



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

REYNALDO MIGUITA JUNIOR

**EFEITO DO REÚSO E DO TIPO DA MEMBRANA DO  
DIALISADOR SOBRE A ATIVIDADE DA PARAOXONASE 1  
DE PACIENTES EM HEMODIÁLISE**

---

Londrina  
2018

REYNALDO MIGUITA JUNIOR

**EFEITO DO REÚSO E DO TIPO DA MEMBRANA DO  
DIALISADOR SOBRE A ATIVIDADE DA PARAOXONASE 1  
DE PACIENTES EM HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares  
Delfino.

Co-orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini  
Barbosa.

Londrina  
2018

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

Migueta Junior, Reynaldo.

Efeito do reuso e do tipo da membrana do dialisador sobre a atividade da paraoxonase 1 de pacientes em hemodiálise / Reynaldo Migueta Junior. - Londrina, 2018.  
81 f.

Orientador: Vinicius Daher Alvares Delfino.

Coorientador: Décio Sabbatini Barbosa.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.  
Inclui bibliografia.

1. Hemodiálise - Tese. 2. Doenças Cardiovasculares - Tese. 3. Arildialquilfosfatase - Tese. I. Delfino, Vinicius Daher Alvares. II. Barbosa, Décio Sabbatini. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

REYNALDO MIGUITA JUNIOR

**EFEITO DO REÚSO E DO TIPO DA MEMBRANA DO DIALISADOR  
SOBRE A ATIVIDADE DA PARAOXONASE 1 DE PACIENTES EM  
HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Daher A. Delfino  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Cintia Magalhães Carvalho Grion  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Luis Alberto Batista Peres  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -  
UNIOESTE

Londrina, 23 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho aos meus professores de hoje e de ontem, aos meus amigos, à minha família e aos meus pacientes.

## **AGRADECIMENTOS**

Dr. Vinicius D. A. Delfino, obrigado por ser meu orientador neste mestrado e pela amizade e companheirismo desde os tempos de minha residência médica.

Dr. Décio S. Barbosa, obrigado por ser meu co-orientador neste trabalho, pela atenção e por todas as contribuições para este estudo.

À Andressa Keiko Matsumoto, Ana Paula Michelin, Denise Duarte Santiago e toda equipe do laboratório de pós-graduação do HURNPR pela contribuição na realização das análises laboratoriais.

À equipe de enfermagem do Instituto do Rim de Londrina – Histocom pela contribuição no processo de coleta das amostras de sangue para o estudo.

Dra. Cintia Magalhães Carvalho Grion e Dr. Luis Alberto Batista Peres, obrigado pelo tempo dedicado à leitura desta dissertação, pelas correções e valiosas sugestões.

À minha amiga Dra. Ana Cristina Cardeal pelo apoio e por assumir os cuidados na clínica de hemodiálise enquanto eu me dedicava às atividades do mestrado.

À minha família pelo carinho e apoio.

Deus, obrigado por me ajudar a seguir em frente nos momentos de dúvidas.

MIGUITA JUNIOR, Reynaldo. **Efeito do reuso e do tipo da membrana do dialisador sobre a atividade da paraoxonase 1 de pacientes em hemodiálise.** 2018. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

## RESUMO

A doença cardiovascular (DCV) é uma importante causa de mortalidade em pacientes renais crônicos em hemodiálise. Possui gênese multifatorial e responde por quase 50% das mortes nessa população. Pacientes em hemodiálise apresentam perfil lipídico anormal, caracterizado por níveis elevados de triglicérides e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e níveis diminuídos de lipoproteínas de alta densidade (HDL). A paraoxonase 1 (PON 1) é a proteína responsável pela maior parte da atividade antioxidante da HDL e níveis reduzidos de PON 1 estão associados à maior ocorrência de eventos cardiovasculares em várias populações. Estudos demonstraram que a atividade da PON 1 encontra-se diminuída na doença renal crônica e que, após a sessão de hemodiálise, a atividade da PON 1 eleva-se. Em pacientes em hemodiálise, a atividade reduzida da PON 1 foi demonstrada estar associada à maior mortalidade cardiovascular. A prática do reuso do dialisador permite que programas de diálise com escassos recursos financeiros se mantenham e, embora os estudos não tenham encontrado diferença com relação à mortalidade comparada com o uso único do dialisador, poucos trabalhos avaliaram os efeitos do reuso do dialisador sobre estresse oxidativo e a atividade da PON 1. Este estudo teve como objetivo identificar o efeito do reuso e do tipo da membrana do dialisador (polinefron e polietersulfona) sobre a atividade da PON 1 de pacientes em hemodiálise. Participaram do estudo 30 pacientes renais crônicos em hemodiálise no Instituto do Rim de Londrina – Histocom. Foram dosados, pré e pós diálise, no primeiro uso e após o sexto reuso dos dialisadores: atividade plasmática da PON 1, sistemas de defesa antioxidante: superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona total (GT), glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG); marcadores de agressão oxidativa: hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e produtos avançados de oxidação proteica (AOPP). Os valores de atividade da PON 1, SOD, catalase, GT, GSH, GSSG, AOPP e LOOH foram comparados entre pré e pós diálise no primeiro uso e após sexto reuso do dialisador polinefron e polietersulfona. A atividade da PON 1 pós-diálise foi maior ( $P < 0,001$ ) do que a pré-diálise tanto no primeiro uso como após o sexto reuso. A atividade da PON 1 no primeiro uso do dialisador polinefron se elevou de 139,4 U/mL pré-diálise para 181,5 U/mL pós-diálise e com o dialisador de polietersulfona partiu de 153,3 U/mL pré-diálise para 166,7 U/mL pós diálise. No sétimo uso dos dialisadores, encontramos atividade de PON 1 pré-diálise de 133,5 U/mL e de 141,9 U/mL para os dialisadores polinefron e polietersulfona, respectivamente. Após a sessão de hemodiálise do sétimo uso os valores encontrados para a atividade da PON 1 foram 166,7 U/mL e 164,5 U/mL com o dialisador polinefron e polietersulfona, respectivamente. Encontramos aumento dos níveis de LOOH após as sessões de hemodiálise e os níveis de AOPP mantiveram-se inalterados após as sessões de hemodiálise. Os marcadores de defesa antioxidante estudados não apresentaram modificações significativas em quando se compararam os valores pré e pós diálise. O reuso do dialisador e o tipo de membranas estudados não interferiram com a melhora da atividade da PON 1.

Portanto, o reuso dos dialisadores de polinefron e polietersulfona, submetidos a seis processos de reuso, não interfere com o aumento da atividade da PON 1 que se observa após o uso único destes capilares e nem piora as defesas antioxidantes intracelulares estudadas, não influenciando negativamente nenhum destes dois parâmetros.

**Palavras-chave:** Insuficiência Renal Crônica. Hemodiálise. Doenças Cardiovasculares. Arildialquilfosfatase. Estresse oxidativo. Reutilização de Equipamento.



MIGUITA JUNIOR, Reynaldo. **Effect of the dialyzer reuse and the membrane type on the activity of paraoxonase 1 of patients in hemodialysis.** 2018. 81 pp. Dissertation (Master in Health Sciences) – Londrina State University, Londrina. 2018.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases comprise the leading cause of death in end-stage renal disease patients. It has a multifactorial genesis, and accounts for almost 50% of deaths in this population. Patients on hemodialysis have an abnormal lipid profile characterized by elevated levels of triglycerides and low density lipoproteins (LDL) and decreased levels of high density lipoprotein (HDL). Paraoxonase 1 (PON 1) has attracted significant interest in being the protein responsible for most of the antioxidant activity of HDL. Reduced levels of PON 1 activity are associated with more cardiovascular events in several populations. In hemodialysis patients, reduced PON 1 activity has been shown to be associated with increased cardiovascular mortality. The practice of reusing the dialyzer allows dialysis programs with scarce financial resources to remain, and although studies have found no difference in mortality compared to single use of dialyzer, few studies have evaluated the effects of dialyzer reuse on oxidative stress and on the activity of PON 1. This study aimed to identify the effect of reuse and dialyzer membrane type (polynephron and polyethersulfone) on the PON 1 activity of hemodialysis patients. The study included 30 patients on hemodialysis at the Instituto do Rim de Londrina – Histocom. We dosed, pre- and post- dialysis, in the first use and after the sixth reuse of the dialyzers: the plasma activity of PON 1, antioxidant defense systems: superoxide dismutase (SOD), catalase, total glutathione (GT), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG); markers of oxidative aggression: lipid hydroperoxides (LOOH) and advanced protein oxidation products (AOPP). The values of the activity of PON 1, SOD, catalase, GT, GSH, GSSG, AOPP and LOOH were compared between pre- and post-dialysis in the first use and after sixth reuse of the polynephron and polyethersulfone dialyzers. Post-dialysis PON 1 activity was greater ( $P < 0.001$ ) than pre-dialysis in both the first and sixth reuse. The activity of PON 1 in the first use of the polynephron dialyzer rose from 139.4 U/mL pre-dialysis to 181.5 U/mL post-dialysis and with the polyethersulfone dialyzer from 153.3 U/mL pre-dialysis to 166.7 U/mL post-dialysis. In the seventh use of the dialyzers, we found PON 1 pre-dialysis activity of 133.5 U/mL and 141.9 U/mL for the dialyzers polynephron and polyethersulfone, respectively. After the hemodialysis session of the seventh dialyzer use the values found for PON 1 activity were 166.7 U/mL and 164.5 U/mL with the polynephron and polyethersulfone dialyzers, respectively. We found increased LOOH levels after hemodialysis sessions and the AOPP levels remained unchanged after the hemodialysis sessions. Antioxidative defense markers studied showed similar pre- and post-dialysis results. The reuse of the dialyzer and the type of membranes studied did not interfere with the improvement of PON 1 activity. Therefore, the reuse of the polynephron and polyethersulfone dialyzers, submitted to six reuse processes, does not interfere with the increase of the PON 1 activity observed after the single use of these dialyzers and neither worsens the intracellular antioxidant defenses studied, and does not negatively influence any of these two parameters.

