerando radicais livres que alteram a integridade da membrana celular, modificando sua permeabilidade e fluidez (FRANÇA et al., 2013).

A produção de EROs se inicia pelo O_2 , devido a sua configuração eletrônica, pois possui dois elétrons desemparelhados, (KRÜGER et al., 2015) recebendo um elétron de cada vez, produzindo compostos intermediários altamente reativos, destacando-se o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO^{\cdot}) (CAMBRUSSI et al., 2018). Apesar do fato do H_2O_2 não ser considerado um radical livre, ele é uma substância extremamente reativa em determinadas

situações (na presença de íons metálicos, por exemplo), sendo capaz de atravessar membranas do núcleo e acarretar danos no DNA através de reações enzimáticas (COTIGUIBA et al., 2013).

O $O_2^{\cdot -}$ também pode reagir com o óxido nítrico (NO), formando o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot -}$), que apesar de não ser um radical livre é altamente oxidativo, e pode levar à formação de um ácido oxidante com características semelhantes ao HO^{\cdot} (KRÜGER et al., 2015). No rim, a interação entre $O_2^{\cdot -}$ e NO causa danos ao endotélio vascular promovendo vasoconstrição. Além disso, altos níveis de angiotensina-II aumentam espécies radiculares que resultam na infiltração de células inflamatórias que causam danos tubulares e glomerulares (PUSHPAKUMAR et al., 2017).

O ânion $ONOO^{\cdot -}$ está em equilíbrio com o ácido peroxinitrito correspondente ($ONOOH$) e os dois decaem rapidamente em pH fisiológico formando radicais livres, como o HO^{\cdot} . Além disso, o $ONOO^{\cdot -}$ oxida proteínas e tióis formando dissulfetos. Sendo assim, a importância das espécies reativas não radiculares se deve ao fato de participarem ativamente como subprodutos para a geração de radicais livres (KALYANARAMAN, 2013).

2.2.1. Sistema Antioxidante

As defesas antioxidantes do organismo podem ser dividida em enzimáticas que incluem, por exemplo, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), e não enzimáticas como os polifenóis e algumas vitaminas como A, C e E (KRÜGER et al., 2015).

Em relação aos antioxidantes enzimáticos, de acordo com Kalyanaraman (2013) a CAT reduz o H_2O_2 para O_2 e H_2O , mas em altas concentrações de H_2O_2 , a enzima GPx, que é dependente da glutathione reduzida (GSH), é responsável pela desintoxicação do H_2O_2 . Durante este processo, a GSH é oxidada através da glutathione oxidase (GOx) para dissulfeto de glutathione (GSSG) que é então reduzido de volta para GSH pela glutathione reductase (GR) usando NADPH como co-fator. A enzima GPx também é responsável pela remoção de outros peróxidos lipídicos (LOOH), como pode-se observar na figura 1.

Os mecanismos de defesa antioxidante atuam como neutralizantes ou atenuantes das atividades das espécies reativas. Dentre eles podemos citar a SOD, que está presente no citosol e na mitocôndria e é responsável por catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 e O_2 e também a CAT encontrada no citosol e nas mitocôndrias, além de estar presente nos peroxissomos. Ela é responsável pela conversão do H_2O_2 em água e O_2 (PETRY et al., 2013).

A paraoxonase-1 (PON1) é uma esterase associada HDL e sua baixa atividade tem sido associada ao aumento do risco de eventos cardiovasculares. Ela é uma enzima hidrolítica cálcio dependente encontrada em uma variedade de espécies de mamíferos e possui a capacidade de hidrolisar o LDL oxidado, com potenciais efeitos ateroprotetores. Além disso, a PON1 pode clivar adutos de peroxidação lipídica e também hidrolisar a homocisteína tiolactona, um intermediário mais

reativo que a própria homocisteína (SHUNMOOGAM; NAIDOO; CHILTON, 2018).

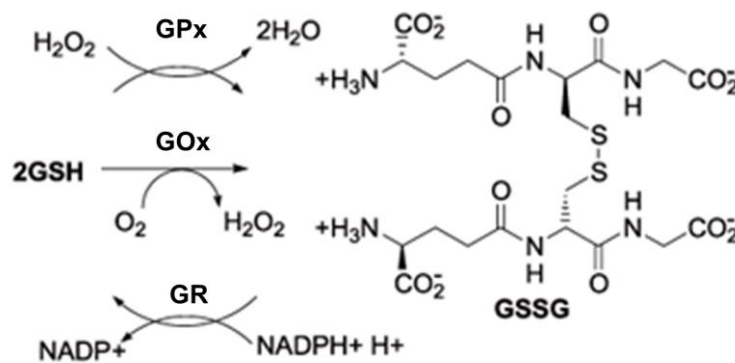


Figura 1: Representação Esquemática do Ciclo catalítico da glutatona.

Fonte: Adaptado de (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008).

Em relação aos antioxidantes não enzimáticos, o principal deles é a GSH, que é dependente da atividade da GPx. É encontrada de maneira abundante em todos os compartimentos celulares e é sintetizada em todo o corpo. Este antioxidante protege as macromoléculas celulares, como proteínas e lipídeos de membrana, contra os ataques de espécies reativas. A neutralização do H_2O_2 e peróxidos lipídicos é uma de suas ações. Devido ao grupamento tiol livre, ela pode doar um elétron para os radicais para torná-los menos reativos. A doação causa a oxidação da própria GSH, que se transforma em dissulfeto de glutatona, que está oxidada. Por sua vez, este último é reduzido de volta à GSH pela enzima glutatona redutase (DZIEDZIC et al., 2017).

Substâncias antioxidantes normalmente são encontradas em menores concentrações em relação ao substrato oxidável, sendo responsável por atrasar ou inibir a reação de maneira eficaz. Pequenas moléculas possuem a capacidade de agir diretamente na neutralização dessas substâncias radicalares ou indiretamente, se envolvendo em sistemas enzimáticos (COTIGUIBA et al., 2013). Dentre elas pode-se citar a glutatona reduzida, que está presente no meio aquoso bem como nas hemácias, e é responsável pela regeneração da vitamina C e, indiretamente da vitamina E, além de ser substrato para a GPx (PETRY et al., 2013).

O ácido úrico se apresenta dos dois lados do EO/EN, sendo antioxidante no meio extracelular e pró oxidante no meio intracelular, sendo solúvel dentro das células e insolúvel no meio extracelular. Como antioxidante, o ácido úrico corresponde por 60% da capacidade antioxidante do plasma (NERY et al., 2015).

Altas concentrações séricas de ácido úrico sérico possuem desvantagens para o organismo humano. Ele é conhecido por ter efeito neuroprotetor, diminuindo o risco de doença de Parkinson e comprometimento cognitivo. No entanto, possui uma elevada capacidade pró-oxidante no nível celular e é conhecido por ser responsável pelo aumento dos índices de mortalidade cardiovascular (MUN et al., 2018).

O ácido fólico é derivado de poliglutamatos que são convertidos em monoglutamatos no intestino e transportados através de epitélios mucosos por um transportador específico (CAPELLI et al., 2019). O ácido fólico é conhecido por diminuir os níveis de homocisteína, sendo o folato um substrato para a remetilação da homocisteína (CHEN et al., 2016). Além disso, ele também melhora a função endotelial independente da diminuição da homocisteína, e esse resultado está relacionado à redução do EO/EN intravascular e ao aumento da meia vida do NO endotelial (CIANCIOLO et al., 2017).

2.3. ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO E DOENÇA RENAL CRÔNICA

O rim é um órgão com alta demanda energética, e isso o torna mais vulnerável a danos causados pelo EO/EN. Sendo assim, o EO/EN está associada a DRC, além de participar das várias complicações da doença, como inflamação e problemas cardiovasculares (DAENEN et al., 2018).

A aterosclerose é uma condição presente na maioria destes pacientes, muitas vezes associada à própria gênese da doença renal. A presença de inflamação é um achado consistente em pacientes com DRC e tem sido reconhecida como um novo fator de risco para doença arterial coronariana (DUMMER; THOMÉ; VERONESE, 2007). A DRC moderada a grave (estágios 3-5) está associada a um risco significativamente maior de morbidade e mortalidade cardiovascular. Sendo assim, mais de 50% das mortes em pacientes com insuficiência renal ocorrem por infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, e morte cardíaca súbita (KAUR; YOUNG; FADEL, 2017).

A aterosclerose acelerada na DRC é precedida pela disfunção endotelial, que pode exibir um perfil pró-inflamatório e pró-trombótico e aumento de EO/EN. A DRC é um exemplo reconhecido de distúrbio multissistêmico crônico associado a um elevado risco cardiovascular (VERA et al., 2018).

O mecanismo preciso de como a DRC induz o EO/EN não foi completamente elucidado. Alguns estudos sugerem que as ERO/ERN são geradas na DRC por processos internos, incluindo hiperativação da NADPH oxidase, aumento na produção de espécies radicalares e liberação de toxinas urêmicas (SAYANTHOORAN et al., 2016). O aumento de ERO/ERN acarreta lesões e disfunções teciduais por ataque, desnaturação, modificação de moléculas estruturais e funcionais e ativação fatores de transcrição sensíveis ao estado redox. Esses eventos, por sua vez, promovem necrose, apoptose, inflamação, fibrose e outras alterações metabólicas (NOGUEIRA et al., 2017).

Acumulam-se evidências sugerindo que a inflamação crônica é crucial para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose nos pacientes com DRC. Níveis elevados de marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa (PCR), são encontrados em pacientes com DRC em diferentes estágios de sua progressão. A presença de níveis plasmáticos elevados de outros marcadores inflamatórios, como a interleucina-6 (IL-6), e de EO/EN, como a peroxidação lipídica contribuem para o aumento da resposta inflamatória observada nestes pacientes (DUMMER; THOMÉ; VERONESE, 2007).

A DRC está associada a um declínio no conteúdo mitocondrial no estágio inicial da doença, onde estas organelas podem ser desreguladas e, conseqüentemente, induzir alterações funcionais como alteração da permeabilidade da membrana e mutações no DNA mitocondrial (SIGNORINI et al., 2017). Nesse contexto, durante o dano renal, alterações mitocondriais contínuas podem ativar um círculo vicioso, responsável por uma superprodução de ERO/ERN que podem induzir mutações no DNA mitocondrial, danificar a cadeia respiratória, alterar a permeabilidade da membrana e sistemas desta organela. A disfunção mitocondrial e a insuficiência renal são estritamente conectados (SAYANTHOORAN et al., 2016).

As alterações oxidativas de proteínas causadas pelas ERO/ERN têm a capacidade de aumentar a expressão de nitrotirosina, um produto da nitração da tirosina mediada por ERNs, além de aumentar a expressão de receptores de toxinas urêmicas, como os produtos finais da glicação avançada (OLIVEIRA et al., 2013).

Os produtos finais de glicação avançada são toxinas urêmicas que se encontram elevadas na DRC. Essa elevação pode ser explicada pela produção através do EO/EN, pela diminuição da excreção renal e pela ingestão de alguns alimentos. Além disso, as toxinas urêmicas podem acarretar uma deficiência na síntese de óxido nítrico que tem um importante papel na proteção vascular, inibindo a proliferação e migração de células do músculo liso vascular, a agregação de plaquetas, bem como a expressão de moléculas de adesão (FRANÇA et al., 2017).

Além disso, estudos já provaram que nos pacientes com DRC, o EO/EN acarreta uma diminuição nos níveis de compostos antioxidantes endógenos como SOD (CHEN et al., 2016; SAHNI; GUPTA; BHALLA, 2012) e CAT (SAHNI; GUPTA; BHALLA, 2012).

2.3.1 Oxidação Proteica e DRC

Os produtos avançados de oxidação proteica (AOPPs) são proteínas plasmáticas que se tornam oxidadas como resultado da exposição à ERO/ERN e são transportadas pela albumina na circulação (FENG et al., 2017). A oxidação proteica pode ser encontrada em diversos distúrbios, como diabetes, síndrome metabólica e DRC, sendo que neste último, desempenha um papel importante na progressão da proteinúria e da glomeruloesclerose. A mensuração da AOPP é uma opção laboratorial interessante para quantificar o dano oxidativo/nitrosativo às proteínas plasmáticas (DENG et al., 2017; HUANG et al., 2013).

As proteínas atuam ativamente como alvos, fontes e captadores de espécies reativas, sendo que EROs e ERNs podem reagir mais rapidamente com proteínas (albumina, 8×10^{-10} L/mol/s) ou resíduos proteicos (cisteína, $3,4 \times 10^{-10}$ L/mol/s; triptofano, $1,3 \times 10^{-10}$ L/mol/s), de acordo com as constantes de reação calculadas por (DAVIES, 2005).

A AOPP é considerada um marcador de EO/EN facilmente mensurável, além de ser um biomarcador simples e barato para estimar os níveis de EO/EN. Além disso, o acúmulo de AOPP é um fator de risco independente para eventos cardiovasculares na DRC, e em pacientes em hemodiálise, os níveis de AOPP apresentam associação com doença cardíaca isquêmica (DZIEDZIC et al., 2017).

A oxidação proteica é um fenômeno complexo, pois as vias e a natureza dos produtos de oxidação dependem dos alvos na proteína e de como as reações oxidativas se iniciam. Essa oxidação pode causar modificações químicas em cadeias laterais específicas de aminoácidos e/ou no esqueleto peptídico, podendo levar a alterações nas propriedades físicas das proteínas, incluindo fragmentação, agregação, perda de solubilidade e funcionalidade e diminuição da susceptibilidade à proteólise (ESTEVEZ; LUNA, 2016).

A oxidação das proteínas leva à formação de derivados carbonílicos reativos, derivados glicosados e adutos com dialdeídos. O estudo de Muravlyova *et al.* (2015) encontrou um aumento na concentração de derivados carbonílicos reativos à proteína no plasma e nos eritrócitos de pacientes com doenças renais.

A carbonilação é uma modificação irreversível em proteínas oxidadas induzidas por EO/EN. As carbonilas podem ser formadas em proteínas por três vias diferentes: i) oxidação direta das cadeias laterais de aminoácidos alcalinos, como lisina, treonina e arginina; ii) a reação do grupo δ -amino de um aminoácido alcalino com açúcares redutores ou seus produtos de oxidação e iii) clivagem oxidativa do esqueleto peptídico através da via de α -amidação ou a oxidação de cadeias laterais de glutamyl (ESTEVEZ; LUNA, 2016).

O aumento nos níveis de AOPPs na DRC foi relatado pela primeira vez por WITKO-SARSAT *et al.*, (1996) relacionando com a uremia e com a ativação do sistema renina-angiotensina nas células epiteliais tubulares proximais através de uma via de sinalização mediada por CD36 (CAO *et al.*, 2012). O acúmulo de AOPPs plasmáticos pode induzir lesão endotelial e apoptose de podócitos através do receptor de produtos finais de glicação avançada (ZHOU *et al.*, 2012).

Ao oxidar proteínas, o EO/EN as modifica irreversivelmente e a presença de produtos de oxidação proteica no plasma de pacientes com DRC indica os efeitos do EO/EN nas proteínas plasmáticas. Além disso, o aumento dos níveis de AOPP leva à aceleração do processo aterosclerótico. Estudos já demonstraram que tanto nos estágios não dialíticos da DRC quanto nos pacientes que realizam hemodiálise encontra-se um aumento dos níveis de oxidação de proteínas (GRYSZCZYNSKA *et al.*, 2017).

Os estudos de Feng e colaboradores (2017) sugeriram que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na DRC e que os AOPPs aumentam os níveis de estresse oxidativo renal em pacientes diabéticos.

Já foi demonstrado que os níveis plasmáticos de AOPPs aumentam com a progressão da DRC, e estão relacionadas com os produtos finais de glicação avançada (ZADRAŽIL *et al.*, 2010). Além disso, Witko-Sarsat, Gausson and Descamps-Latscha (2003) apresentaram dados que demonstram que níveis elevados de AOPP são capazes de desencadear a síntese de citocinas em leucócitos, monócitos e neutrófilos, e parecem agir como mediadores inflamatórios em pacientes com DRC. Nesse contexto, foi demonstrado que células imunes, como monócitos e neutrófilos, são ativadas pela AOPP, induzindo o *burst* respiratório em neutrófilos *in vitro* (GARIBALDI *et al.*, 2017).

As concentrações de AOPPs foram encontradas elevadas em pacientes em hemodiálise e em diálise peritoneal. Da mesma forma, os níveis de AOPPs em pacientes com insuficiência renal não dialisados também aumentaram em comparação a controles saudáveis, o que levou à inclusão da AOPP na família de toxinas urêmicas (GARIBALDI *et al.*, 2017; WITKO-SARSAT; GAUSSON; DESCAMPS-LATSCHA, 2003). Além disso, a capacidade de ativar fagócitos e induzir a produção de

citocinas como interleucina-6 e fator de necrose tumoral sugere que a AOPP atue como mediador pró-inflamatório (WITKO-SARSAT et al., 1996).

Estudos sugerem que níveis elevados de AOPP podem ser observados no plasma de pacientes com DRC nos estágios iniciais e que o aumento desses níveis estão correlacionados positivamente com a diminuição da função renal (TANG et al., 2015).

O estudo de Wang e colaboradores (2014) demonstrou que os níveis e a distribuição da expressão de AOPPs no tecido renal estavam associados à inflamação celular tecidual em pacientes com nefropatia por imunoglobulina A, apresentando lesões de grau relativamente baixo e função renal normal. Níveis mais elevados de expressão de AOPP renal no momento do diagnóstico previram independentemente o risco de progressão rápida da DRC e progressão da fibrose renal.

Ensaio clínico e pesquisas experimentais sugerem que os AOPPs estão associados a alterações estruturais dependentes do estado redox, e associadas a nefropatias progressivas, incluindo fibrose intersticial e atrofia tubular. Nesse contexto, AOPPs são mediadores patogênicos de muitos distúrbios, portanto, é importante entender como as AOPPs influenciam células, tecidos e órgãos em condições patológicas e fisiológicas (DENG et al., 2017).

Em função do exposto acima e dos estudos já realizados com pacientes com DRC justifica-se este trabalho devido a pouca atenção voltada aos estágios iniciais da DRC bem como a subdivisão correta e precisa dos estágios dessa doença de acordo com o *KDIGO "CKD Evaluation and Management"*. A maioria dos estudos está relacionada ao estágio mais grave da DRC ou utiliza os estágios iniciais e intermediários como um único grupo, não conseguindo assim, caracterizar o perfil bioquímico e de EO/EN de cada estágio da doença.

Portanto, o objetivo deste estudo foi mensurar os níveis de biomarcadores de EO/EN e parâmetros bioquímicos de pacientes com DRC nos estágios 3a, 3b e 4 comparando-os entre si e entre indivíduos saudáveis com a finalidade de verificar o quanto a DRC afeta os biomarcadores de EO/EN bem como altera resultados laboratoriais de rotina nesses pacientes. Com esses resultados procura-se obter um perfil de cada estágio da DRC visando, futuramente, buscar novos tratamentos que auxiliem na melhora da qualidade de vida desses pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Mensurar os níveis de EO/EN e parâmetros bioquímicos de pacientes com DRC nos estágios não dialíticos 3a, 3b e 4 comparando-os entre si e entre indivíduos saudáveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros bioquímicos de ácido úrico, creatinina, proteínas totais, glicose, homocisteína, perfil lipídico, proteína C reativa (PCR), aspartato aminotransferase (AST) e alalina aminotransferase (ALT).
- Avaliar os níveis dos biomarcadores antioxidantes: grupamento sulfidril (SH), paraoxonase-1 (PON-1), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona total (GT) e glutatona reduzida (GSH).
- Avaliar os níveis de biomarcadores pró-oxidantes: hidroperóxidos lipídicos (LOOH), metabólitos do óxido nítrico (NOx), produtos avançados de oxidação de proteínas (AOPP) e glutatona oxidada (GSSG).

4. MÉTODOS

4.1. AMOSTRAGEM

Trata-se de um estudo caso-controle, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina - CAAE 67228117.1.0000.5231 - com uma amostra de 88 pacientes com DRC atendidos no ambulatório de nefrologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU-UEL) no período de abril 2018 a setembro de 2018. Todos os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e foram informados sobre o objetivo da pesquisa.

Os pacientes recrutados foram alocados em três grupos, de acordo com a classificação de suas TFG (3a, 3b e 4) e comparados entre si e a um grupo controle (n=23), sendo selecionados através de grupos da terceira idade ou profissionais que atuam dentro da Universidade Estadual de Londrina. Foi utilizado o cálculo de MDRD para estimar a TFG dos pacientes e do grupo controle. Os indivíduos com DRC e o grupo controle foram pareados de acordo com a idade, gênero e etnia.

Os critérios de inclusão foram pacientes com DRC de ambos os sexos, idade > 18 anos em plena condição cognitiva, sem apresentar comorbidades que impedissem a participação neste estudo e que apresentem TFG de acordo com os estágios da DRC descritas acima. Foram excluídos do estudo, pacientes que apresentam quadro de infecção viral crônica, doença autoimune e malignidade, tratamento com antioxidantes ou anti-inflamatório. Estas situações podem afetar a análise laboratorial em processo inflamatório e/ou imunológico. Para o grupo controle os critérios de inclusão foram indivíduos de ambos os sexos, idade > 18 anos, em plena condição cognitiva, sem apresentar doença renal, quadro de infecção viral crônica, doença autoimune ou malignidade e tratamento com antioxidantes ou anti-inflamatórios.

Os voluntários realizaram exames de sangue para avaliação do EO e parâmetros bioquímicos. Foram coletados 20 mL de sangue por punção venosa, de todos os voluntários em jejum de no mínimo 8 e no máximo 12 horas: 10 mL de sangue em tubos com vácuo (vacutainer®) contendo EDTA para determinação das atividades da SOD, CAT, GSH, 5mL de sangue em tubos com vácuo (vacutainer®) contendo fluoreto para a dosagem de glicose e 5mL de sangue tubos com vácuo (vacutainer®) sem anticoagulante para a realização dos testes para análise dos parâmetros bioquímicos e de EO/EN. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 8.568xg (*g force*) e o soro foi imediatamente armazenado a -80 ° C. Amostras de sangue contendo EDTA foram lavadas três vezes com 2 mL de solução salina a 0,9% e armazenadas em freezer -80°C. Os ensaios de EO/EN foram realizados em triplicata e o coeficiente de variação intra-ensaio foram inferiores a 10%.

4.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

As análises bioquímicas, ácido úrico, creatinina, proteínas totais, glicose, perfil lipídico, Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) foram realizadas no aparelho Dimension®, RxL (Deerfield, IL, EUA) através de kits. A avaliação dos níveis de PCR foi realizada pelo equipamento Architect® C8000 (Abbott, EUA) e a avaliação dos níveis de homocisteína foram realizadas pelo equipamento Architect® Plus i2000 SR (Abbott, EUA).