**Key words:** Chronic kidney failure. Hemodialysis. Cardiovascular diseases. Paraoxonase 1. Oxidative stress. Hemodialyzer. Equipment reuse

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS MOLECULARES

AAMI	<i>Association for the Advancement of Medical Instrumentation</i> (Associação para o Avanço da Instrumentação Médica)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOPP	<i>Advanced oxidation protein products</i> (produtos avançados de oxidação proteica)
BPA	<i>Bisphenol</i> (bisfenol)
CVD	<i>Cardiovascular diseases</i>
DCV	Doença cardiovascular
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DRC	Doença renal crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPIs	Equipamentos de proteção individual
ESRD	<i>End-stage renal disease</i>
GSH	<i>Reduced glutathione</i> (glutathione reduzida)
GSSG	<i>Oxidized glutathione</i> (glutathione oxidada)
GT	<i>Total glutathione</i> (glutathione total)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Radical hidroperóxil
IRA	Injúria renal aguda
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)
LDL-ox	<i>Oxidized low-density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade oxidada)
LOOH	<i>Lipid hydroperoxides</i> (hidroperóxidos lipídicos)
MPC1	Proteína de quimioatração de monócitos -1
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Íon superóxido
O <sub>3</sub>	Ozônio
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxila

ONOOOH	Peroxinitrito
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PON 1	Paraoxonase 1
RLU	<i>Relative light units</i> (unidades relativas de luz)
ROO	Radical Peroxil
ROOH	Peróxidos orgânicos
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SOD	<i>Superoxide dismutase</i> (superóxido dismutase)
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1	BREVE HISTÓRIA DO TRATAMENTO DE HEMODIÁLISE .....	16
2.2	REÚSO DOS DIALISADORES .....	17
2.2.1	Técnica de Reúso do Dialisador em Máquinas Reprocessadoras.....	20
2.3	PARAOXONASE 1 .....	21
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO .....	24
2.4.1	Principais Espécies Reativas de Oxigênio.....	25
2.4.2	Metais de Transição .....	26
2.4.3	Alvos Biológicos do Estresse Oxidativo .....	27
2.4.4	Mecanismos de Defesa Celular Contra o Estresse Oxidativo.....	27
2.4.5	Marcadores do Estresse Oxidativo .....	29
2.5	ESTRESSE OXIDATIVO E HEMODIÁLISE .....	30
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
3.1	OBJETIVO GERAL .....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4</b>	<b>PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	34
4.1	DELINEAMENTO.....	34
4.2	POPULAÇÃO.....	34
4.3	AMOSTRA	34
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	34
4.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	34
4.6	COLETA DE DADOS.....	35
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>5</b>	<b>ARTIGO</b> .....	39
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	63

**REFERÊNCIAS** .....64

**APÊNDICES** 74

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....75

**ANEXOS**.....77

ANEXO A – Aprovação do CEP/UEL .....78

## 1 INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular (DCV) é um importante fator de mortalidade em pacientes renais crônicos em diálise. Possui gênese multifatorial, e responde por quase 50% das mortes nesta população (1,2). Pacientes em hemodiálise apresentam perfil lipídico anormal, caracterizado por níveis elevados de triglicérides e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e níveis diminuídos de lipoproteína de alta densidade (HDL) (3). As paraoxonases são enzimas que foram inicialmente descritas por sua capacidade de hidrólise sobre compostos organofosforados exógenos como, por exemplo, o metabólito ativo do pesticida agrícola paration, o paraoxon (4).

A paraoxonase 1 (PON 1) tem atraído significativo interesse por ser a proteína responsável pela maior parte da atividade antioxidante da HDL (5). A PON 1 associada à HDL atua prevenindo a oxidação da LDL e seus efeitos deletérios (6). Níveis reduzidos da atividade da PON 1 estão associados a mais eventos cardiovasculares em várias populações (7,8,9). Em pacientes em hemodiálise, a atividade reduzida da PON 1 foi demonstrada estar associada à maior mortalidade cardiovascular (10).

No tratamento dos pacientes renais crônicos por hemodiálise, utiliza-se um filtro (dialisador) que é composto por fibras ocas formadas por uma membrana semipermeável onde ocorrem as trocas entre o sangue e o fluido de diálise (dialisato). O tratamento se repete três vezes por semana com duração aproximada de quatro horas cada sessão de hemodiálise. As membranas dos hemodialisadores são compostas por diferentes substâncias como celulose, celulose modificada, celulose sintética e membranas sintéticas como a polietersulfona, que são mais biocompatíveis.

Recentemente, uma nova membrana sintética, polinefron, foi introduzida no mercado nacional. Tal membrana é composta de polietersulfona mas, diferentemente do que ocorre com outras membranas de diálise, é desprovida de bisfenol (BPA) em sua estrutura. O BPA é um composto orgânico sintético com potencial de interferir no funcionamento de várias glândulas endócrinas. Estudo recente demonstrou ocorrer significativo aumento de BPA plasmático em pacientes hemodialisados com membranas de polietersulfona e que o inverso ocorre em pacientes dialisados com polinefron. Além disto, ocorreu aumento de marcadores de

estresse oxidativo nos pacientes utilizando polietersulfona comparado com o polinefron (11).

Os dialisadores podem ser desprezados após uso único ou serem processados manual ou automaticamente e serem posteriormente reutilizados, sempre para o mesmo paciente (prática do reúso). Esta prática possui vantagens e desvantagens, porém, no Brasil e em muitos outros países ocorre principalmente por motivos econômicos.

Estudos têm demonstrado que após a sessão de hemodiálise a atividade da PON 1 aumenta (12,13). Não se sabe a influência do reúso e do tipo da membrana do dialisador na atividade da PON 1. Além disto, há poucos estudos sobre efeito do reúso sobre a atividade antioxidante enzimática intracelular. O efeito do reúso de um dialisador desprovido de BPA e de outro com, sobre marcadores de oxidação lipídica e proteica e sobre a atividade antioxidante em pacientes em hemodiálise ainda não são completamente entendidos. O paciente em hemodiálise apresenta estresse oxidativo aumentado e inflamação que estão associados à mortalidade cardiovascular elevada. O conhecimento do efeito do reúso e do tipo de membrana do dialisador na atividade da PON 1 e as repercussões sobre o ambiente redox intracelular, peroxidação lipídica e oxidação avançada de proteínas pode influenciar as diretrizes e legislações que regulamentam a prática do reúso do dialisador.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BREVE HISTÓRIA DO TRATAMENTO DE HEMODIÁLISE

A hemodiálise como a conhecemos e praticamos hoje é fruto da persistência e capacidade criativa de seus precursores. A criação de um “órgão artificial” para o tratamento da insuficiência renal teve início no século passado, em 1913, com John Abel e colaboradores relatando a primeira aplicação dos princípios de difusão para a remoção de substâncias do sangue de animais vivos. Abel, Rowntree e Turner denominaram o aparato de “rim artificial” e este era feito de tubos de celoidina imersos em um dialisato envolto em uma carapaça de vidro. Em animais anestesiados, uma cânula arterial era conectada ao aparato e o sangue retornava por outra cânula para uma veia. Apenas a pressão arterial movia o sistema e a anticoagulação era feita com hirudina, um anticoagulante natural encontrado em sanguessugas.

A primeira diálise em humanos foi comandada por Georg Hass em outubro de 1924 e durou apenas 15 minutos. As cânulas vasculares foram inseridas na artéria radial esquerda e na veia antecubital sob anestesia local. Hass realizou o procedimento em mais alguns pacientes nos anos de 1925 e 1926, mas o curto tempo de diálise juntamente com o baixo fluxo sanguíneo e pequeno volume de dialisato impediram resultados terapêuticos adequados.

A descoberta da heparina como anticoagulante e uso de celofane no lugar da celoidina foram avanços importantes para que Willem Johan Kolff realizasse a primeira diálise bem sucedida em 1945, na Holanda ocupada pela Alemanha durante a segunda guerra mundial. Uma paciente com injúria renal aguda (IRA), com ureia próxima a 370 mg/dL e potássio 13,7 mEq/L foi dialisada por 11 horas e meia. A ureia caiu para 112 mg/dL e o potássio para 4,7 mEq/L e a paciente recuperou-se da IRA.

Gordon Murray e colaboradores construíram um “rim artificial” no porão da casa de Murray em 1946 no Canadá. A primeira sessão de diálise na América foi em 6 de dezembro de 1946, em uma mulher jovem que estava comatosa, apresentando convulsões e com IRA. Esta primeira diálise foi interrompida após uma hora devido a intensos calafrios (o dialisato não era aquecido e as condições de esterilidade do sistema não podiam ser asseguradas).



Posteriormente, a paciente tolerou oito horas de diálise em um dia e mais seis horas, três dias depois. Pouco tempo depois, ela recuperou-se completamente. É desconhecido o número de pacientes tratados com diálise por Murray, e também não se sabe porque eles pararam de usar o “rim artificial” (14,15).

Os aparatos de hemodiálise evoluíram e os dialisadores que eram feitos artesanalmente começaram a ser industrializados no início da década de 1960. Contribuições importantes de médicos como o Dr. Scribner, que desenvolveu um *shunt* arteriovenoso radial-cefálica externo permitindo o acesso vascular para pacientes em hemodiálise crônica e, posteriormente, a criação da fístula arteriovenosa com vasos nativos que diminuiu a frequência de problemas como trombose e infecções, foram fatores que permitiram a utilização da hemodiálise como um tratamento crônico (16).

## 2.2 REÚSO DOS DIALISADORES

O reúso dos dialisadores já tem mais de um século de história. Em 1913 aquele primeiro dialisador desenvolvido por Abel, foi reutilizado muitas vezes. A primeira descrição de reúso de dialisador em humanos foi em 1964 por Shaldon, que refrigerava o dialisador coil contendo o sangue heparinizado do paciente até a próxima diálise (17). Inicialmente o reúso do dialisador se justificava por conveniência no programa de hemodiálise domiciliar para reduzir a necessidade de reconstrução dos dialisadores Kiil e, posteriormente por motivos econômicos e por melhora da biocompatibilidade do dialisador.

As máquinas de reprocessamento automatizadas surgiram em 1980-81 e contribuíram para um aumento na prática do reúso. No início dos anos 90 a prática do reúso dominava o cenário nos Estados Unidos, com 78% dos tratamentos realizados com dialisadores reprocessados; em outros países como Austrália o reúso era feito por 27% das unidades de diálise. A prática do reúso do dialisador é proibida por lei no Japão.

A prática do reúso do dialisador é alvo de muita discussão; há aspectos favoráveis a esta prática e outros que geram controvérsias e falam contra. A dificuldade em se estabelecer um estrito controle sobre os requisitos para esterilidade e funcionamento dos dialisadores reusados, surtos esporádicos de endotoxemia e sepse nos Estados Unidos foram os principais argumentos contra a

prática do reuso. Porém, a prática do reuso tem ajudado a reduzir o custo e viabilizar o tratamento de hemodiálise, permitindo o uso de dialisadores mais modernos e mais caros, como os dialisadores de alto fluxo. Quando realizada obedecendo os critérios de esterilidade e cuidados para se verificar a integridade do dialisador, provê um tratamento seguro e efetivo para os pacientes. Em países cujos recursos financeiros são escassos para o financiamento da hemodiálise, a prática do reuso tem permitido que os programas de diálise se mantenham. A prática do reuso evita que toneladas de material plástico sejam descartadas com um custo ambiental que não pode ser desconsiderado; limitar a geração de lixo plástico hospitalar é um ponto positivo do reuso (18).

Uma das principais preocupações quanto a prática do reuso dos dialisadores é a mortalidade. A maioria dos estudos que avaliaram esta questão são de baixa qualidade e não encontraram diferença de mortalidade entre o grupo de uso único do dialisador e o grupo de reuso do dialisador. Em alguns estudos em que houve uma diferença estatística, as diferenças não foram observadas em todos os grupos e os estudos variaram quanto ao tipo de desinfetante, ao tempo de observação e unidade de tratamento (hospitalar x ambulatorial). Estudos patrocinados por fabricantes de desinfetantes não mostraram diferenças na mortalidade, enquanto estudos patrocinados por fabricantes de dialisadores mostraram um menor risco de mortalidade com o uso único do dialisador. Uma revisão sistemática da literatura sobre esta questão não encontrou diferença na mortalidade com a prática do reuso do dialisador comparada com o uso único (19).

Potenciais efeitos nocivos à saúde pela prática do reuso incluem a exposição acidental dos profissionais de saúde envolvidos na prática do reuso a elevadas concentrações de germicidas. Os pacientes, também, podem ficar expostos a concentrações residuais dos germicidas nos dialisadores, com consequências adversas a longo prazo. O principal agente germicida utilizado atualmente no reuso dos dialisadores é o ácido peracético. O ácido peracético é nocivo às membranas mucosas, especialmente aquelas do trato respiratório, e também à pele e aos olhos. Sua inalação pode provocar inflamação e edema da laringe e brônquios e, em casos mais graves, pneumonite química e edema pulmonar, porém estes riscos podem ser praticamente abolidos com a exaustão adequada da sala de reuso e com o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) pelos profissionais envolvidos no reuso (20).

O reúso do dialisador exige a adoção dos padrões de desinfecção das agências reguladoras dessa prática; nos Estados Unidos, esse padrão é definido pela *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI) e no Brasil, essa prática é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O processo de reúso está sujeito ao erro humano. Podem ocorrer falhas, por exemplo, no procedimento de diluição do germicida, o que aumenta o risco de reações pirogênicas nos pacientes e de surtos de bacteremia. A possibilidade de efeitos nocivos ao meio ambiente com os resíduos dos germicidas também merece atenção (20).

A prática do uso único do dialisador elimina o gasto com funcionários e com os insumos necessários (máquina reprocessadora do dialisador, germicidas, água, espaço físico). O avanço tecnológico e o crescimento da indústria de dialisadores permitiram a redução dos custos de dialisadores de alto fluxo. O uso único evita a exposição dos pacientes aos germicidas e diminui a possibilidade de bacteremias por erros no processo de esterilização do dialisador. Aquelas reações do primeiro uso, comuns quando eram utilizadas membranas menos biocompatíveis e com esterilização com óxido de etileno eram reduzidas pelo reúso dos dialisadores, mas hoje não representam uma preocupação porque as membranas mais modernas oferecem maior biocompatibilidade e o método de esterilização com óxido de etileno foi substituído por outros métodos, como radiação gama, vapor e, recentemente, por feixe de elétrons (20).

O uso único do dialisador confere às clínicas de hemodiálise uma grande vantagem operacional ao simplificar o processo, pois não há necessidade de treinar um técnico para esta finalidade, de se manter um arquivo com os registros do reúso e de ter uma sala dedicada ao processo do reúso e ao armazenamento do dialisador reprocessado (20).

No Brasil, a prática do reúso está prevista na legislação, que permite a prática de 20 usos do dialisador para o mesmo paciente quando o reprocessamento é automatizado em máquinas registradas pela ANVISA ou 12 usos se o reprocessamento for manual. A prática de reúso é proibida para pacientes com sorologia positiva para hepatite B, hepatite C e HIV. A regulamentação da prática do reúso determina que o registro da utilização de um novo conjunto de dialisador e linha arterial e venosa deva ser assinado pelo paciente e arquivado, é obrigatória a medida do volume interno das fibras “*priming*” em todos os dialisadores antes do

primeiro uso e após cada reuso subsequente, mantendo arquivados os registros de dados referentes a todos os testes. Qualquer resultado indicando uma redução superior a 20% do volume interno das fibras inicial torna obrigatório o descarte do dialisador.

### 2.2.1 Técnica de Reuso do Dialisador em Máquinas Reprocessadoras

O processo do reuso do dialisador começa antes mesmo do primeiro uso, o técnico responsável pelo reuso dos dialisadores da clínica de hemodiálise deve fazer a aferição do volume interno das fibras do dialisador antes do primeiro uso e fazer esta anotação na ficha de controle. O conjunto formado por dialisador e linhas arterial e venosa deve ser identificado com o nome do paciente. Após a sessão de hemodiálise o sangue do paciente retorna pela linha venosa e o sistema recebe solução salina de forma que a menor quantidade de sangue permaneça no sistema. O conjunto é inspecionado visualmente e acondicionado em recipiente próprio com a identificação do paciente e encaminhado para a sala de reuso. Na sala de reuso, o técnico responsável novamente inspeciona o dialisador quanto a presença de coágulos e resíduo de sangue. Se o dialisador estiver em condições de reuso, o técnico toma nota do número de reusos praticados no livro controle de reuso e o dialisador é instalado na máquina reprocessadora para iniciar sua limpeza. A máquina reprocessadora realiza a limpeza utilizando água tratada com osmose reversa e deixa o dialisador livre de partículas. Após a limpeza, a máquina reprocessadora realiza testes de pressão e de volume interno das fibras do dialisador. O teste de pressão verifica a presença de fibras rompidas no dialisador, enquanto que o teste de volume assegura que a capacidade do dialisador encontre-se acima de 80% do valor aferido e anotado na ficha de controle antes do primeiro uso. Se houver fibras rotas ou se o teste de volume acusar redução para menos de 80% da capacidade padrão, o dialisador é descartado e substituído por um novo.

Após a limpeza e teste do dialisador pela máquina reprocessadora, o conjunto dialisador e linhas arteriais e venosas é preenchido por um agente desinfetante (ácido peracético a 0,2%) e armazenado por pelo menos 12 horas. Imediatamente antes do próximo uso, o conjunto é submetido a rigoroso enxágue com solução salina até que todo o desinfetante seja removido. A confirmação de remoção do desinfetante é realizada por meio de um teste com reagente que acusa

a presença do desinfetante pela mudança de cor da solução testada; somente após este teste final o dialisador é liberado para o tratamento dialítico.

### 2.3 PARAOXONASE 1

As paraoxonases receberam este nome devido a sua capacidade de hidrolizar o paraoxônio, metabólito tóxico do inseticida paration (4,5). A PON 1 é uma proteína de 354 aminoácidos com massa molecular de 43kDa e está altamente conservada em mamíferos, mas ausente em pássaros, peixes e invertebrados. No soro humano, a PON 1 está quase exclusivamente localizada na HDL. A PON 1 pertence à família das paraoxonases séricas, consistindo de paraoxonase 1, paraoxonase 2 e paraoxonase 3. Os genes responsáveis pela codificação das paraoxonases encontram-se no braço longo do cromossomo 7. O fígado é o principal tecido para a expressão genética da PON 1, que também ocorre nos rins e cólon (21).

Estudos demonstraram que os substratos nativos das paraoxonases são as lactonas e que a hidrólise da homocisteína tiolactona pela PON 1 é considerada protetora contra a doença coronariana (22,23). Em 1991, Mackness e colaboradores demonstraram que a PON 1 poderia prevenir o acúmulo de lipoperóxidos na LDL e que este poderia ser o mecanismo responsável pelo efeito protetor da HDL no desenvolvimento da doença aterosclerótica coronariana. Com o reconhecimento do papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da aterosclerose e a descoberta do efeito antioxidante da HDL, a PON 1 atraiu significativo interesse como a proteína responsável pela maior parte das propriedades antioxidantes desta lipoproteína (6,24). Após estes achados, as pesquisas científicas direcionadas à esta enzima aumentaram significativamente.

As estatinas (pitavastatina, sinvastatina, atorvastatina e rosuvastatina) aumentam a transcrição da PON 1; este efeito pode ter um potencial de influenciar mecanismos antiaterogênicos ao nível da HDL (25,26,27).

Dois polimorfismos foram observados na sequência codificadora da PON 1: uma substituição de leucina (L) por metionina (M) na posição 55 e uma substituição de arginina (R) por glutamina (Q) na posição 192. Esses polimorfismos da paraoxonase determinam os níveis da enzima e sua função. Resultados in vitro demonstraram que a variante PON1\*192R hidroliza o paraoxônio mais rapidamente

do que a variante PON1\*192Q, mas hidroliza o diazoxônio menos rapidamente (28). Os polimorfismos genéticos da PON 1 têm sido associados à doença coronariana, à glicemias mais elevadas e à nefropatia em pacientes com diabetes melito tipo 2, e à complicações microvasculares precoces em pacientes com diabetes melito tipo 1 (29). O polimorfismo 55L>M afeta a concentração da PON1, enquanto o polimorfismo 192Q>R é responsável por diferenças no substrato específico da atividade hidrolítica da enzima (30).

A propriedade de inibir a oxidação da LDL *in vitro* gerou a expectativa de que a PON 1 poderia ter um papel protetor no desenvolvimento de doença cardiovascular. No entanto, a validade destes achados vinha sendo questionada uma vez que a proteção contra a oxidação *in vitro* poderia ser decorrente da ação do detergente utilizado durante o preparo ou mesmo por outros compostos de baixa massa molecular copurificados com a paraoxonase (31). Vários estudos com animais demonstraram o papel protetor da PON 1 contra a aterogênese: camundongos deficientes em PON 1 apresentam maior estresse oxidativo sérico e em macrófagos, fenômenos que podem contribuir para a aterosclerose acelerada (32). A HDL isolada de camundongos deficientes em PON 1 não foi capaz de proteger a LDL da oxidação, enquanto a HDL isolada de camundongos transgênicos para a PON 1 humana foi mais eficaz na proteção da oxidação da LDL, de forma dose dependente (33).

O primeiro camundongo *knockout* para PON 1 tornou-se disponível em 1998. Os macrófagos desse camundongo não foram eficazes em proteger a HDL de oxidação por outras células *in vitro*, e estes camundongos desenvolveram precocemente aterosclerose, quando comparados com os camundongos controle sob uma dieta rica em gordura e colesterol. Estes achados são fortes evidências que a PON 1 exerce um papel protetor na aterogênese (34).