4.3. PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO

4.3.1. Determinação de Hidroperóxidos por Quimiluminescência (CL-LOOH)

A avaliação da formação de hidroperóxidos por quimiluminescência foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Flecha, Llesuy e Boveris (1991). A quimiluminescência estimulada por t-butil foi empregada para analisar os níveis de hidroperóxidos presentes no soro. Este teste baseia-se no consumo das defesas antioxidantes e a formação de hidroperóxidos resultando em um aumento da emissão de fótons, ou seja, em um aumento de quimiluminescência que está relacionado com o estresse oxidativo.

Este experimento foi realizado em luminômetro Glomax (TD 20/20) ao abrigo da luz para evitar a fosforescência, a 30°C, durante 60 minutos. Os resultados foram expressos em unidades relativas de luz (URL) e a curva obtida foi utilizada como um indicador qualitativo da lipoperoxidação. Os resultados quantitativos foram obtidos após a integração da área sobre a curva utilizando o OriginLab 7.5 software.

4.3.2. Metabólitos do Óxido Nítrico (NOx)

A determinação da concentração de subprodutos do NOx foi realizada pela técnica descrita por Navarro-González, García-Benayas e Arenas (1998). O óxido nítrico é um gás muito instável e rapidamente se degrada nos subprodutos nitratos e nitritos, que podem ser detectados no soro. O método de detecção baseia-se na redução de nitrato a nitrito, mediada por reações de óxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotização e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess. A quantificação de NOx foi feita em leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) sendo as leituras feitas em 540 nm. A concentração de óxido nítrico foi expressa em μM .

4.3.3. Determinação de Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas (AOPP)

Para a quantificação do nível de oxidação proteica no soro utilizou-se o método descrito por Hanasand et al., (2012) e Witko-Sarsat et al., (1996). A reação foi realizada em meio ácido (ácido acético), e na presença de proteínas oxidadas na amostra ocorre a reação com o iodeto de potássio dos

reagentes que absorvem em 340 nm. A leitura da reação foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 340 nm. A concentração de AOPP foi expressa em $\mu\text{moles/L}$ de equivalente de cloramina T.

4.3.4. Determinação de Grupamento Sulfidril (SH)

O grupamento SH de proteínas foi avaliado pelo método descrito previamente por Hu (1994) e adaptado para microplaca por Taylan e Resmi (2010). O método de análise foi baseado na reação do ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzótico (DTNB) com o grupo sulfidril de proteínas. A leitura da reação foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em μM .

4.3.5. Determinação da atividade da paraoxonase 1 (PON-1)

A atividade total da PON-1 foi determinada pela formação de hidrólise do fenil-acetato (fenol), baseado na metodologia descrita por Richter, Jarvik e Furlong (2008). A taxa de hidrólise de fenil-acetato, foi determinada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 270 nm, medidos durante 4 minutos (16 leituras com intervalo de 15 segundos entre as leituras) com a temperatura mantida a 25°. A atividade foi expressa em U/mL com base no coeficiente de extinção molar do fenil-acetato que equivale a 1,31mMol/Lcm-1.

4.3.6. Determinação da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD nos eritrócitos foi determinada usando o método do pirogalol descrita por Marklund e Marklund (1974). Esta técnica baseia-se na inibição que esta enzima promove na auto-oxidação do pirogalol em solução aquosa. A quantidade de SOD que foi capaz de inibir 50% da oxidação do pirogalol foi definida como uma unidade de atividade enzimática. A leitura da reação da SOD foi feita em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de 420 nm.

4.3.7. Determinação da Catalase (CAT)

A análise da atividade da catalase foi através da medida do decaimento na concentração de H_2O_2 e geração de oxigênio, utilizando a técnica descrita por Aebi (1894). A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 240 nm.

4.3.8. Determinação de Glutathiona Total (GT), Glutathiona Reduzida (GSH) e Glutathiona Oxidada (GSSG)

A formação do TNB (ácido tionitrobenzóico) foi monitorada espectrofotometricamente em 412 nm através do sobrenadante adicionado em microplacas de fundo plano, resultante da reação de duas moléculas de GSH e uma do ácido ditio-bis-nitrobenzóico. Na presença da glutathiona redutase e de NADPH, a GSSG resultante da primeira reação (ou aquele que já estava presente na amostra) foi reconvertida em GSH que é re-oxidada a GSSG formando mais TNB, e obtendo-se as quantidades de GT presente na amostra. A quantidade de GSSG foi obtida por cálculo através da subtração da GT-GSH/2, de acordo com (TIETZE, 1969; ANDERSON,1985).

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O gerenciamento dos dados e a estatística foram realizados com o SPSS Statistic® 20 (IBM, Armonk, NY, EUA). Inicialmente, a distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade da variância (teste de Levene) foram verificadas. Se esses critérios foram atingidos ($p \geq 0,05$), as variáveis foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) complementada com teste de Tukey ou Dunnett T3. Os dados que não alcançaram distribuição normal e homogeneidade dos critérios de variância foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. As associações entre dois sistemas categóricos foram verificadas usando análises de tabelas de contingência (testes de qui-quadrado).

Medidas dos biomarcadores de EO, creatinina, homocisteína, proteína total e ácido úrico como variáveis dependentes e todos os grupos (CTL; 3a; 3b; 4), hipertensão, diabetes e uso de estatina como variáveis exploratórias foram avaliadas por análise GLM multivariada (MANOVA). Os resultados da curva característica de operação do receptor (ROC) pela diferença na área de otimização sob a curva foram usados para descrever e comparar a precisão do diagnóstico. Conclusões foram estabelecidas em $p \leq 0,05$.

Os Resultados estão apresentados em forma de artigo científico que será submetida à revista Life Sciences, avaliada como B1 em Medicina I.

5. RESULTADOS

Evaluation of oxidative/nitrosative stress and biochemical parameters in pre-dialitical patients

3a, 3b and 4

Ana Paula Michelin¹; Andressa Keiko Matsumoto¹; Laura de Oliveira Semeão²; Bruno Moraes de Oliveira²; Kamila Landucci Bonifácio¹; Carine Coneglian de Farias¹; Walter Sepúlveda Loyola³ Aquiles; Estefânia Gastaldello Moreira¹; Vinícius Álvares Daher Delfino¹; Décio Sabbatini Barbosa¹

¹ Postgraduate Program in Health Sciences, State University of Londrina, Brazil.

² Students of graduation in Pharmacy, State University of Londrina, Brazil.

³ Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, State University of Londrina, Brazil.

Name: Ana Paula Michelin

Mailing address: Avenida Robert Koch, 60.

Telephone number: +55 4333712451

e-mail address: paulimichelin10@gmail.com

Abstract:

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by a progressive loss of renal function for more than 3 months accompanied by structural damage and inflammation. Oxidative and nitrosative stress (OS/NS) is associated with the progression of the disease. Aims: Evaluate biochemical parameters, and the involvement of OS/NS in the progression of CKD in pre-dialytic stages. Main methods: A controlled study with a sample of 88 patients with CKD allocated in three groups, according to the classification of their eGFR (3a, 3b and 4) and compared to each other and to a control group (n=23). Were performed biochemical analyses of uric acid, creatinine, total proteins, glucose, homocysteine, lipid profile, PCR, AST and ALT and OS/NS biomarkers (SOD, CAT, PON, GT, GSH, GSSG, NO_x, LOOH, SH, and AOPP). The results were considered significant $p \leq 0.05$. Key findings: The most relevant result of this study was related to AOPP levels, which were increased according to the progression of the disease between the stages, as well as when compared to the control. Comparing stages 3a, 3b and 4 of CKD with control, a significant increase was also observed in the OS/NS biomarkers SOD, GT, GSH and NO_x. Significance: According the results it was possible to conclude that there are differences between the stages of the disease and in relation to the control group in both the OS/NS and the biochemical biomarkers.

Keywords: Advanced protein oxidation products; pre-dialytic; oxidative stress.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is a public health problem that affects men and women in any age group [1]. CKD is associated with deleterious clinical outcomes, including increased risk of infections and cardiovascular diseases [2]. The symptoms of CKD are usually non-specific, however, some patients report clustering of symptoms such as drowsiness, pain, pruritus and dry skin [3].

There are different mechanisms that could explain the existence of high oxidative/nitrosative stress (OS/NS) in patients with CKD. In this sense, OS/NS can be established as a disorder of molecular and cellular functions, caused by an imbalance between the production of oxygen/nitrogen reactive species (ROS/ RNS) and the antioxidant production capacity of the organism [4].

Increased production of ROS/RNS in CKD is mainly driven by activation and upregulation of enzymatic ROS/RNS production, including isoforms of NADPH oxidase, cyclooxygenase-2, lipoxygenase and mitochondrial dysfunction [5]. OS/NS appears to increase as CKD progresses and correlates significantly with the level of renal function. OS/NS and inflammation play a central role in the pathogenesis and progression of CKD [6].

Strategies can slow the progression of CKD and reduce the risk of mortality from cardiovascular disease. These strategies include blood pressure control with agents that block the renin-angiotensin pathway, glycemic control, and lipid-lowering agents, reducing the incidence of atherosclerotic events [7].

Based on the above, the aim of this study was to evaluate biochemical parameters and evaluate the involvement of OS/NS in this progression could elucidate some aspects of the physiopathology of CKD in the pre-dialytic stages.

Materials and methods

Sampling

A controlled study was approved by the Research Ethics Committee of the State University of Londrina (Brazil) - CAAE 67228117.1.0000.5231 - with a sample of 88 patients with CKD treated at the nephrology outpatient clinic of the Hospital de Clínicas of the State University of Londrina (HC-UEL) from January 2018 to September 2018. The patients recruited were allocated to three groups, according to the classification of their estimated glomerular filtration rate - eGFR (3a, 3b and 4) and compared to each other and to a control group (n = 23). The classification of the CKD stage was performed according to the KDIGO - CKD Evaluation and Management (2012), and the eGFR were performed through the calculation of Modification of Diet in Renal Disease (MDRD). Patients with CKD and the control group were matched according to age, ethnicity, and gender.

Inclusion criteria of this study were patients of both sexes, age ≥ 18 years old in full cognitive status, without presenting comorbidities that prevent participation in this study and that present eGFR

according to the desired classification. The inclusion criteria for the control group were individuals of both sexes, age ≥ 18 years in full cognitive condition, without presenting hypercholesterolemia and diabetes, as well as, not to use statins. Patients and controls with a chronic viral infection, autoimmune disease, treatment with antioxidants or anti-inflammatory drugs were excluded from the study.

Patients and the control group underwent blood tests to assess OS/NS and biochemical parameters. The blood sample (20 mL) was collected by venipuncture from all volunteers, the samples were centrifuged for 10 minutes at 8,568xg and the serum was immediately stored at -80°C . EDTA blood (10 mL) samples were washed three times with 2 mL of 0.9% saline, and stored in a freezer -80°C before the laboratory analysis. OS/NS assays were performed in triplicate and the intra-assay coefficient of variation was less than 10%.

Biochemical Parameters Analysis

Biochemical analyses of uric acid, creatinine, total proteins, glucose, homocysteine, lipid profile, PCR, AST, and ALT were performed in a Biochemical Autoanalyzer Dimension®, RxL (Deerfield, IL, USA). The evaluation of the CRP levels were performed by the Architect® C8000 equipment (Abbott, USA) and the homocysteine levels were evaluated by the Architect® Plus i2000 SR (Abbott, USA).

In vivo analysis of OE/NS biomarkers

Determination of hydroperoxides by chemiluminescence (CL-LOOH)

The evaluation of the formation of hydroperoxides by chemiluminescence [8] is defined to t-butyl-stimulated chemiluminescence was employed to analyze the levels of hydroperoxides present in serum. This test is based on the consumption of antioxidant defenses and the formation of hydroperoxides resulting in an increase in the emission of photons. These analyses were performed in a Glomax luminometer (TD 20/20). The entire experiment was carried out from the light to avoid phosphorescence at 30°C for 60 minutes. The results were expressed in relative units of light (URL).