Faltava ainda uma evidência definitiva *in vivo* que a PON 1 promoveria efeitos antioxidantes em seres humanos. Os estudos iniciais envolviam pequeno número de participantes e não examinavam conjuntamente a atividade da PON 1, seu genótipo e eventos cardiovasculares. Um estudo com 1353 homens com idade entre 49 e 65 anos demonstrou que baixo nível de atividade de paraoxonase contra o paraoxônio é um fator de risco independente para eventos coronarianos em homens de alto risco devido à doença preexistente ou outros fatores de risco cardiovasculares (35). Mas foi em 2008 que surgiu a evidência mais robusta de um

potencial mecanismo protetor da aterogênese pela PON 1 em humanos, com a publicação de um estudo que avaliou prospectivamente 1399 pacientes sequenciais que se submeteram a angiografia coronariana diagnóstica em Cleveland, Ohio. Os resultados deste estudo demonstraram uma associação dose-dependente do genótipo da PON 1 Q192R (QQ192>QR192>RR192) com menores níveis de atividade sérica da paraoxonase e com elevado estresse oxidativo. Os participantes com o genótipo QQ192 (menor nível de atividade da PON 1) apresentaram maior risco de mortalidade por todas as causas e mais eventos cardiovasculares quando comparados com os indivíduos de genótipo QR192 e RR192. A incidência de eventos cardiovasculares foi significativamente menor nos participantes com maiores níveis séricos de atividade da PON 1 (36).

A atividade da PON 1 (atividade paraoxonase e lactonase) encontra-se reduzida na doença renal crônica (DRC), particularmente nos indivíduos em hemodiálise (37,38,39). Esta redução pode ser decorrente de uma menor concentração de HDL nesta população, uma vez que a paraoxonase sérica encontra-se ligada à apolipoproteína 1 na HDL, porém, estudos têm demonstrado que a concentração da HDL não deve ser o único fator determinante (40). A atividade reduzida da PON 1 nos pacientes com DRC pode estar associada a fatores como o ambiente urêmico e retenção de toxinas urêmicas e substâncias como os produtos finais de glicação avançada (12). A prevalência do polimorfismo da PON 1 nos pacientes com DRC não difere da população controle normal. Isto sugere que a menor atividade da enzima nos pacientes em hemodiálise seja independente do polimorfismo genético (41).

A hemodiálise é a modalidade de tratamento mais frequente para os pacientes com DRC e, embora seja um tratamento que mantém esses pacientes vivos, é pró-oxidativa e teria potencial de afetar negativamente a atividade da PON 1. Em um estudo que avaliou 22 pacientes renais crônicos em hemodiálise e 30 indivíduos controles, foram colhidas amostras de sangue antes e após a sessão de hemodiálise, tendo sido observado aumento de 4 a 40% da atividade da PON 1 após a sessão de hemodiálise. Ainda neste estudo, soros frescos do grupo controle (como fonte de PON 1) foram incubados por vários períodos de tempo na presença de concentrações crescentes de ultrafiltrados de um *pool* de soro dos pacientes em hemodiálise ou de *pool* de soro do grupo controle e os resultados demonstraram uma redução de 25% em 40 horas na atividade da PON 1 quando o ultrafiltrado

utilizado era aquele dos pacientes em hemodiálise e de 8% quando se utilizava ultrafiltrado do grupo controle (12).

Considerando o possível papel da PON 1 na aterogênese e a elevada mortalidade cardiovascular na população de renais crônicos em hemodiálise, é interessante o fato de que quanto mais tempo o paciente permanece em programa de diálise crônica, menor é a atividade da PON 1 (42).

Em uma coorte de 81 pacientes japoneses recebendo tratamento de hemodiálise entre 1997 e 1998, após seguimento de seis anos, registraram-se 2 mortes, incluindo 24 eventos cardiovasculares fatais. Neste estudo a concentração da PON 1 foi um preditor significativo da mortalidade cardiovascular, assim como foram a idade, concentração de hemoglobina e a preexistência de DCV. DCV prévia é um dos principais preditores para mortalidade cardiovascular e a concentração da PON 1 tendeu a ser menor nos pacientes com DCV preexistente. Os resultados deste estudo devem ser observados com cautela pois analisou-se conjuntamente uma população formada por pacientes portadores e não portadores de DCV. Mas na análise multivariada, a concentração da PON 1 permaneceu como fator de risco independente para ocorrência de morte cardiovascular e de todas as causas (10). Ainda são necessários estudos prospectivos maiores para esclarecer uma relação de causa e efeito entre a atividade e concentração da PON 1 e o desenvolvimento de DCV nesses pacientes.

## 2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio exerce papéis contraditórios. Enquanto é essencial para a vida no processo de produção de energia celular através da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, pode também ser uma substância tóxica para bactérias, plantas, células eucarióticas e humanos. E mesmo esse efeito “tóxico” do oxigênio pode ter sua utilidade em medicina, como é o caso do desenvolvimento da terapia hiperbárica (43).

Os compostos químicos, incluindo o oxigênio, capazes de aceitar elétrons são agentes oxidantes. Em contraste, uma substância capaz de doar elétrons é um agente redutor. Em geral, uma reação química na qual uma substância ganha elétrons é definida como redução. A oxidação é um processo em que ocorre perda de elétrons. Tais reações, chamadas reações redox, são a base



para numerosas vias bioquímicas celulares, biossínteses e processos de regulação celular. Os termos redutor e oxidante quando aplicados no contexto biológico, são chamados de antioxidante e pró-oxidante, respectivamente. O equilíbrio entre os sistemas antioxidantes e pró-oxidantes é fundamental para manter as funções celulares e bioquímicas do organismo. O estresse oxidativo ocorre quando as defesas antioxidantes não são capazes de equilibrar a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (pró-oxidantes), gerando um ambiente pró-oxidativo e dano oxidativo a alvos biológicos, como lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) (44).

A geração de radicais é um processo contínuo e fisiológico. Os radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas essenciais, como na cadeia transportadora de elétrons geradora de energia (ATP) ou participando dos mecanismos de defesa contra infecções (44,45).

As espécies reativas de oxigênio podem ser classificadas em duas categorias: radicais e não radicais. Os radicais, muitas vezes chamados de radicais livres (o termo radical livre é redundante, pois um radical é sempre livre) incluem o íon superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), radical peroxil (ROO) e óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ). O grupo de compostos não radicais derivados de oxigênio incluem o peróxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HClO), peróxidos orgânicos (ROOH), ozônio ( $O_3$ ), aldeídos e peroxinitrito (ONOOH) (44).

Os radicais reagem rapidamente com outras moléculas. Algumas espécies reativas de oxigênio são extremamente reativas e possuem meia-vida curta. O radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), por exemplo, dura apenas  $10^{-10}$  s nos sistemas biológicos. Se não houver um alvo biológico adjacente ao local de produção do radical, este não produzirá um dano oxidativo. A alta reatividade dos radicais e sua curta meia-vida ilustram o seu potencial efeito tóxico e as dificuldades na prevenção do dano oxidativo. Então, para prevenir a interação entre o radical e seu alvo biológico, um agente antioxidante deve estar presente no local onde o radical está sendo produzido para poder competir com o radical pelo seu substrato biológico (44).

#### 2.4.1 Principais Espécies Reativas de Oxigênio

Íon superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ): o radical superóxido pode causar danos a

estruturas celulares de forma direta ou originando outras espécies reativas de oxigênio que podem causar danos ainda maiores. Por ser altamente polar, o superóxido não atravessa facilmente as membranas celulares, mas a sua forma protonada, o radical hidroperoxil ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) é capaz de atravessar as membranas biológicas mais facilmente do que a forma carregada negativamente. Em condições fisiológicas de pH, a maior parte do radical superóxido encontra-se em sua forma carregada ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). A reação mais importante do radical superóxido é a dismutação. Nesta reação, o radical superóxido reage com outro radical superóxido formando oxigênio e peróxido de hidrogênio (44).

Radical Hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ): a reatividade do radical hidroxila é extremamente elevada. Em contraste com o radical superóxido que é considerado relativamente estável, o radical hidroxila possui curta meia-vida e alta afinidade para reagir com outras moléculas incluindo o DNA, proteínas, lipídios, aminoácidos, açúcares e metais.  $\text{OH}^\cdot$  é considerado o radical mais reativo nos sistemas biológicos, com alto potencial oxidante, e interage no próprio local de sua produção com as moléculas próximas (44).

Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ): ainda que não seja um radical por definição, o peróxido de hidrogênio é considerado um metabólito ativo de oxigênio e pode causar dano celular mesmo em baixas concentrações. Sua toxicidade pode ser direta, devido à sua ação oxidante, ou indireta, por servir de substrato para a geração de compostos ainda mais deletérios, como  $\text{OH}^\cdot$  ou  $\text{HClO}$ . Como exemplos de toxicidade direta do  $\text{H}_2\text{O}_2$  temos degradação de hemeoproteínas, liberação de ferro, inativação de enzimas e oxidação de DNA e lipídios (44).

Óxido Nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ) e Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ): a síntese de  $\text{NO}^\cdot$  decorre da ação da enzima óxido nítrico sintetase a partir do aminoácido L-arginina. O  $\text{NO}^\cdot$  é produzido por células endoteliais, nervosas e inflamatórias e atua como um importante sinalizador intracelular e extracelular. O óxido nítrico pode reagir com o superóxido gerando ( $\text{ONOO}^-$ ). Esta reação ajuda a manter o balanço de superóxido e de outras espécies reativas de oxigênio. O peroxinitrito é um potente oxidante que causa depleção de grupos sulfidrilas e oxidação de muitas moléculas causando dano similar aquele observado quando  $\text{OH}^\cdot$  é envolvido. O peroxinitrito pode provocar quebra do DNA e oxidação de proteínas (44).

#### 2.4.2 Metais de Transição

Em 1894 Fenton descreveu a interação entre  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (46). Quarenta anos depois descobriu-se que desta interação produzia-se radical hidroxila, explicando sua força oxidativa (47). Ainda mais tarde, esta reação foi reconhecida como uma das mais importantes na explicação de danos oxidativos que ocorrem no ambiente biológico (48). A maioria dos metais de transição – aqueles no bloco D da tabela periódica – possuem elétrons não pareados e podem, com a exceção do zinco, ser considerados radicais por definição. A importância biológica dos metais de transição está em seu poder de converter agentes oxidantes relativamente estáveis em potentes radicais. Dentre os metais de transição, cobre e ferro são os mais abundantes e importantes no contexto biológico (49).

#### 2.4.3 Alvos Biológicos do Estresse Oxidativo

Os lipídios de membranas biológicas são alvo de peroxidação lipídica devido a sua alta concentração de ácidos graxos insaturados. Este dano aos lipídios, usualmente denominado de lipoperoxidação, constitui-se de reações em cadeia, representadas pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. O radical hidroxila, por meio da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos insaturados da membrana celular, desempenha importante papel na lipoperoxidação, sendo considerado o principal iniciador deste processo. O processo segue para o estágio de propagação resultando na peroxidação de todo lipídio insaturado da membrana (44).

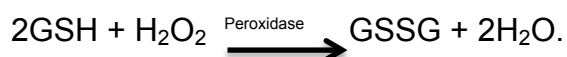
As proteínas podem sofrer danos diretos e indiretos decorrentes da interação com as espécies reativas de oxigênio, incluindo peroxidação, danos a aminoácidos, alteração em sua estrutura terciária, degradação e fragmentação.