Nitric Oxide Metabolites (NOx)

The detection method is based on the reduction of nitrate to nitrite, mediated by oxidation-reduction reactions occurring between the nitrate in the sample and the cadmium-copper system of the reactants, with subsequent diazotization and colorimetric detection of the azocomposite formed by the addition of the reagent of Griess [9]. NOx quantification was done on a Perkin Elmer® microplate reader, model EnSpire (Waltham, MA, USA) and the readings were made at 540 nm. The NOx concentration was expressed in μM .

Determination of advanced protein oxidation products (AOPP)

The reaction was carried out in acid medium (citric acid), and in the presence of oxidized proteins in the sample, the reaction with the potassium iodide of the reagents that absorb at 340 nm occurs [10,11]. The reaction was read on a Perkin Elmer® microplate reader, model EnSpire (Waltham, MA, USA) at wavelength 340 nm. The concentration of AOPP was expressed in $\mu\text{moles/L}$ of chloramine T-equivalent.

Determination of sulfhydryl group (SH)

The method of analysis is based on the reaction of 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) with the sulfhydryl group of proteins [12]. The reaction was read in a Perkin Elmer® microplate reader, model EnSpire (Waltham, MA, USA) with a wavelength of 412 nm. The results were expressed in μM .

Determination of the activity of paraoxonase 1 (PON-1)

The total activity of PON-1 was determined by the hydrolysis formation of phenylacetate (phenol) [13]. The rate of phenylacetate hydrolysis was determined on a Perkin Elmer® microplate reader, model EnSpire (Waltham, MA, USA) at wavelength 270 nm, measured over 4 minutes (16 readings ranging from 15 seconds between readings) with the temperature maintained at 25°. The activity was expressed as U/mL based on the molar extinction coefficient of phenylacetate which is equal to 1.31mMol/Lcm-1.

Determination of superoxide dismutase (SOD)

This technique is based on the inhibition that this enzyme promotes in the auto-oxidation of pyrogallol in aqueous solution. The amount of SOD that was able to inhibit 50% of the pyrogallol oxidation was defined as a unit of enzyme activity [14]. The SOD reaction was read on a Perkin Elmer® microplate reader, model EnSpire (Waltham, MA, USA) with a wavelength of 420 nm.

Determination of Catalase (CAT)

The analysis of catalase activity was through the measurement of H₂O₂ decay and oxygen generation [15]. The reading was performed on a Perkin Elmer® microplate reader, model EnSpire (Waltham, MA, USA) at the wavelength of 240 nm.

Determination of Total Glutathione (GT), Reduced Glutathione (GSH) and Oxidized Glutathione (GSSG)

The formation of TNB (thionitrobenzoic acid) was monitored spectrophotometrically at 412 nm through the supernatant added in flat bottom microplates, resulting from the reaction of two reduced glutathione (GSH) molecules and one of dithio-bis-nitrobenzoic acid. In the presence of

glutathione reductase and NADPH, the oxidized glutathione (GSSG) resulting from the first reaction (or one already present in the sample) is reconverted into GSH which is reoxidized to GSSG forming more TNB and obtaining the amounts of total glutathione (GT) in the sample. The amount of GSSG was obtained by calculation through the subtraction of $GT - GSH / 2$ [16].

Statistical analysis

Data management and statistics were performed with the SPSS Statistic® 20 program (IBM, Armonk, NY, USA). Initially, normal distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test) were checked. If these criteria were reached ($p \geq 0.05$), variables were evaluated by analyses of variance (ANOVA) complemented with Tukey test or Dunnett T3. Data that did not reach normal distribution and homogeneity of variance criteria were analyzed by the non-parametric test of Kruskal-Wallis complemented with Dunn's test. Associations between two categorical systems were checked using analyses of contingency Tables (Chi-square tests).

Measurements of OS/NS and metabolic biomarkers, as dependent variables in all groups (CTL; 3a; 3b; 4), hypertension, diabetes and statin use as exploratory variables were assessed using multivariate general linear model (GLM) analysis (MANOVA). The receiver operating characteristic (ROC) curve results by the difference in optimizing area under the curve were used to describing and comparing the accuracy of diagnostic. Conclusions were established at $p \leq 0.05$.

Results

Table 1 shows the socio-demographic data of the individuals in our study. There were no significant differences in gender ratio, ethnicity and age among the groups but the ratio of subjects with diabetes, hypertension, and statin use, differed between the control group, and pre-dialysis (3a, 3b and 4) patients.

Table 1: Demographic data of the control and pre-dialytic groups.

	CTL (23)	3a (23)	3b (34)	4 (30)	F/X ²	d.f.	p
Age (years)	66.09±2.03	67.61±2.10	68.62±1.71	69.30±1.62	0.536	3/110	0.658
Gender (n)							
Male (61)	12 (10.9%)	13 (11.8%)	20 (18.2%)	16 (14.5%)	0.32	3	0.956
Female (49)	11 (10%)	10 (9.1%)	14 (12.7%)	14 (12.7%)			
Ethnicity (n)							
Caucasian (83)	15 (13.6%)	18 (16.4%)	27 (24.5%)	23 (20.9%)	1.71	3	0.635
No Caucasian (27)	8 (7.3%)	5 (4.5%)	7 (6.4%)	7 (6.4%)			
Diabetic (n)							
No (64)	23 (20.9%)	10 (9.1%)	19 (17.3%)	12 (10.9%)	22.72	3	<0.001 *
Yes (46)	0	13 (11.8%)	15 (13.6%)	18 (16.4%)			
Hypertensive (n)							
No (30)	20 (18.2%)	2 (1.8%)	7 (6.4%)	1 (0.9%)	54.74	3	<0.001 *
Yes (80)	3 (2.7%)	21 (19.1%)	27 (24.5%)	29 (26.4%)			
Use of statin (n)							
No (68)	23 (20.9%)	9 (8.2%)	18 (16.4%)	12 (16.4%)	20.39	3	<0.001 *
Yes (42)	0	14 (12.7%)	16 (14.5%)	18 (10.9%)			

Values are shown as mean±SD. Chi X2 test. *p<0.05 compared CKD group (3a, 3b and 4) to control group. CTL: Control group, 3a, 3b and 4: chronic kidney disease stages.

Table 2 shows the differences in the oxidative stress variables between control individuals and CKD patients. ANOVA indicated that, compared to the pre-dialytic groups, controls presented lower levels of SOD (F=11.72, df=3, p<0.001); GT (F=3.96, df=3, p<0.001); GSH (F=8.11, df=3, p=0.005); NOx (F=12.40, df=3, p<0.001) and AOPP (F=16.78, df=3, p=0.005). Moreover, AOPP was higher in the CKD group 4 when compared to the 3a.

Table 2. Oxidative stress biomarkers in the pre-dialytic groups compared with control.

	CTL (n=23)	3a (n=23)	3b (n= 34)	4 (n=30)	F	d.f.	P
SOD (activity/gHb/min)	39.39±3.31	59.99±3.12*	65.36±3.071*	64.98±3.65*	11.72	3	<0.001
CAT (activity/min/gHb)	53.84±3.61	59.06±2.57	58.46±2.84	58.73±2.88	0.55	3	0.645
PON-1 (U/mL)	191.59±10.21	187.05±9.01	177.89±7.60	174.56±7.47	0.84	3	0.473
GT (mM /gHb) ^ϕ	5.86±0.67	6.88±0.31*	6.50±0.21	6.77±0.19*	3.96	3	<0.01
GSH (mM/gHb) ^ϕ	4.46±0.17	5.48±0.18*	5.27±0.17*	5.57±0.15*	8.11	3	0.005
GSSG (mM/gHb) ^ϕ	1.32±0.62	0.61±0.05	0.61±0.04	0.59±0.33	0.30	3	0.824
NOx (μmol/L) ^ϕ	5.85±0.33	9.60±1.03*	11.94±1.05*	10.65±0.76*	12.40	3	<0.001
LOOH (URL x 10 ⁶) ^ϕ	1.6±0.13	1.49±0.09	1.60±0.12	1.54±0.16	0.26	3	0.850
SH (μmol/L) ^ϕ	329.75±12.97	349.08±6.27	340.72±8.53	325.41±8.97	1.42	3	0.239
AOPP (μmol/L/eq. Cloramin T)	63.36 (37.24-110.79)	85.12 (63.09-147.71)*	88.47 (57.67-277.01)*	127.66 (64.90-366.96)*#	16.78	3	0.005

Parametric data were analyzed with ANOVA complemented with Tukey or T3 Dunnett and are expressed as means ± standard error. Non-parametric data were analyzed by Kruskal-Wallis complemented with Dunn's test and are expressed as Median (minimum-maximum values). *different from CTL; # different from 3a; ^ϕ These variables were processed in Ln transformation. CTL: control; 3a, 3b and 4: chronic kidney disease stages; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; PON: paraoxonase; GT: Total glutathione; GSH: Reduced Glutathione; GSSG: Oxidized Glutathione; NOx: nitric oxide metabolites; LOOH: Lipid hydroperoxides; SH: sulfhydryl groups; AOPP: Advanced Protein Oxidation Products. URL: Unity relative of light.

In Table 3, the biochemical markers are presented. Compared to the control, in glucose (F=20.32, df=3, p<0,01); uric acid (F=7.81, df=3, p<0.05); total cholesterol (F=6.70, df=3, p<0.01); LDL (F= 7.66, df=3, p<0.001); triglycerides (F= 11.36, df=3, p=0.007); creatinine (F=192.63, df=3, p<0.01); eGFR (F=333.62, df=3, p<0.001); RPC (F=3.68, df=3, p=0.02) and homocysteine (F=17.52, df=3, p<0.04) between control group and stages 3-4 CKD patients. The analysis of oxidative stress between pre dialysis patients (Table 4) showed only significant differences in AOPP values (F=6.42, df=2, p<0,01);

Table 3. Biochemical markers in the pre-dialytic groups compared with control.

	CTL (n=23)	3a (n=23)	3b (n=34)	4 (n=30)	F	d.f.	P
Total protein (g/dL)	7.36±0.07	7.37±0.10	7.30±0.068	7.35±0.09	0.17	3	0.91
Glucose (mg/dL)	95.00 (77.00-111.00)	111.00 (86.00-172.00)*	100.50 (62.00-254.00)	130.00 (48.00-386.00)*	20.32	3	<0.01
Uric acid (mg/dL) ^ϕ	5.10±0.25	6.73±0.43*	6.60±0.24*	7.27±0.39*	7.81	3	<0.05
Total cholesterol (mg/dL)	197.78±7.91	151.00±7.62*	156.79±7.02*	163.80±7.33*	6.71	3	<0.01
LDL (mg/dL) ^ϕ	126.04±6.64	85.68±6.84*	89.05±5.80*	88.03±4.77*	7.66	3	<0.001
HDL (mg/dL) ^ϕ	49.43±2.42	48.56±1.86	46.90±2.25	45.90±2.42	0.69	3	0.560
Triglycerides (mg/dL)	94.0 (42.0-308.0)	104.0 (59.0-229.0)	109.0 (55.0-282.0)	161.0 (40.0-364.0)*	11.36	3	0.007
Creatinine (mg/dL) ^ϕ	0.95±0.03	1.29±0.03*	1.73±0.03*#	2.54±0.08*#&	192.63	3	<0.01
eGFR (mL/min/1.73m ²)	70.75±2.16	51.69±1.02*	37.00±0.62*#	23.38±0.72*#&	333.62	3	<0.001
CRP (mg/L) ^ϕ	2.40±0.39	2.66±0.47	5.24±1.06	5.73±1.04*	3.68	3	0.02
AST (U/L) ^ϕ	19.52±1.48	20.52±0.93	20.53±1.14	23.09±1.78	1.13	3	0.340
ALT (U/L) ^ϕ	26.57±2.16	28.56±1.65	29.67±1.78	33.35±2.78	1.32	3	0.257
Homocysteine (umol/L) ^ϕ	11.80±0.61	14.75±0.76*	17.68±1.02*#	20.35±0.97*#	17.52	3	<0.04

Parametric data were analyzed with ANOVA complemented with Tukey or T3 Dunnet and are expressed as means ± standard error. Non-parametric data were analyzed by Kruskal-Wallis complemented with Dunn's test and are expressed as Median (minimum-maximum values). * different from control; # different from 3a; & different from 3b. ^ϕ These variables were processed in Ln transformation. 3a, 3b and 4: chronic kidney disease stages; CTL: control; LDL: Low-Density Lipoprotein; HDL: High-Density Lipoprotein; eGFR: Estimated glomerular filtration rate; CRP: Protein C reactive; AST: Aspartate Amino Transferase; ALT: Alanine aminotransferase.

In relation to the results only among the diseased stages, the single OS/NS marker that presented a significant difference was AOPP (data not shown), presenting increased levels as the disease progresses and presenting all different stages among them. Regarding the biochemical parameters, homocysteine was increased in stage 4 of CKD when compared to stage 3a (data not shown).

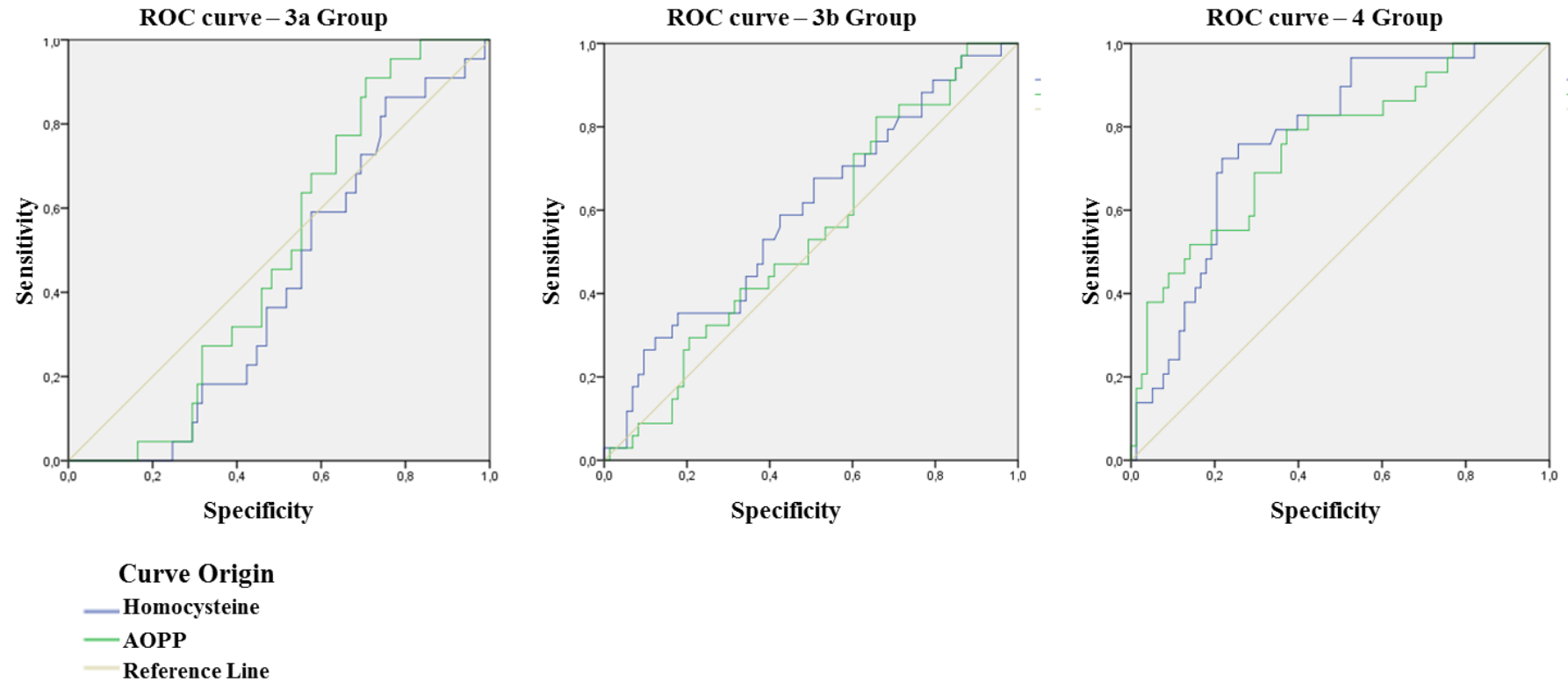
In a multivariate GLM analysis with the 10 OS/NS biomarkers and 4 biochemical markers (creatinine, homocysteine, total protein and uric acid) as dependent variables (Table 4) we found that CKD diagnosis/stages, sex, diabetes, hypertension and use of statin were associated with alterations in these Post-hoc univariate analyses showed that CKD diagnosis/stages was positively associated with uric acid, creatinine, homocysteine, SOD activity, GSH, NO and, AOPP.

Table 4: Results of multivariate GLM analysis with 10 oxidative stress (O&NS) biomarkers, creatinine, homocysteine, total protein and uric acid as dependent variables and, all groups (CTL; 3a; 3b; 4), hypertension, diabetes and statin use as exploratory variables.

Analysis	Dependent variables	Exploratory variables	F	d.f.	P
Multivariate	Creatinine, homocysteine, total protein, uric acid and all 10 O&NS variables	Diagnosis	3.76	15	<0.001
		Sex	2.61	15	0.007
		Diabetes	2.97	15	0.003
		Hypertension	8.67	15	<0.001
		Statin use	0.91	15	0.548
Univariate	Uric acid (mg/dL)	Diagnosis (CTL<3-4)	5.44	3	0.002
	Creatinine (mg/dL)	Diagnosis (CTL<3-4)	173.25	3	<0.001
		Sex (F<M)	25.52	1	<0.001
		Hypertension (+)	17.24	1	<0.001
		Diabetes (+)	4.82	1	<0.001
		Diagnosis (CTL<3-4)	16.69	3	<0.001
	Homocysteine (umol/L)	Diagnosis (CTL<3-4)	12.12	3	<0.001
	SOD (USOD/gHb/min)	Diagnosis (CTL<3-4)	6.71	3	<0.001
	GT (mM /gHb)	Diagnosis (CTL<3-4)	8.45	3	<0.001
	GSH (mM/gHb)	Diagnosis (CTL<3-4)	4.76	1	0.033
		Sex (F<M)	4.76	1	0.033
	NOx (µmol/L)	Diagnosis (CTL<3b;4)	4.57	3	0.006
	AOPP (µmol/L)	Diagnosis (CTL<3b;4/3a;3b<4)	10.49	3	<0.05

O&NS: Oxidative and nitrosative stress; SOD: superoxide dismutase; GT: Total glutathione; GSH: Reduced Glutathione; NOx: nitric oxide metabolites; AOPP: Advanced Protein Oxidation Products.

Figure 1: ROC curve of AOPP and Homocysteine in patients with CKD in the pre-dialytic stages 3a, 3b 3 4.



The results from receiver operating characteristic (ROC) analysis, which indicate is a way of representing the relationship between the sensitivity and specificity of a quantitative diagnostic test, are presented with the area under the curve (AUC). Homocysteine reached significance (AUC± standard error) of 0.25 ± 0.06 , $p=0.002$ in stage 3a, and 0.70 ± 0.005 , $p=0.005$ in stage 4. The AUC values of AOPP presented a significant difference only in stage 4, presenting values of 0.70 ± 0.06 , $p=0.004$.

Discussion

The main finding of this study was the AOPP is an important biomarker of OS/NS in CKD, and it is significantly increased along the disease progression to stages 3a, 3b and 4. In addition, AOPP presented expressive results as OS/NS biomarker related to specificity and sensitivity, especially in the more advanced stages of the disease. OS/NS modifies proteins irreversibly and the rise of AOPP in the plasma of patients with CKD indicates the effects of this phenomena highlighting the importance of protein oxidation during the development of CKD [17].

In addition, the AOPP also presented a good result in the ROC analysis, emphasizing the relation of the test performed with the CKD. AOPP is considered to be a good marker for OS/NS because of its role in the pathophysiology of CKD and the complications that the increase in these products can cause, once it is an independent risk factor for cardiovascular events [18].

In the study by Gryszczynska et al. (2017), it was found that in CKD both in the non-dialytic stages and in the dialytic stages of the disease there is an increase in the formation of AOPP [17]. Increased AOPP levels and the accumulation of these products generated by OS/NS lead to the acceleration of atherosclerosis [17]. The study by Zuo and Yu (2018) also found increased AOPP levels in patients with diabetic CKD compared to controls with respect to antioxidants defenses [19].

When comparing stages 3a, 3b and 4 of CKD with control subjects we checked a significant increase in the antioxidant biomarkers of GSH, GT, and SOD as well as an increase in the levels of the pro-oxidative biomarkers NO_x and AOPP. This result of increased antioxidant substances can be interpreted as a response of the organism to the increase of oxidative compounds, in order to compensate for the damage caused by them.

GSH is a tripeptide molecule found in normal cells in vivo that has antioxidant properties, such as the removal of oxygen ions and other reactive species [19]. This fact can be explained because, in the intermediates stages of the disease, the organism can increase the production of antioxidant substances in order to combat the OS/NS. The study by Bober et al. (2010) found GSH levels increased in stage 4 of the CKD when compared to control individuals [20].

SOD is a defense enzyme against oxidant species, responsible for the conversion of the superoxide anion into oxygen and hydrogen peroxide. In this study it was increased when compared to control. However, Sahni, Gupta, and Bhalla (2012) reported that SOD

levels were significantly decreased in patients with CKD in stages 3b to 5, when compared to control subjects. In addition, CAT was decreased in the severe and moderate CKD groups when compared to the control group, which could not be observed in our results [21]. This difference in these results can be explained because the mentioned study used different stages in the same group to carry the analyses out. The same situation can be verified in the study by Xu et al., (2015) and Chen et al., (2016) where SOD also presented decreased levels in patients in the pre-dialytic stages [6,22].

PON-1 is a protein that has the ability to hydrolyze organophosphorus compounds such as paraoxon and carboxylic esters such as phenylacetate, and has peroxidase activity. It is found in plasma HDL and can protect LDL from oxidation, thus possessing antioxidant activity [23,24]. In this study, it was not possible to observe a significant difference in PON-1 levels in stages 3a, 3b and 4 of CKD compared to control individuals. Corroborating these results, the Samouilidou et al., (2018) also report no significant differences in PON-1 levels when comparing control subjects to pre-dialytic CKD patients from 1 to 5 [24].

Regarding NOx, Bahadoran et al., (2016) also found increased levels in patients with CKD (eGFR <60mL/min/1.73 m²) when compared to subjects controls. In addition, they demonstrated a direct association between serum NOx and CKD [25]. The progression of intermediate CKD to more advanced stages is related to the increase in OS/NS in these patients [26]. This was possible to observe with our results, however, levels of PON, GSSG, LOOH and SH did not show significant divergence between the different stages of CKD when compared to control individuals.

High concentrations of uric acid have the potential to cause renal damage and may be associated as a cause of insulin resistance and hypertension, which are risk factors for CKD [27]. In these patients renal clearance is decreased, leading to the accumulation of uremic solutes, known as uremic toxins, which are organic compounds too bulky to be filtered by the kidneys, or are bound to proteins [28].