Embora o DNA seja uma molécula estável e bem protegida, as espécies reativas de oxigênio podem interagir com o DNA e provocar diversos tipos de danos, como modificação das bases, quebras, perdas de purinas, dano ao açúcar desoxirribose e danos ao sistema de reparação. O principal radical envolvido no dano ao DNA é o radical hidroxila (44).

#### 2.4.4 Mecanismos de Defesa Celular Contra o Estresse Oxidativo

A exposição constante a vários tipos de estresse oxidativo de várias fontes levou a célula e todo o organismo a desenvolverem mecanismos de defesa para a proteção contra as espécies reativas. Mecanismos indiretos incluem o controle da produção endógena de espécies reativas de oxigênio pela alteração de atividade enzimática, que indiretamente produz metabólitos de oxigênio, como a xantina oxidase. O organismo possui um sistema enzimático e de pequenas moléculas responsável por reparar os danos provocados pelo estresse oxidativo; no DNA, por exemplo, um sistema reparador identifica uma região danificada, remove e incorpora uma base apropriada. Moléculas capazes de doar átomo de hidrogênio a moléculas que foram alvo de perda de hidrogênio pela ação de espécies reativas também são consideradas reparadoras. Um exemplo dessa ação reparadora é a doação de hidrogênio pelo ascorbato (vitamina C) ou pelo tocoferol (vitamina E) para ácidos graxos que foram atacados por radicais e perderam seu hidrogênio (44).

O mecanismo de defesa envolvendo antioxidantes é de extrema importância por sua capacidade de remoção direta de pró-oxidantes e pela variedade de compostos que podem agir como antioxidantes no organismo. O sistema de defesa antioxidante possui dois grupos principais – enzimas antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular. O sistema de defesa antioxidante enzimático possui proteínas de ação direta como a superóxido dismutase (SOD); as proteínas dessa família diferem em sua estrutura e cofatores. A SOD atua acelerando a dismutação espontânea do superóxido para  $H_2O_2$ . O produto final da reação de dismutação –  $H_2O_2$  – pode ser removido pela ação da enzima catalase e membros da família peroxidase, incluindo a glutathiona peroxidase. Em contraste com a catalase, a peroxidase possui alta afinidade e pode remover  $H_2O_2$  mesmo quando este encontra-se em baixas concentrações utilizando doadores de elétrons como a glutathiona (44). A remoção de  $H_2O_2$  ocorre às custas de moléculas valiosas para o ambiente celular; duas moléculas de glutathiona são consumidas para a remoção de uma molécula de  $H_2O_2$  como demonstra a reação:



Dentre os antioxidantes de baixo peso molecular, a glutathiona participa como cofator para a enzima peroxidase agindo como antioxidante indireto ao doar elétrons necessários para a decomposição do  $H_2O_2$ . A glutathiona também está envolvida em muitas outras vias bioquímicas e funções metabólicas celulares, além de participar da manutenção da comunicação entre células (44).

#### 2.4.5 Marcadores do Estresse Oxidativo

A quantificação dos radicais livres como método para avaliação do estresse oxidativo é muito difícil devido à sua curta meia-vida e concentração extremamente baixa. Para a avaliação do estresse oxidativo quantificam-se marcadores do dano oxidativo ou do sistema de defesa antioxidante.

A peroxidação lipídica pode ser avaliada em sua fase inicial por meio de medidas de lipídios antes e após a exposição às espécies reativas de oxigênio. Na fase de propagação da peroxidação lipídica há consumo de oxigênio e formação de peróxidos e este processo pode ser estimado quantificando a formação de peróxidos. No último estágio da peroxidação os peróxidos são decompostos a aldeídos como o malonaldeído, que pode ser detectado pelo ácido tiobarbitúrico. Outros aldeídos também compõem este produto final e todos eles são denominados espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e este é um dos métodos mais utilizados para avaliar a peroxidação lipídica (44,49).

A LDL oxidada (LDL-ox) também é um marcador de peroxidação lipídica e está envolvida na aterogênese. A modificação oxidativa da LDL a transforma em uma partícula com características que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose precoce (50). A LDL-ox induz moléculas de adesão e receptores específicos, estimulando a adesão de monócitos circulantes às células endoteliais; também estimula a produção e liberação de proteína de quimioatração de monócitos -1 (MPC1) pelas células endoteliais e musculares resultando em maior migração de monócitos para a íntima arterial (51). Adicionalmente, a LDL-ox possui atividade pró-trombótica e aumenta a ativação plaquetária e expressão do fator tissular e do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) pelas células endoteliais (52).

Os isoprostanos são ótimos biomarcadores da peroxidação lipídica *in vivo*, e podem ser dosados por cromatografia gasosa – espectrometria de massa no plasma ou urina (49,53).

A avaliação do dano oxidativo proteico pode ser realizada através do ensaio da carbonila. As carbonilas são produzidas pelo ataque de espécies reativas de oxigênio a resíduos de aminoácidos em proteínas. Vários métodos podem avaliar estas carbonilas, através de técnicas de eletroforese em gel, por detecção de

peróxidos, pela perda de grupo sulfidril, por nitração de proteínas e por hidroxilação de aminoácidos (54,44).

## 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E HEMODIÁLISE

O estresse oxidativo ocorre quando as defesas antioxidantes não são capazes de equilibrar a produção de espécies reativas de oxigênio (pró-oxidantes), gerando um ambiente pró-oxidativo e dano oxidativo a alvos biológicos. O estresse oxidativo na DRC parece ser proveniente de uma combinação de maior produção de espécies reativas de oxigênio associada a um menor *clearance* dessas substâncias e de uma menor capacidade de defesa antioxidante desses pacientes. Vários mecanismos antioxidantes estão prejudicados nos pacientes renais crônicos, incluindo menor atividade de SOD (55), concentração de grupo tiol plasmático (56), glutatona plasmática e menor função de glutatona peroxidase (57).

Marcadores de estresse oxidativo encontram-se aumentados nos pacientes renais crônicos em hemodiálise (58). Produtos da peroxidação lipídica como malonaldeído e isoprostanos encontram-se consistentemente elevados nesta população (59). Também estão elevados os níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), reconhecidos como marcadores de estresse oxidativo e como potentes mediadores de inflamação (60,61).

O estado de uremia é desencadeador da produção de espécies reativas de oxigênio pelo acúmulo de toxinas endógenas e exógenas. Os altos níveis de ureia podem provocar um dano oxidativo direto por promover a carbonilação de proteínas (62,63). Como fator importante na manutenção do estresse oxidativo nesta população destaca-se a recorrente ativação de monócitos e neutrófilos pela interação entre o sangue e o circuito de hemodiálise (membrana do dialisador, água de diálise, endotoxinas) (64). Os polimorfonucleares encontram-se em estado ativado, em que a resposta ao estímulo é amplificada, tendo como consequência maior produção de espécies reativas de oxigênio no “*burst*” respiratório pelo complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) oxidase. O complexo NADPH oxidase ativado catalisa a redução do oxigênio molecular a ânion superóxido que sofre dismutação formando peróxido de hidrogênio; posteriormente, sob ação de mieloperoxidase, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é transformado em ácido hipocloroso, implicado na geração de compostos oxidantes tais como a

cloramina. Tais reações, benéficas no contexto de combate a infecções bacterianas, representam uma fonte deletéria de radicais livres e agravo ao estresse oxidativo nos pacientes em hemodiálise (65,66).

A biocompatibilidade da membrana do dialisador interfere na produção de radicais livres conforme demonstrado em estudos que compararam membranas celulósicas (cuprofano) e sintéticas (polissulfona); diálise com membrana de cuprofano induziu maior produção de oxidantes e menor aumento compensatório de antioxidantes quando comparada com diálise com polissulfona (67,68). A interação entre a membrana do dialisador e o sangue conduz a ativação do sistema complemento por meio de C3a e C5a e do fator ativador de plaquetas. O tipo de membrana do dialisador pode modular esse processo, sendo as membranas sintéticas de alto fluxo as mais biocompatíveis e com menor produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos (69,70).

A permeabilidade da membrana do dialisador não altera a atividade da PON 1, conforme um estudo que comparou sessões de hemodiálise com membranas de baixo fluxo e membranas de alto fluxo. Neste estudo, também não houve diferença entre estas membranas quanto aos parâmetros do estresse oxidativo (71).

Produtos bacterianos presentes na solução de diálise podem atravessar a membrana do dialisador e estimular a produção de espécies reativas de oxigênio. Em condições de laboratório, fragmentos de lipopolissacarídeos e outros produtos bacterianos presentes no dialisato mostraram-se capazes de estimular células mononucleares através de membranas de baixo e de alto fluxo, levando a produção de citocinas como interleucina 1 e fator de necrose tumoral alfa. Tanto os lipopolissacarídeos como o fator de necrose tumoral alfa são ativadores de atividade respiratória dos neutrófilos (72,73,74). Seria lógico imaginar que o uso de dialisato ultrapuro poderia ter um efeito benéfico nos marcadores de inflamação e de estresse oxidativo. De fato, uma metanálise recente que examinou os efeitos de dialisato ultrapuro versus dialisato padrão em marcadores de inflamação e de estresse oxidativo, além de parâmetros nutricionais e de anemia concluiu que o uso do dialisato ultrapuro em pacientes em hemodiálise resulta em diminuição de marcadores de inflamação e de estresse oxidativo e aumento de albumina sérica e de hemoglobina nesses pacientes (75).

A hemodiálise é um processo pró-oxidante e pró-inflamatório, ao

mesmo tempo em que é necessária para a manutenção da vida de pacientes renais crônicos, está associada a um aumento na geração de produtos oxidantes através da interação da membrana do dialisador com o sangue do paciente ou pela presença de contaminantes no dialisato, com um impacto importante no desenvolvimento de disfunção endotelial e aterogênese (58).



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito do reúso de dois tipos de dialisadores (polinefron e polietersulfona) sobre a atividade da PON 1 de pacientes em hemodiálise.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar o efeito do reúso de dois tipos de dialisadores (polinefron e polietersulfona) sobre alguns biomarcadores de agressão oxidativa e de defesa antioxidante nesses pacientes.

Identificar se há diferenças entre o dialisador de polietersulfona convencional e o dialisador de polietersulfona desprovido de BPA em sua composição sobre a atividade da PON 1 e biomarcadores de agressão oxidativa e de defesa antioxidante nesses pacientes.

## **4 PACIENTES E MÉTODOS**

### **4.1 DELINEAMENTO**

Trata-se de um estudo quasi-experimental, que incluiu pacientes renais crônicos em hemodiálise. O estudo foi aprovado (anexo A) pelo comitê de ética em pesquisa da instituição sob o número 1.585.869. CAAE 56111616.9.0000.5231, sendo realizado em concordância com a declaração de Helsinki e suas modificações.

### **4.2 POPULAÇÃO**

A população do estudo foi constituída por pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise.

### **4.3 AMOSTRA**

A amostra foi não probabilística, de conveniência, constituída por pacientes renais crônicos em hemodiálise do primeiro turno no Instituto do Rim de Londrina – Histocom, no período de setembro a outubro de 2016.

### **4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

O estudo incluiu pacientes renais crônicos em hemodiálise no Instituto do Rim de Londrina – Histocom, pertencentes ao primeiro turno de hemodiálise (das seis às dez horas), no período de setembro a outubro de 2016, maiores de 18 anos, em tratamento por hemodiálise há pelo menos três meses. Fez-se necessário a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice A) para a participação no estudo.

### **4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Foram excluídos do estudo pacientes dialisando através de cateter central, portadores de câncer, infecção ativa que tenha causado internação

hospitalar nos últimos 15 dias anteriores às coletas de sangue para o estudo, positividade sorológica para hepatite B, hepatite C e HIV, perspectiva de sobrevivência inferior a seis meses e com histórico de baixo número de reusos de dialisadores.

#### 4.6 COLETA DE DADOS

Características do tratamento dialítico e do reprocessamento do dialisador: todos os pacientes eram dialisados três vezes por semana com sessões de três horas e meia a quatro horas de duração, com fluxo sanguíneo de 300 a 400mL/min e fluxo do dialisato de 500mL/min. A anticoagulação foi realizada com heparina. Utilizou-se dialisato com bicarbonato. As prescrições de hemodiálise eram individualizadas com objetivo de *single pool* Kt/V superior a 1,2. O reprocessamento dos dialisadores foi realizado por máquinas reprocessadoras registradas na ANVISA utilizando-se ácido peracético 0,2% como agente desinfetante. A água utilizada no tratamento de hemodiálise e no reprocessamento dos dialisadores atendia os critérios da ANVISA e da AAMI, com níveis inferiores a 0,25 unidades de endotoxinas por mililitro e zero bactéria nos meses do estudo. O tratamento de água para hemodiálise do Instituto do Rim de Londrina – Histocom é composto por pré-tratamento com filtro de areia, abrandador, filtro duplo de carbono ativado e osmose reversa de duplo passo.

No dia de início do estudo, marcado para ocorrer no dia da coleta de exames mensais rotineiros destes pacientes, após jejum de oito horas, antes da heparinização e do início da sessão de hemodiálise, foram coletados 10 mL de sangue para dosagem da atividade da PON 1 e de outros marcadores de estresse oxidativo e de defesa antioxidante. Os pacientes em tratamento de hemodiálise no Instituto do Rim – Histocom utilizam regularmente dialisadores de polinefron com superfície interna dependente da superfície corporal. No dia de início do estudo foi aberto um novo dialisador para cada paciente. Ao término da sessão de hemodiálise, antes das retiradas das agulhas de fístula, outros 10 mL de sangue foram coletados para a análise da atividade da PON 1 e de outros marcadores de estresse oxidativo e de defesa antioxidante. Na sessão de hemodiálise do sexto reúso, amostras de sangue foram coletadas da mesma forma para a dosagem da atividade da PON 1 e de outros marcadores do estresse oxidativo e de defesa antioxidante. Os pacientes continuaram a utilizar os dialisadores de polinefron e

após um intervalo de duas semanas, no mês subsequente, na data da coleta dos exames mensais rotineiros, foram abertos dialisadores de polietersulfona e, de maneira semelhante ao já especificado para os dialisadores de polinefron, o protocolo de estudo foi repetido.

As amostras de sangue foram depositadas em tubos a vácuo, contendo gel separador ou anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), armazenadas em geladeira por até quatro horas e na sequência foram transportadas em recipiente refrigerado (caixa térmica com gelox) para o Laboratório de Pós-Graduação do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, com tempo máximo de deslocamento de 15 minutos. Para obtenção do plasma os tubos de sangue foram centrifugados (10 minutos à 3000 rpm). As hemácias que ficaram no tubo foram lavadas três vezes com 2 mL de solução fisiológica (cinco minutos à 3000 rpm) para obtenção da papa de hemácias. Alíquotas de soro e hemácias foram armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Kendro<sup>®</sup>, Asheville, NC, EUA) até o momento de uso.

A atividade total da PON 1 foi realizada pela metodologia descrita por Richter, Jarvink e Furlong (2008). A taxa de hidrólise de fenilacetato para a determinação da atividade da PON 1 foi realizada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA), no comprimento de onda de 270 nm, medidos durante quatro minutos (16 leituras com intervalo de 15 segundos entre as leituras) com a temperatura mantida a  $25^{\circ}\text{C}$ . A atividade total da PON 1 foi expressa em U/mL (76).

A atividade da SOD nos eritrócitos foi determinada utilizando o método do pirogalol, descrito por Marklund e Marklund (1974). Esta técnica baseia-se na inibição que a enzima promove na auto-oxidação do pirogalol em solução aquosa. A quantidade de SOD capaz de inibir 50% da oxidação do pirogalol foi definida como uma unidade de atividade enzimática. A leitura da reação da SOD foi realizada em uma leitora de microplaca, marca Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em U/min/gHb (77).

A atividade da catalase em eritrócitos foi avaliada através da medida de decaimento na concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e geração de oxigênio, utilizando-se a técnica descrita por Aebi (1984). A leitura foi realizada em uma leitora de microplaca, marca Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA). Os valores de catalase foram expressos em abs/min/gHb (78).

A determinação da glutathiona total (GT), GSH e GSSG em eritrócitos, foi realizada através do teste da formação do ácido tionitrobenzóico monitorado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 412nm, utilizando a técnica descrita por Tietze e colaboradores (1969) e Anderson (1985). O ácido tionitrobenzóico é resultante da reação de duas moléculas de GSH (amostra) e uma de ácido ditio-bis-nitrobenzóico, obtendo-se assim as medidas de GSH. Nesta reação, além do ácido tionitrobenzóico, forma-se também a GSSG. Na presença da glutathiona redutase e de NADPH, a GSSG resultante da primeira reação (ou aquela que já estava presente na amostra) é reconvertida em GSH que é re-oxidada a GSSG formando mais ácido tionitrobenzóico, e obtendo-se as quantidades de GT presente na amostra. A quantidade de GSSG é obtida por cálculo através da subtração da GT-GSH/2. A leitura da reação foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em mM/gHb (79,80).

Para a determinação dos produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP) foi utilizado o método descrito por Hanasand e colaboradores. (2012). Realizou-se a medida dos níveis de proteínas oxidadas em uma leitora de microplaca da marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA), no comprimento de onda de 340nm. A concentração de AOPP foi expressa em  $\mu\text{M/L}$  de equivalente de cloramina (81).

Para dosagem dos LOOH utilizou-se uma adaptação da técnica descrita por Flecha, Llesuy e Boveris (1991) e Panis e colaboradores. (2012). A quimioluminescência 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 quimioluminescência que está relacionado com o estresse oxidativo. Este experimento foi realizado em luminômetro Glomax (TD 20/20). Todo o experimento é realizado ao abrigo da luz para evitar a fosforescência, a 30°C, durante 60 minutos. Os resultados são expressos em unidades relativas de luz (RLU) e a curva obtida foi utilizada como um indicador qualitativo da lipoperoxidação. Os resultados quantitativos foram obtidos após a integração da área sob a curva utilizando o OriginLab 7.5 software (82).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, uma análise descritiva dos dados foi realizada. Depois, conduziu-se uma análise exploratória para avaliar a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade da variância (teste de Levene) de cada variável. Quando que não se confirmou a distribuição normal entre as variáveis, realizou-se o teste de Wilcoxon e os dados foram apresentados como medianas e intervalos interquartílicos. Quando três ou mais variáveis foram analisadas, aplicou-se o teste de Friedman. Para as variáveis contínuas com distribuição gaussiana, os valores foram expressos em médias e desvios-padrões. O nível de significância adotado foi de 5% ( $P < 0,05$ ). Para análise dos dados foi utilizado o software SPSS 11.5 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

## ARTIGO CIENTÍFICO

### EFFECT OF THE DIALYZER REUSE AND THE MEMBRANE TYPE ON THE ACTIVITY OF PARAOXONASE 1 OF PATIENTS IN HEMODIALYSIS

PON1 activity and dialyzer reuse

Reynaldo Jr Miguita<sup>1</sup>, Andressa K Matsumoto<sup>2</sup>, Ana P Michelin<sup>2</sup>, Vinicius DA Delfino<sup>3</sup>,  
Décio S Barbosa<sup>4</sup>

1. Nephrologist, MsC, Post-Graduation Program in Health Sciences, Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil

2. Post-Graduation Program in Health Sciences, MsC, Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil

3. PhD Professor, Department of Clinical Medicine, Discipline of Nephrology, Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil

4. PhD Professor, Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis, Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil

Correspondence to: Reynaldo Miguita Jr, Rua Nossa Senhora do Rocio, 966. CEP86300-000 Cornélio Procópio –PR, Brazil. E-mail: miguitajunior@gmail.com

Conflict of interest: Neither author has any conflict of interest.

Disclosure of grants or other funding: None.

#### Abstract

**Introduction:** Cardiovascular disease is the major cause of mortality in patients undergoing chronic hemodialysis treatment. The oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL)

is a crucial step in the pathogenesis of atherosclerosis. Paraoxonase 1 (PON1) is the protein responsible for most of the antioxidant activity of high-density lipoprotein (HDL) and its reduced levels are associated with more cardiovascular events in several populations. In hemodialysis patients, reduced PON1 activity has been shown to be associated with increased cardiovascular mortality. Studies have shown that after the hemodialysis session the activity of PON1 increases. The influence of the reuse and the dialyzer membrane type on the activity of PON1 is unknown. In addition, there are few studies on the effect of reuse on intracellular enzymatic antioxidant activity. We aimed to evaluate the effect of the reuse of two types of dialyzers (polynephron and polyethersulfone) on the PON 1 activity of hemodialysis patients.

**Methods:** Quasi-experimental study with 30 chronic renal patients on hemodialysis. Pre- and post-dialysis blood samples were collected to analyze the activity of PON 1 and other oxidative stress markers in the first use of the dialyzer and in the hemodialysis session after its sixth reuse. This process was carried out with polynephron (bisphenol free) and polyethersulfone dialyzers in September and October 2016.

**Findings:** Post-dialysis PON 1 activity was significantly higher than pre-dialysis in both the first and sixth reuse ( $P<0.001$ ) and there was no significantly difference between the values found at the first and sixth reuse and between the membranes studied.

**Discussion:** The practice of reusing the dialyzer, as well as the dialyzer membrane type (polynephron and polyethersulfone), did not interfere with the improvement of PON 1 activity after the hemodialysis session, nor increased lipid and protein oxidation markers.

**Key words:** Chronic kidney failure. Hemodialysis. Cardiovascular diseases. Paraoxonase 1. Oxidative stress. Hemodialyzer. Equipment reuse.