The levels of total cholesterol and LDL were decreased in the patients compared to control. This result can be explained by the fact that patients use statins to control the lipid profile and control subjects do not use this type of medication. Uzun et al., (2008) demonstrated that total cholesterol did not present significant difference in stage 4 to 5 in CKD patients compared to control subjects [29]. The study of Papavasiliou et al., (2005) showed that the total cholesterol of the patients in stages 3 to 5 was increased in comparison to healthy individuals used as controls. In addition, the same study did not find significant differences in LDL and HDL levels compared to control group [30]. According to

Samouilidou et al., (2018) LDL values did not show a significant difference between CKD patients in stages 1 to 5 compared to individuals who were not ill [24]. In accordance with our study, another study also found decreased total cholesterol and LDL compared to healthy subjects in stages 2 to 3 [22]. The difference in the results of these studies to ours can be justified by the union of the stages of the disease.

Total protein, HDL, AST, and ALT did not present significant differences between CKD patients and control. A study also found no significant difference in total protein values, comparing CKD in the early and advanced stages to the control group [21]. Regarding glucose levels, our study found a significant increase in groups 3a and 4 when compared to the control group. Chen et al., (2016) reported that levels of glucose were significantly increased in patients in stages 2 to 3 compared to control [22].

CRP presented a significant increase only in group 4 compared to control. A possible explanation for this result is that CKD patients in more advanced stages have more comorbidities that contribute to the increase of the inflammation state. Uzun et al., (2008) demonstrated that CRP was increased in patients with stage 4 to 5 CKD when compared to healthy subjects [29]. In the other hand, Chen et al., (2016) demonstrated that CRP did not present significant difference in stage 2 and 3 patients when compared to controls, corroborating to our results [22].

Triglyceride values were increased only in stage 4 of CKD when compared to control subjects. Increased triglyceride levels are commonly found in patients with CKD. This increase might mean, among other things, the presence of remaining chylomicrons, which has the capacity to penetrate the vascular endothelium, contributing to the atherosclerotic process [31]. In the study by Papavasiliou et al., (2005) it was found that patients in stages 3 to 5 presented increased triglyceride values when compared to healthy individuals [30]. Zuo and Yu (2018) also found significantly increased triglyceride levels in diabetic CKD patients when compared to control group [19]. In this context, the triglyceride levels of CKD patients in stages 2 to 3 did not present significant values when compared to control subjects, as reported by Chen et al., (2016), corroborating our results [22].

Homocysteine is an amino acid that is not involved in protein synthesis, being an intermediate in the metabolism of methionine [32]. In our study homocysteine presented high levels in CKD patients compared to control group, as well as between stages 3a and 4 of the disease. High levels of homocysteine are found in patients with CKD and are associated with vascular problems in these patients. According to Chen et al., (2016) CKD patients in stages 2

to 3 presented increased homocysteine values when compared to the healthy control group [22].

The increase in homocysteine levels is found in approximately 85% of CKD patients, which can be explained by impaired renal metabolism and decreased renal excretion [33]. In a cohort study, Ye et al., (2016) found the prevalence of high homocysteine in 1042 individuals [33]. Homocysteine exerts a series of pathogenic actions in vascular processes, which are already aggravated in CKD patients. It is able to induce OS and acts as an antagonist to the vasodilatory properties of endothelial nitric oxide [32].

Regarding the diagnosis of CKD, creatinine is increased in men when compared to women and has a positive correlation with hypertension and diabetes. Diabetes can damage glomerular blood vessels and the first sign of a kidney problem is the presence of proteinuria. About one-third of diabetic people may eventually develop CKD [34].

Conclusion

According the results, it was possible to conclude that CKD has a high impact on the biochemical and OS/NS changes compared to people who are not ill and that these alterations imply the worsening of the disease. In addition, it was possible to verify that even with the increase of reactive species and the OS/NS, the organism has a tendency to protect itself, increasing its antioxidant defenses in order to avoid or repair the damage caused by the aggressive agents.

At last, AOPP presented itself as a good OS/NS marker for these patients and should get greater attention from the scientific community in order to study it more deeply in the non-dialytic stages of CKD.

Conflict of interests

There are no conflicts of interest with regard to this article.

Acknowledgements

The State University of Londrina, CAPES, and Araucaria foundation.

References

- [1] N. Krata, R. Zagożdżon, B. Foroniewicz, K. Mucha, Oxidative Stress in Kidney Diseases : The Cause or the Consequence ?, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 66 (2018) 211–220. doi:10.1007/s00005-017-0496-0.
- [2] H. Ali, T. Abdelaziz, F. Abdelaal, J. Baharani, Assessment of Prevalence and Clinical Outcome of Frailty in an Elderly Predialysis Cohort Using Simple Tools, *Saudi J. Kidney Dis. Transplant*. 28 (2017) 716–724.
- [3] O.L. Aiyegbusi, D. Kyte, P. Cockwell, T. Marshall, A. Gheorghe, T. Keeley, A. Slade, M. Calvert, Measurement properties of patient-reported outcome measures (PROMs) used in adult patients with chronic kidney disease: A systematic review, *PLoS One*. 12 (2017) 1–27. doi:10.1371/journal.pone.0179733.
- [4] R.B. De Oliveira, H. Okazaki, A.E.M. Stinghen, Z.A. Massy, V. Jorgetti, Calcificação vascular em doença renal crônica : uma revisão, *J. Bras. Nefrol*. 35 (2013) 147–161. doi:10.5935/0101-2800.20130024.
- [5] S. Ruiz, P.E. Pergola, R.A. Zager, N.D. Vaziri, S. Antonio, F. Hutchinson, Targeting the Transcription Factor Nrf2 to Ameliorate Oxidative Stress and Inflammation in Chronic Kidney Disease, *Kidney Int*. 83 (2013) 1029–1041. doi:10.1038/ki.2012.439.Targeting.
- [6] G. Xu, K. Luo, H. Liu, T. Huang, X. Fang, G. Xu, K. Luo, H. Liu, T. Huang, X. Fang, W. Tu, The progress of inflammation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease, *Ren. Fail*. 37 (2015) 45–49. doi:10.3109/0886022X.2014.964141.
- [7] V. Jha, G. Garcia-garcia, K. Iseki, Z. Li, S. Naicker, B. Plattner, R. Saran, A.Y. Wang, C. Yang, Chronic kidney disease : global dimension and perspectives, *Lancet*. 382 (2013) 260–272.
- [8] B. Flecha, S. Llesuy, A. Boveris, Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence: An Assay For Oxidative Stress In Biopsies Of Heart, Liver, And Muscle, *Free Radic. Biol. Med*. 10 (1991) 93–100.
- [9] J.A. Navarro-González, C. García-Benayas, J. Arenas, Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological, *Clin. C*. 22 (1998) 679–681.
- [10] V. Witko-Sarsat, M. Friedlander, C. Capeillère-Blandini, T. Nguyen-Khoa, A.T. Nguyen, J. Zingraff, P. Jungers, B. Descamps-Latscha, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney Int*. 49 (1996) 1304–1313. doi:10.12659/msm.894347.
- [11] M. Hanasand, R. Omdal, K.B. Norheim, L.G. Gøransson, C. Brede, G. Jonsson, Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma, *Clin. Chim. Acta*. 413 (2012) 901–906. doi:10.1016/j.cca.2012.01.038.
- [12] M.L. Hu, Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma, *Methods Enzymol*. 233 (1994) 380–385. doi:10.1016/S0076-6879(94)33044-1.

- [13] R.J. Richter, G.P. Jarvik, C.E. Furlong, Methods in Genetics and Clinical Interpretation Determination of Paraoxonase 1 Status Without the Use of Toxic Organophosphate Substrates, *J. Am. Heart Assoc.* (2008) 2–7. doi:10.1161/CIRCGENETICS.108.811638.
- [14] S. Marklund, G. Marklund, Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase, *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 469–474. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.
- [15] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [16] F. Tietze, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and other tissues, *Anal. Biochem.* 27 (1969) 502–522.
- [17] B. Gryszczyńska, D. Formanowicz, M. Budzy, M. Wanic-kossowska, E. Pawliczak, P. Formanowicz, W. Majewski, K.W. Wojciech, M.P. Kasprzak, M. Iskra, Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases, *Biomed Res. Int.* 2017 (2017).
- [18] M. Dziejczak, E. Orłowska, B. Petkiewicz, A. Bednarek-Skublewska, J. Solski, M. Goździewska, Levels of renalase and advanced oxidation protein products with regard to catecholamines in haemodialysed patients, *Ann. Agric. Environ. Med.* 24 (2017) 453–458. doi:10.5604/12321966.1233567.
- [19] M. Zuo, J. Tang, M. Xiang, Q. Long, J. Dai, G. Yu, H. Zhang, H. Hu, Clinical observation of the reduced glutathione in the treatment of diabetic chronic kidney disease, *J. Cellular Biochem.* (2018) 1–9. doi:https://doi.org/10.1002/jcb.28135.
- [20] J. Bober, K. Kedzierska, E. Kwiatkowska, E. Stachowska, E. Golembiewska, O. Mazur, Z. Staniewicz, K. Ciechanowski, D. Chlubek, Does oxidative stress affect the activity of the sodium-proton exchanger ?, *Ann. Acad. Med. Stetin.* 56 (2010) 5–12.
- [21] N. Sahni, K.L. Gupta, A.K. Bhalla, Intake of Antioxidants and their Status in Chronic Kidney Disease Patients, *J. Ren. Nutr.* 22 (2012) 389–399. doi:10.1053/j.jrn.2011.09.002.
- [22] C. Chen, W. Yang, Y. Hsiao, S. Huang, Y. Huang, High homocysteine , low vitamin B-6 , and increased oxidative stress are independently associated with the risk of chronic kidney disease, *Nutrition.* 32 (2016) 236–241. doi:10.1016/j.nut.2015.08.016.
- [23] D.J. Kennedy, W.H.W. Tang, Y. Fan, Y. Wu, S. Mann, M. Pepoy, S.L. Hazen, Diminished Antioxidant Activity of High-Density Lipoprotein – Associated Proteins in Chronic Kidney Disease, *J. Am. Heart Assoc.* (2013) 1–7. doi:10.1161/JAHA.112.000104.
- [24] E. Samouilidou, E. Bountou, F. Papandroulaki, M. Papamanolis, D. Papakostas, E. Grapsa, Serum Endocan Levels are Associated With Paraoxonase 1 Concentration in Patients With Chronic Kidney Disease, *Ther. Apher. Dial.* 22 (2018) 325–331. doi:10.1111/1744-9987.12654.
- [25] Z. Bahadoran, P. Mirmiran, Z.T. Nejad, F. Azizi, Serum nitric oxide is associated with

- the risk of chronic kidney disease in women : Tehran lipid and glucose study, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 5513 (2016). doi:10.3109/00365513.2016.1149880.
- [26] A. Modaresi, M. Nafar, Z. Sahraei, Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease, *Iran. J. Kidney Dis.* 9 (2015) 165–179.
- [27] K. Nashar, L.F. Fried, Hyperuricemia and the Progression of Chronic Kidney Disease : Is Uric Acid a Marker or an Independent Risk Factor ?, *Adv. Chronic Kidney Dis.* 19 (2012) 386–391. doi:10.1053/j.ackd.2012.05.004.
- [28] J. Jansen, J. Jankowski, P.R. Gajjala, J.F.M. Wetzels, R. Masereeuw, Disposition and clinical implications of protein-bound uremic toxins, *Clin. Sci.* 131 (2017) 1631–1647. doi:10.1042/CS20160191.
- [29] H. Uzun, D. Konukoglu, M. Besler, F. Erdenen, C. Sezgin, C. Muderrisoglu, The effects of renal replacement therapy on plasma , asymmetric dimethylarginine , nitric oxide and C- reactive protein levels, *Clin Invest Med.* 31 (2008) 1–7.
- [30] E. Papavasiliou, C. Gouva, K.C. Slamopoulos, A.L.D. TSelepis, Erythrocyte PAF-acetylhydrolase activity in various stages of chronic kidney disease : Effect of long-term therapy with erythropoietin, *Kidney Int.* 68 (2005) 246–255. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00399.x.
- [31] A.B. Reiss, I. Voloshyna, J. DeLeon, N. Miyawaki, J. Mattana, Cholesterol Metabolism in CKD, *HHS Public Access.* 35 (2016) 1252–1260. doi:10.1177/0333102415576222.Is.
- [32] G. Cianciolo, A. de Pascalis, L. Lullo, C. Ronco, C. Zannini, G. La Manna, Folic Acid and Homocysteine in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease Progression : Which Comes First ?, *Cardio Ren. Med.* 7 (2017) 255–266. doi:10.1159/000471813.
- [33] Z. Ye, Q. Zhang, Y. Li, C. Wang, J. Zhang, X. Ma, H. Peng, High Prevalence of Hyperhomocysteinemia and Its Association with Target Organ Damage in Chinese Patients with Chronic Kidney Disease, *Nutrients.* 8 (2016) 2–12. doi:10.3390/nu8100645.
- [34] KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease, 3 (2012). doi:10.1038/kisup.2012.76.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A DRC tem alto impacto nas alterações bioquímicas verificadas neste estudo e que essas alterações corroboram estudos realizados anteriormente com esses pacientes.