## INTRODUCTION



Cardiovascular diseases (CVD) comprise the leading cause of death in end-stage renal disease (ESRD) patients. It has a multifactorial genesis, and accounts for almost 50% of deaths in this population<sup>1,2</sup>. Patients on hemodialysis have an abnormal lipid profile characterized by elevated levels of triglycerides and low-density lipoproteins (LDL) and decreased levels of high-density lipoprotein (HDL)<sup>3</sup>.

Paraoxonases are enzymes that were initially described for their ability to hydrolyze exogenous organophosphorus compounds, such as the active metabolite of the agricultural pesticide parathion, paraoxon<sup>4</sup>. Paraoxonase 1 (PON1) has attracted significant interest in being the protein responsible for most of the antioxidant activity of HDL. PON 1 associated with HDL acts to prevent the oxidation of LDL and its deleterious effects<sup>5,6</sup>. Reduced levels of PON 1 activity are associated with increased occurrence of cardiovascular events in several populations<sup>7,8,9</sup>. In hemodialysis patients, reduced PON1 activity has been shown to be associated with increased cardiovascular mortality<sup>10</sup>.

The oxidative modification of LDL is a crucial step in the pathogenesis of atherosclerosis<sup>11</sup>. Plasma lipid oxidation by peroxynitrite in patients with ESRD is increased, and this effect is worsened by hemodialysis<sup>12</sup>. Increased plasma protein oxidation can be evidenced by the appearance of advanced oxidation protein products (AOPP). Studies demonstrated elevated levels of AOPP in the plasma of uremic patients<sup>13</sup>. AOPP act as a mediator of oxidative stress and monocyte respiratory burst in the immune dysregulation associated with chronic uremia<sup>14</sup>.

The dialyzer membranes are made of different substances such as cellulose, modified cellulose, synthetic cellulose and synthetic membranes such as polyethersulfone, which are more biocompatible. Recently, a new synthetic membrane, polynephron, has been introduced in the market. Such a membrane is composed of polyethersulfone but, unlike other dialysis

membranes, it does not contain bisphenol (BPA) on its structure, an agent with the potential to interfere with the functioning of various endocrine glands. A study has shown a significant increase in plasma BPA in patients who are hemodialyzed with polyethersulfone membranes and that the reverse occurs in dialyzed patients with polynephron. In addition, there was an increase in oxidative stress markers in patients using polyethersulfone compared to polynephron<sup>15</sup>.

Dialyzer reuse is still a subject of many controversies. With the advent of modern, more biocompatible membranes and more favorable sterilization techniques there is no compelling medical indication for reprocessing dialyzers. The inherent risks of the reuse process exist, even with the application of all requirements from the Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI)<sup>16</sup>. The practice of reusing the dialyzer still persists in countries where the economic factor is a barrier for the practice of single use. Most low-income countries employ reuse in almost 100% patients in renal replacement therapy<sup>17</sup>.

Studies have shown that after the hemodialysis session the activity of PON1 increases<sup>18,19</sup>. The influence of the reuse and the dialyzer membrane type on the activity of PON1 is unknown. In addition, there are few studies on the effect of reuse on intracellular enzymatic antioxidant activity.

The effect of reusing BPA-containing dialyzers and BPA-free dialyzers on lipid and protein oxidation markers and on antioxidant activity in hemodialysis patients has not yet been compared. Patients in hemodialysis has increased oxidative stress and inflammation that are associated with elevated cardiovascular mortality<sup>20</sup>. The purpose of our study was to evaluate the effect of the reuse of two types of dialyzers on the activity of PON 1 in hemodialysis patients. We also evaluated the repercussions on the intracellular redox environment, lipid peroxidation and advanced oxidation of proteins by the reuse of two types of dialyzers in these patients.

## **SUBJECTS AND METHODS**

### **Patients and Research Design**

This is a quasi-experimental study, which included ESRD patients on hemodialysis at the Instituto do Rim de Londrina – Histocom. Inclusion criteria were age > 18 years, being from the first shift of hemodialysis (from 6:00 a.m. to 10:00 a.m.) and on hemodialysis treatment for at least 3 months. Patients could not participate if they were dialysing through a central catheter, had a cancer, had an active infection that caused hospitalization in the last 15 days prior to the collection of blood for the study, had serological positivity for hepatitis B, hepatitis C and HIV, had a life expectancy less than six months and those with a history of reduced dialyzer reuse. The Local Ethics Committee of Londrina State University approved the study protocol and the study was performed in accordance with Helsinki Declaration. Written informed consent was obtained from all subjects.

### **Data collection and laboratory measurements**

The period of study was from September to October 2016. Pre- and post-dialysis samples for the determination of PON 1 activity, markers of oxidative stress and antioxidant defense were collected in 4 moments, as described in Figure 1.

Characteristics of the dialysis treatment and the dialyzer reprocessing: all patients were dialyzed thrice weekly for three and a half hours to four hours per session with blood flow rates of 300 to 400 mL/min and dialysate flow rates of 500 mL/min using bicarbonate buffer. Heparin was used for anticoagulation. The hemodialysis prescriptions were

individualized with the goal of single pool Kt/V (sp Kt/V) higher than 1.2. Reprocessing machines using 0.2% peracetic acid as a disinfectant performed the reuse of the dialyzers. The analysis of water for hemodialysis and used in the reprocessing of the dialyzers presented less than 0.25 endotoxin units and zero bacteria, meeting the standards required by Brazilian legislation and AAMI. The hemodialysis water treatment of the Instituto do Rim de Londrina - Histocom is composed of pre-treatment with sand filters, softener, two activated carbon filters, and reverse osmosis system by double pass.

The blood collection was scheduled to the day of routine monthly exams, after an 8-hour fasting. Prior to heparinization and initiation of the hemodialysis session, 10 mL of blood were collected for analysis of PON 1 activity and other markers of oxidative stress and antioxidant defense. Patients receiving hemodialysis at the Instituto do Rim - Histocom regularly use polynephron dialyzers. A new dialyzer was opened for each patient on the study's first day. At the end of the hemodialysis session, prior to the withdrawal of the fistula needles, another 10 mL of blood were collected for the same analyses performed pre-dialysis. At the hemodialysis session of the sixth reuse (seventh use), blood samples were collected in the same manner for the determination of PON 1 activity and other markers of oxidative stress and antioxidant defense. Patients continued to use polynephron dialyzers and after a two-week interval, in the following month, on the date of the routine monthly exams, polyethersulfone dialyzers were opened and the study protocol was repeated similarly to that already specified for the polynephron dialyzers.

The blood samples were collected with vacuum tubes and stored in a refrigerator for up to 4 hours and then transported in a refrigerated container (ice cube box) to the Post-Graduation Laboratory of the University Hospital of the Londrina State University, within 15 minutes. Plasma samples were separated from cells by centrifugation at 3000 rpm for 10 min,

and the remaining blood was washed three times with 9 g/L NaCl solution. Samples were analyzed either the same day or stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

The total activity of PON 1 was performed using the methodology described by Richter, Jarvik and Furlong (2008)<sup>21</sup>. The rate of phenylacetate hydrolysis for the determination of PON 1 activity was performed on a Perkin Elmer® microplate reader EnSpire model (Waltham, MA, USA). The total activity of PON 1 is expressed in U/mL.

The activity of superoxide dismutase (SOD) in erythrocytes was determined using the pyrogallol method described by Marklund and Marklund (1974)<sup>22</sup>. This technique is based on the inhibition that the enzyme promotes in the auto-oxidation of pyrogallol in aqueous solution. The amount of superoxide dismutase capable of inhibiting 50% of the pyrogallol oxidation is defined as one unit of enzymatic activity. The SOD reaction was performed on a Perkin Elmer® microplate reader EnSpire model (Waltham, MA, USA). The results were expressed as U/min/gHb.

The catalase activity in erythrocytes was evaluated by the measurement of  $\text{H}_2\text{O}_2$  decay and oxygen generation, using the technique described by Aebi (1984)<sup>23</sup>. The reading was performed on a Perkin Elmer® microplate reader EnSpire model (Waltham, MA, USA). The catalase values were expressed as abs/min/gHb.

The determination of total glutathione (GT), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) in erythrocytes were performed by the spectrophotometer monitored thionitrobenzoic acid test at the wavelength of 412 nm using the technique described by Tietze et al. (1969)<sup>24</sup> and Anderson (1985)<sup>25</sup>. Thionitrobenzoic acid results from the reaction of two GSH (sample) and one dithio-bis-nitrobenzoic acid molecules, obtaining GSH measurements. In this reaction, in addition to the thionitrobenzoic acid, the GSSG is also formed. In the presence of glutathione reductase and NADPH, the GSSG resulting from the first reaction (or that which was already present in the sample) is converted into GSH which is

oxidized to the GSSG forming further thionitrobenzoic acid, and obtaining the amounts of GT present in the sample. The amount of GSSG is obtained by subtraction of GT-GSH/2. The reaction was read on a Perkin Elmer<sup>®</sup> microplate reader EnSpire model (Waltham, MA, USA). The results were expressed in mM / gHb.

The determination of the advanced oxidation protein products (AOPP) was performed by the method described by Hanasand et al. (2012)<sup>26</sup>. A measurement of oxidized protein levels is performed on a Perkin Elmer<sup>®</sup> brand microplate reader, model EnSpire (Waltham, MA, USA), at a wavelength of 340 nm. The concentration of AOPP was expressed in  $\mu\text{M/L}$  of chloramine equivalent.

For the dosage of the lipid hydroperoxides (LOOH) an adaptation of the technique described by Flecha, Llesuy and Boveris (1991)<sup>27</sup> and Panis et al. (2012)<sup>28</sup>. 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, an increase of chemiluminescence that is related to the oxidative stress. This experiment was performed in GloMax<sup>®</sup> -20/20 luminometer. The entire experiment was run out of light to avoid phosphorescence, at 30°C, for 60 minutes. The results were expressed in relative light units (RLU) and the obtained curve was used as a qualitative indicator of lipoperoxidation. The quantitative results were obtained after the integration of the area on the curve using the OriginLab 7.5 software.

## STATISTICAL ANALYSES

Initially, a descriptive analysis of the data was performed. Then, an exploratory analysis was conducted to evaluate normal distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity

of variance (Levene test) of each variable. For the variables that did not confirm to the assumptions of normality, Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test was performed and the data were presented as median and 25th to 75th quartiles. When three or more variables were analyzed, Friedman Test (Nonparametric Repeated Measures ANOVA) was used. For continuous variables with Gaussian distribution, values were expressed as means and standard deviations. A statistical significance of 5% was adopted ( $P<0.05$ ). The software SPSS 11.5 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used for data analyses.