Além disso, o EO/EN apresentou-se como um fator presente nos pacientes com DRC quando comparadas a indivíduos saudáveis. Essas alterações implicam no agravamento da doença. Entretanto, foi possível verificar também que apesar de alguns marcadores de EO/EN apresentarem-se aumentados, outros do sistema antioxidante também se apresentaram elevados. Isso significa que o organismo dos indivíduos com DRC nos estágios iniciais e intermediários, possuem uma tendência de se proteger, aumentando suas defesas antioxidantes, a fim de evitar ou reparar os danos causados pelas espécies reativas.

Nesse contexto, a AOPP apresentou-se como um importante biomarcador de EO/EN para os pacientes com DRC, exibindo resultados elevados tanto quando comparados com indivíduos saudáveis como entre os estágios 3a, 3b e 4 ou seja apresentou elevações conforme a progressão da doença. Dessa forma, novos estudos deverão ser realizados para a comprovação da utilização do biomarcador AOPP como ferramenta no acompanhamento da evolução da DRC bem como no tratamento.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1894.
- AIYEBBUSI, O. L. et al. Measurement properties of patient-reported outcome measures (PROMs) used in adult patients with chronic kidney disease: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–27, 2017.
- ALI, H. et al. Assessment of Prevalence and Clinical Outcome of Frailty in an Elderly Predialysis Cohort Using Simple Tools. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 28, n. 4, p. 716–724, 2017.
- BATISTA, C. M. M. et al. Perfil epidemiológico dos pacientes em lista de espera para o transplante renal. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 30, n. 3, p. 280–286, 2017.
- CAMBRUSSI, A. N. C. O. et al. The role of nanotechnology in reducing oxidative stress: a review Anallyne. **Informative Geum Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 1–11, 2018.
- CAO, W. et al. Advanced Oxidation Protein Products Activate Intrarenal Renin–Angiotensin System via a CD36-Mediated, Redox-Dependent Pathway. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 1, p. 19–35, 2012.
- CAPELLI, I. et al. Folic Acid and Vitamin B12 Administration in CKD, Why Not? **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 383, 2019.
- CHEN, C. et al. High homocysteine , low vitamin B-6 , and increased oxidative stress are independently associated with the risk of chronic kidney disease. **Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 236–241, 2016.
- CIANCIOLO, G. et al. Folic Acid and Homocysteine in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease Progression : Which Comes First ? **Cardio Renal Medicine**, v. 7, p. 255–266, 2017.
- COTIGUIBA, G. G. et al. Methods of the Antioxidant Defense : A Literature Review. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231–238, 2013.
- DAENEN, K. et al. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology**, 2018.
- DAVIES, M. J. The oxidative environment and protein damage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1703, n. 2, p. 93–109, 2005.
- DENG, Q. et al. Huang Gan Formula Eliminates the Oxidative Stress Effects of Advanced Oxidation Protein Products on the Divergent Regulation of the Expression of AGEs Receptors via the JAK2/STAT3 Pathway. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- DUMMER, C.; THOMÉ, F.; VERONESE, F. Doença Renal Crônica, Inflamação e Aterosclerose: Novos conceitos de um velho problema. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 5, p. 446–450, 2007.
- DZIEDZIC, M. et al. Levels of renalase and advanced oxidation protein products with regard to catecholamines in haemodialysed patients. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 24, n. 3, p. 453–458, 2017.
- ESTEVEZ, M.; LUNA, C. Dietary Protein Oxidation : A Silent Threat to Human Health ? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 17, p. 1–51, 2016.

- FENG, W. et al. Advanced oxidation protein products aggravate cardiac remodeling via cardiomyocyte apoptosis in chronic kidney disease. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 314, n. 3, p. H475–H483, 2017.
- FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence: An Assay For Oxidative Stress In Biopsies Of Heart, Liver, And Muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, p. 93–100, 1991.
- FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199–206, 2013.
- FRANÇA, R. DE A. et al. Acúmulo dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) na pele: relações com o distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 5, p. 253–260, 2017.
- GARIBALDI, S. et al. Advanced Oxidation Protein Products-Modified Albumin Induces Differentiation of RAW264.7 Macrophages into Dendritic-Like Cells Which Is Modulated by Cell Surface Thiols. **Toxins**, v. 9, n. 1, p. 27, 2017.
- GRYSZCZYNSKA, B. et al. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- HANASAND, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 9–10, p. 901–906, 2012.
- HEERSPINK, H. J. L.; GANSEVOORT, R. T. Controversies in Nephrology Albuminuria Is an Appropriate Therapeutic Target in Patients with CKD : The Pro View. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, p. 1079–1088, 2015.
- HUANG, Q. T. et al. Higher plasma AOPP is associated with increased proteinuria excretion and decreased glomerular filtration rate in pre-eclamptic women. **Pregnancy Hypertension**, v. 3, n. 1, p. 16–20, 2013.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, Â. Glutathiona e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.
- JHA, V. et al. Chronic kidney disease : global dimension and perspectives. **The Lancet**, v. 382, p. 260–272, 2013.
- KALYANARAMAN, B. Redox Biology Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students : Oxidants , antioxidants and disease mechanisms \$. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 244–257, 2013.
- KAUR, J.; YOUNG, B. E.; FADEL, P. J. Sympathetic Overactivity in Chronic Kidney Disease: Consequences and Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1–18, 2017.
- KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. v. 3, n. 1, 2012.
- KOMENDA, P.; RIGATTO, C.; TANGRI, N. Estimated glomerular filtration rate and albuminuria. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 23, n. 3, p. 251–257, 2014.
- KRÜGER, R. L. et al. Estresse oxidativo e a função endotelial : efeitos do exercício físico associado à lipemia pós-prandial. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 14, n. 4, p. 328–340, 2015.

- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.
- MARQUITO, A. B. et al. Identifying potential drug interactions in chronic kidney disease patients. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 1, p. 26–34, 2014.
- MELGAÇO, SARAH S. C. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs nephrotoxicity. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 4, p. 382–390, 2010.
- MUN, K. H. et al. Effect of Uric Acid on the Development of Chronic Kidney Disease: The Korean Multi-Rural Communities Cohort Study. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v. 51, n. 5, p. 248–256, 2018.
- MURAVLYOVA, L. E. et al. The modified proteins in erythrocytes and regulation of erythrocytes volume in patients with chronic kidney disease. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 22, p. 4270–4274, 2015.
- NAVARRO-GONZÁLEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids. **Clinical Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 679–681, 1998.
- NERY, R. A. et al. Ácido Úrico e Reparação Tecidual. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 28, n. 4, p. 290–292, 2015.
- NOGUEIRA, A. et al. The Effects of Long-Term Chaetomelic Acid Administration on Renal Function and Oxidative Stress in a Rat Model of Renal Mass Reduction. **Biomedical Research International**, p. 1–10, 2017.
- OLIVEIRA, R. B. DE et al. Calcificação vascular em doença renal crônica : uma revisão. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 2, p. 147–161, 2013.
- PEREIRA, E. R. S. et al. Prevalência de doença renal crônica em adultos atendidos health strategy. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 1, p. 22–30, 2016.
- PEREIRA, M. B. P. O papel dos antioxidantes no combate ao estresse oxidativo observado no exercício físico de musculação. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 7, n. 40, p. 1–10, 2013.
- PEREZ-GOMEZ, M. V. et al. Clarifying the concept of chronic kidney disease for non-nephrologists. **Clinical Kidney Journal**, v. 12, n. 2, p. 258–261, 2019.
- PETRY, É. R. et al. Suplementações Nutricionais E Estresse Oxidativo : Implicações na atividade física e no esporte. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte (Impresso)**, v. 35, n. 4, p. 1071–1092, 2013.
- PUSHPAKUMAR, S. et al. Toll-like Receptor 4 Deficiency Reduces Oxidative Stress and Macrophage Mediated Inflammation in Hypertensive Kidney. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6349, 2017.
- RASOOL, M. et al. Comparative study of extrapolative factors linked with oxidative injury and anti-inflammatory status in chronic kidney disease patients experiencing cardiovascular distress. **PLoS ONE**, p. 1–13, 2017.
- REISS, A. B. et al. Cholesterol Metabolism in CKD. **HHS Public Access**, v. 35, n. 14, p. 1252–1260, 2016.
- RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Methods in Genetics and Clinical Interpretation

Determination of Paraoxonase 1 Status Without the Use of Toxic Organophosphate Substrates. **Journal of the American Heart Association**, p. 2–7, 2008.

SAHNI, N.; GUPTA, K. L.; BHALLA, A. K. Intake of Antioxidants and their Status in Chronic Kidney Disease Patients. **Journal of Renal Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 389–399, 2012.

SAYANTHOORAN, S. et al. Upregulation of Oxidative Stress Related Genes in a Chronic Kidney Disease Attributed to Specific Geographical Locations of Sri Lanka. **Biomedical Research International**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

SGNAOLIN, V. et al. Avaliação dos medicamentos utilizados e possíveis interações medicamentosas em doentes renais crônicos. **Scientia Medica**, v. 24, n. 4, p. 381–384, 2014.

SHUNMOOGAM, N.; NAIDOO, P.; CHILTON, R. Paraoxonase (PON) -1 : a brief overview on genetics , structure , polymorphisms and clinical relevance. **Vascular Health and Risk Management**, v. 14, p. 137–143, 2018.

SIGNORINI, L. et al. Naturally Occurring Compounds: New Potential Weapons against Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1481, 10 jul. 2017.

TANG, X. et al. Advanced oxidation protein products induce hypertrophy and epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubular cells through induction of endoplasmic reticulum stress. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 2, p. 816–828, 2015.

THAMPI, P. et al. Dietary homocysteine promotes atherosclerosis in apoE-deficient mice by inducing scavenger receptors expression. **Atherosclerosis**, v. 197, n. 2, p. 620–629, 2008.

THOMÉ, F. S. et al. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2017. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, p. 1–7, 2019.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, p. 502–522, 1969.

VERA, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory strategies based on the potentiation of glutathione peroxidase activity prevent endothelial dysfunction in chronic kidney disease. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 3, p. 1287–1300, 2018.

WAN, C.; SU, H.; ZHANG, C. Role of NADPH Oxidase in Metabolic Disease-Related Renal Injury: An Update. **Oxidative medicine and cellular longevity**, p. 1–8, 2016.

WANG, J. et al. Renal expression of advanced oxidative protein products predicts progression of renal fibrosis in patients with IgA nephropathy. **Laboratory Investigation**, v. 94, n. 9, p. 966–977, 2014.

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

WITKO-SARSAT, V.; GAUSSON, V.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? **Kidney International**, v. 63, n. 84, p. S11–S14, 2003.

YE, Z. et al. High Prevalence of Hyperhomocysteinemia and Its Association with Target Organ Damage in Chinese Patients with Chronic Kidney Disease. **Nutrients**, v. 8, n. 645, p. 2–12, 2016.

ZADRAŽIL, J. et al. Effect of different calcineurin inhibitors on AOPP and TAS after kidney transplantation. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 559–565, 2010.

ZHOU, L. L. et al. The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. **Kidney International**, v. 82, n. 7, p. 759–770, 2012.

ANEXOS

**LIFE SCIENCES****AUTHOR INFORMATION PACK****TABLE OF CONTENTS**

●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.2
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0024-3205

DESCRIPTION

Life Sciences is an international journal publishing articles that emphasize the molecular, cellular, and functional basis of therapy. The journal emphasizes the understanding of mechanism that is relevant to all aspects of human disease and translation to patients. All articles are rigorously reviewed. The Journal favors publication of full-length papers where modern scientific technologies are used to explain molecular, cellular and physiological mechanisms. Articles that merely report observations are rarely accepted. Recommendations from the Declaration of Helsinki or NIH guidelines for care and use of laboratory animals must be adhered to. Articles should be written at a level accessible to readers who are non-specialists in the topic of the article themselves, but who are interested in the research. The Journal welcomes reviews on topics of wide interest to investigators in the life sciences. We particularly encourage submission of brief, focused reviews containing high quality artwork and require the use of mechanistic summary diagrams. Manuscripts should present novel preclinical findings addressing questions of biological significance to human disease. Studies that fail to do so may be rejected without review. Quantitative conclusions must be based on truly quantitative methods. Life Sciences does not publish work on the actions of biological extracts of unknown chemical composition. Compounds studied must be of known chemical structure and concentration. The study must be reproducible; materials used must be available to other researchers so they can repeat the experiment. Clinical studies may be considered if they expand understanding of mechanism, but the journal does not encourage clinical trial reports. Four common reasons for rejection include: out of scope (the manuscript does not conform to the goal of identification of mechanisms related to therapy for human disease); too preliminary (manuscript is based on a limited amount of experimental data diminishing significance); lack of novelty (manuscript is well done but does not address a significant question); unidentified structure (actions of biological extracts of unknown chemical composition).

AUDIENCE

Pharmacologists, microbiologists, toxicologists, neurobiologists, immunologists.

MPACT FACTOR

2017: 3.234 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

Elsevier BIOBASE
 BIOSIS
 MEDLINE®
 PsycINFO
 Nutrition Abstracts
 Energy Research Abstracts
 Energy Data Base
 Ophthalmic Literature
 EMBASE
 PASCAL/CNRS
 PsycLIT CD-ROM
 Biological and Agricultural Index
 Reference Update
 Current Contents
 EMBiology
 Scopus

EDITORIAL BOARD***Editor-in-Chief:***

L.E. Wold, College of Nursing, Department of Physiology and Cell Biology, DHLRI, The Ohio State University,
 473 W. 12th Avenue, Columbus, Ohio, OH 43210, USA

Managing Editor:

C. Kisthardt, Tucson, Arizona, USA

Statistics Editor

L. A. Szalacha, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA

Associate Editors:

B.J. Biesiadecki, Columbus, Ohio, USA

F. del Monte, Charleston, South Carolina, USA

F. Gao, Xi'an, China

L.H. Rogers, Columbus, Ohio, USA

T. Sanderson, Ann Arbor, Michigan, USA

F. Sheikh, La Jolla, California, USA

F. M. Souza-Smith, New Orleans, Louisiana, USA

K.I. Stanford, Columbus, Ohio, USA

M. Velten, Bonn, Germany

Editorial Advisory Board:

E. Antunes, Campinas (SP), Brazil

J.W. Calvert, Atlanta, Georgia, USA

K. Campbell, Lexington, Kentucky, USA

S. Campbell, New Haven, Connecticut, USA

M. Canis, Göttingen, Germany

C. Carnes, Columbus, Ohio, USA

J.C. Chatham, Birmingham, Alabama, USA

Z. Chen, Duarte, California, USA

J.T. Cheng, Tainan, Taiwan

B. Colson, Tucson, Arizona, USA

J.M. Daniel, New Orleans, Louisiana, USA

A.J. Davidoff, Biddeford, Maine, USA

G. de Nucci, São Paulo, , Brazil

G. Ertl, Würzburg, Germany

F Ferguson, Phoenix, , Arizona, USA
A.V. Gomes, Davis, California, USA
G. Haddad, Washington, Washington, USA
J. Heller Brown, La Jolla, California, USA
R.N. Kitsis, Bronx, New York, USA
R.A. Kloner, Los Angeles, California, USA
S. Lange, La Jolla, California, USA
M. Li, Orangeburg, New York, USA
R. Liao, Boston, Massachusetts, USA
G. Mattace Raso, Napoli NA, Italy
U. Mende, Providence, Rhode Island, USA
L. Nelin, Columbus, Ohio, USA
T.R. Nurkiewicz, Morgantown, West Virginia, USA
N. Paolucci, Baltimore, Maryland, USA
J. Privratsky, Durham, North Carolina, USA
N. Purcell, La Jolla, California, USA
J.R. Richardson, Rootstown, Ohio, USA
M. Robbins, Chicago, Illinois, USA
K. Singh, Johnson City, Tennessee, USA
S. Takasawa, Kashihara, Nara, Japan
B. Tanner, Pullman, Washington, USA
T. Tipple, Birmingham, Alabama, USA
N. Weisleder, Columbus, Ohio, USA
C. Wingard, Louisville, , Kentucky, USA
Q. Zhang, Iowa City, Iowa, USA
M. Ziolo, Columbus, Ohio, USA.

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. **To find out more, please visit the Preparation section below.**

INTRODUCTION

Life Sciences is an international journal publishing articles that emphasize the molecular, cellular, and functional basis of therapy. All articles are rigorously reviewed. The Journal favors publication of full-length papers where modern scientific technologies are used to explain molecular, cellular and physiological mechanisms. Articles that merely report observations are rarely accepted. Articles should be written at a level accessible to readers who are non-specialists in the topic of the article themselves, but who are interested in the research. The Journal welcomes reviews on topics of wide interest to investigators in the life sciences. We particularly encourage submission of focused reviews containing high-quality artwork and mechanistic diagrams.

IMPORTANT INFORMATION

- Submission of a paper will be held to imply that the manuscript contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere.
- Manuscripts should present novel findings addressing significant biological questions. Studies that fail to do so may be rejected without review.
- Quantitative conclusions must be based on truly quantitative methods.
- *Life Sciences* does not publish work on the actions of biological extracts of unknown chemical composition. Compounds studied must be of known chemical structure and concentration.
- The study must be reproducible; materials used must be available to other researchers so they can repeat the experiment.

For more details on how to write a world class paper, please visit our Pharmacology Author Resources page.

Please include word count and figure/table count on the cover page of your manuscript.

Authors are encouraged to submit video material or animation sequences to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

Types of article

- Original research articles
- Reviews

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

• A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare

• Journal policies detailed in this guide have been reviewed

• Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care

and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Conflict of Interest Policy

The Journal requires full disclosure of all potential conflicts of interest. At the end of the manuscript text, under a subheading "Conflict of Interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, the authors should state: "The authors declare that there are no conflicts of interest." See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. A signed Conflict of Interests Policy Form is required upon submission. The corresponding author is responsible for completing the form, and signing it on behalf of all authors.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

Authorship

All authors listed on your paper must have made significant contributions to the study. To ensure clarity, you are required upon submission to enter the specific details of each author's contribution, which must substantiate the inclusion of each person on the manuscript. This information is required to be filled in on the Conflict of Interests Policy and Author Statement Form.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following

from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases. For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peerreviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The gold open access publication fee for this journal is **USD 3400**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more. This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<https://www.elsevier.com/journals>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though

manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's page in EES, removing the need for a hard-copy paper trail. Specific queries can be directed to lifesci@elsevier.com.

Referees

To expedite the review process, authors must submit names of 4 - 6 individuals who are qualified to review their work. Include the email address of each potential referee, as much contact information as possible, and why you feel this person is competent to review your work. You should not have collaborated with the suggested reviewers at any time in the past five years. In our effort to enhance global perspective and communication of science, these individuals should be associated with institutions from as many different regions as possible (Europe, North America, Asia, etc.). Exception: Symposium submissions which have been previously reviewed and approved by their Organizing Committee.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a double blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance

or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

Double-blind review

This journal uses double-blind review, which means the identities of the authors are concealed from the reviewers, and vice versa. More information is available on our website. To facilitate this, please include the following separately:

Title page (with author details): This should include the title, authors' names, affiliations, acknowledgements and any Declaration of Interest statement, and a complete address for the corresponding author including an e-mail address.

Blinded manuscript (no author details): The main body of the paper (including the references, figures, tables and any acknowledgements) should not include any identifying information, such as the authors' names or affiliations.

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). For language assistance, please see Language Services, above. Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Organization of the manuscript

Beginning with the first page, present your manuscript in the order below:

1. Title: First letter capitalized, subsequent letters in lower case. Maximum length 150 characters including spaces. Avoid abbreviations.
- 2a. Names of all authors.
- 2b. Affiliations of all authors. If necessary, use superscripted lowercase letters after the author's name to distinguish affiliations.
3. Author to whom proofs and correspondence should be sent, including name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address.
4. A structured abstract has to be submitted for full length articles (not for reviews) of no more than 250 words. The following headings must be used:

Aims:

Main methods:

Key findings:

Significance:

5. Three or more key words for indexing purposes. In addition to key words from the title, please suggest other terms that help define the study. We encourage authors to test the relevance of their key words by using them for a database search and comparing the results with the topic of their own paper.

Word limits: In **full papers**, individual sections should be no longer than Abstract 250 words, Introduction 500 words, Discussion 1500 words, Conclusion 150 words. Materials and Methods and Results sections should be concise but there is no formal word limit.

Headings: Papers must include the major headings Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgments, and References. Include subheadings as appropriate. Review articles must contain Abstract and Introduction, with subsequent headings and subheadings as appropriate.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

Present the conclusions of the study in a short Conclusions section.

The Graphical Abstract is optional for research articles, but mandatory for reviews. GAS should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Refer to the following website for more information

<https://www.elsevier.com/graphicalabstracts>.

Abbreviations

Abbreviations must be explained the first time they are used, both in the Abstract and again in the main text. Abbreviations used as names of cell lines do not need to be explained, but the species and tissue of origin should be made clear in text the first time the cell line is mentioned. Examples: "the human colonic adenocarcinoma cell line Caco-2" or "the porcine renal endothelial cell line LLC-PK1".

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.). Please note that funding information must appear under the Acknowledgments heading.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., M James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/life-sciences> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data

refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect. In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

MethodsX You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple *MethodsX* articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. *MethodsX*, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their *MethodsX* article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to *MethodsX* where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in *MethodsX*. Full details can be found on the *MethodsX* website. Please use this template to prepare your *MethodsX* article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.