## RESULTS

A total of 30 patients on maintenance hemodialysis for more than three months were included in this study. The demographic and laboratory characteristics of the study participants are given in Table 1. The median pre-dialysis PON 1 activity in the first use of the polynephron dialyzer was 139.4 U/mL and post-dialysis was 181.5 U/mL ( $P<0.001$ ). These results were maintained in the sixth dialyzer reuse (seventh use) with pre-dialysis PON activity of 130.01 U/mL and post-dialysis of 176.5 U/mL ( $P<0.001$ ). The PON1 activity improved significantly after the hemodialysis session on the first and sixth reuse of the polyethersulfone dialyzer, similar to the polynephron dialyzer ( $P<0.001$ ) (Figure 2). The activity of PON 1 in the first use of the polynephron dialyzer rose from 139.4 U/mL pre-dialysis to 181.5 U/mL post-dialysis and with the polyethersulfone dialyzer starting from 153.3 U/mL pre-dialysis to 166.7 U/mL post-dialysis. In the seventh use of the dialyzers, we found PON 1 pre-dialysis activity of 133.5 U/mL and 141.9 U/mL for the dialyzers polynephron and polyethersulfone, respectively. After the hemodialysis session of the seventh dialyzer use the values found for PON 1 activity were 166.7 U/mL and 164.5 U/mL with the polynephron and polyethersulfone dialyzers, respectively. The reuse of the dialyzer, either

polynephron (without BPA) or polyethersulfone, did not influence the degree of post-dialysis increase of PON 1 activity.

Lipid hydroperoxide levels increased after hemodialysis sessions on the first and seventh use of the polyethersulfone dialyzer and on the seventh use of the polynephron dialyzer ( $P<0.001$ ). Only in the first use of the polynephron dialyzer the increase in hydroperoxide level did not reach statistical significance ( $P>0.05$ ) (Figure 3).

The median value of pre-dialysis AOPP in the first use of the polynephron dialyzer was 134.2  $\mu\text{M/L}$  of chloramine equivalent and 123.3  $\mu\text{M/L}$  of chloramine equivalent with the polyethersulfone dialyzer. Post-dialysis values in the first use were 130.5  $\mu\text{M/L}$  of chloramine equivalent and 117.2  $\mu\text{M/L}$  of chloramine equivalent for the dialyzers of polynephron and polyethersulfone, respectively. The pre- and post-dialysis results in the seventh use did not show differences when compared to the first use for the two membranes studied. There were no differences between the membranes studied.

We found difference between the pre-dialysis value of catalase of the first use compared with the pre-dialysis value of the seventh use of the polynephron dialyzer. The results of catalase from the first use and seventh use of polyethersulfone dialyzer were not different. There was no difference between the levels of SOD, GT, GSH and GSSG pre- and post-dialysis (Tables 2 and 3).

## **DISCUSSION**

In our study, we found an increase in PON 1 activity after hemodialysis sessions, as other researchers have already demonstrated<sup>18,19</sup>. The reuse of the dialyzer, either polynephron (without BPA) or polyethersulfone, did not influence this increase. PON 1 protects LDL from the oxidative action of reactive oxygen species (ROS) and thus contributes to the



atheroprotective effect of HDL<sup>6,29,30</sup>. PON 1 protects HDL from peroxidation and improves reverse cholesterol transport; furthermore, PON 1 degrades bioactive phospholipids, such as platelet-activating factor, which has proinflammatory and prothrombotic properties<sup>31,32</sup>. In addition, PON 1 promotes the hydrolysis of homocysteine thiolactone and prevents hyperhomocysteinemia, a process involved in atherogenesis<sup>33</sup>. Since reduced levels of PON 1 have been associated with increased cardiovascular mortality in hemodialysis patients<sup>10</sup>, strategies that improve PON 1 levels or that do not worsen PON 1 activity are important in this context. Reusing the dialyzer was safe in the context of PON1 activity because it did not interfere with its post-dialysis improvement. There was no superiority between the membranes studied in relation to PON1 activity.

Plasma lipid oxidation by peroxynitrite is increased in patients with ESRD, and this effect is worsened by hemodialysis<sup>12,34</sup>. Although we did not find a significant difference in the post-dialysis increase of LOOH in the first use of the polynephron dialyzer, this occurred significantly in the other first-use and seventh-use analyses. Lipid peroxidation products may be a useful indicator to evaluate effectiveness of interventions to decrease oxidative stress and associated inflammation. Reusing the dialyzer did not worsen lipid peroxidation.

According to literature, the high AOPP results before dialysis remain the same after dialysis<sup>35</sup> or become significantly high<sup>13</sup>. In our study, the hemodialysis session had no effect on the concentration of AOPP as already demonstrated by other researchers<sup>35</sup>. AOPPs are implicated in the pathogenesis of atherosclerosis and cardiovascular events. The plasma AOPP level is an independent risk factor for CVD in patients on hemodialysis<sup>36</sup>. The practice of reuse and the type of dialyzer membranes studied did not affect the AOPP concentration.

One study showed an increase in oxidative stress markers in patients using polyethersulfone dialyzer with BPA in its composition and that the opposite occurred when using a dialyzer without BPA in its composition (polynephron)<sup>15</sup>. Although we measured

different markers in our study, we did not find worsening of the antioxidant enzymes with the dialyzer containing BPA. There were no differences in protein oxidation measured by AOPP or in the lipid oxidation measured by the LOOH between the two dialyzer membranes evaluated in our study.

Regardless of the result of the pre-dialysis catalase in the first use of the polynephron dialyzer was lower than that found pre-dialysis in the seventh use of this dialyzer, we cannot infer that this is a consequence of reuse. However, in the general context, we believe that the reuse was neutral for catalase as it was for the other markers of antioxidant activity. This issue can be addressed in future studies.

More than 2 million people worldwide are in renal replacement therapy, the majority on hemodialysis. This number may represent only 10% of those who need treatment; the remainders do not have access to dialysis or kidney transplantation because they live in countries where access to treatment is scarce primarily for economic reasons. Most people who get treatment for kidney failure live in 5 countries (the United States, Japan, Germany, Brazil and Italy) that represent about 12% of the world's population. Only 20% of people in renal replacement therapy are treated in about 100 developing countries that account for 50% of the world's population<sup>37</sup>. These numbers illustrate the fact that, although reuse practice is less and less evident in developed countries such as the United States, Japan and Germany, this practice should still remain as a support option for the practice of hemodialysis in developing countries as India, Brazil, Southeast Asia, South America and Africa.

So, in summary, our study did not find an increase in oxidative stress markers or in the antioxidant defenses until the seventh use of the dialyzers, regardless the dialyzer membrane tested. This study is rather reassuring in the context that, in the studied conditions, the reuse did not promote increase in oxidative stress.

Our study has limitations. For instance, we have just studied two kinds of membranes and used one biomarker each for protein oxidation and lipid peroxidation. Besides, our results cannot be extrapolated for more than six reuses of dialyzers. Future studies comparing a larger number of patients initiating hemodialysis with single use of dialyzer versus patients initiating hemodialysis with the practice of reusing the dialyzer could provide more robust elements with respect to PON 1 activity in these situations.

The hemodialysis process is pro-oxidant and factors such as the choice of dialyzer may generate greater oxidative stress. Accelerated atherogenesis in chronic kidney patients on hemodialysis also has oxidative stress as a predisposing factor. The practice of reusing the dialyzer is the subject of much discussion. One of the main concerns regarding the practice of reusing the dialyzers is mortality. A systematic review of the literature on this issue found no difference in mortality with reusing the dialyzer compared to single use<sup>17</sup>. The fact that the practice of reuse does not interfere with the improvement of the post-dialysis PON 1 activity suggests that, at least in this respect, the reuse does not contribute to the accelerated atherosclerosis that is associated with higher mortality in these patients.

We conclude from this study that the practice of reusing the polyethersulfone and polynephron dialyzers (at least for six reuses, and with the described methods) does not interfere with the improvement of PON 1 activity after the hemodialysis session and that the reuse and the membranes studied are neutral for the antioxidant markers (SOD, GT, GSH and GSSG) and for markers of lipid oxidation (LOOH) and protein oxidation (AOPP) in these patients.

## **REFERENCES**

1 Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 1998;32(5): S112-S119.

- 2 Saran R, Li Y, Robinson B, et al. US Renal Data System 2015 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2016;67(3)(Suppl 1):S1-S434.
- 3 Attman PO, Samuelsson O, Alaupovic P. Lipoprotein metabolism and renal failure. *Am J Kidney Dis.* 1993;21(6):573-592.
- 4 Van Himbergen TM, Van Tits LJ, Roest M, Stalenhoef AF. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth J Med.* 2006;64(2):34-8.
- 5 Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(4):473-480.
- 6 Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS lett.* 1991;286(1-2):152-154.
- 7 Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *N Am J Med Sci.* 2012;4(11): 523-532.
- 8 Ikeda Y, Inoue M, Suehiro T, Arai K, Kumon Y, Hashimoto K. Low human paraoxonase predicts cardiovascular events in Japanese patients with type 2 diabetes. *Acta diabetol.* 2009;46(3): 239-242.

- 9 van Himbergen TM, van der Schouw YT, Voorbij HA et al. Paraoxonase (PON1) and the risk for coronary heart disease and myocardial infarction in a general population of Dutch women. *Atherosclerosis*. 2008;199(2):408-414.
- 10 Ikeda Y, Suehiro T, Itahara Tet al. Human serum paraoxonase concentration predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Clin Nephrol*. 2007;67(6):358-365.
- 11 Esterbauer H, Wäg G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull*. 1993;49(3):566-576.
- 12 Ferraro B, Galli F, Frei B, et al. Peroxynitrite-induced oxidation of plasma lipids is enhanced in stable hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2003;63(6): 2207-2213.
- 13 Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996;49(5):1304-1313.
- 14 Witko-Sarsat V, Friedlander M, Khoa TN, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure<sup>1</sup>, 2. *J Immunol*. 1998;161(5): 2524-2532.
- 15 Bosch-Panadero E, Mas S, Sanchez-Ospina D, et al. The choice of hemodialysis membrane affects bisphenol A levels in blood. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(5):1566-1574.
- 16 Upadhyay A, Sosa MA, Jaber BL. Single-use versus reusable dialyzers: the known unknowns. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(5):1079-1086.

17 Galvao TF, Silva MT, de Almeida Araujo ME, Bulbol, WS, Cardoso ALDMP. Dialyzer reuse and mortality risk in patients with end-stage renal disease: a systematic review. *Am J Nephrol*. 2012;35(3):249-258.

18 Gugliucci A, Mehlhaff K, Kinugasa E, et al. Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: correlation with low molecular AGE adduct clearance. *Clin Chim Acta*. 2007;377(1):213-220.

19 Gugliucci A, Kinugasa E, Kotani K, Caccavello R, Kimura S. Serum paraoxonase 1 (PON1) lactonase activity is lower in end-stage renal disease patients than in healthy control subjects and increases after hemodialysis. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(1):61-67.

20 Anavekar NS, Pfeffer MA. Cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2004;66(Suppl 92):S11-S15.

21 Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ Cardiovasc Genet*. 2008;1(2):147-152.

22 Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *FEBS J*. 1974;47(3):469-474.

23 Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-126.

- 24 Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969;27(3):502-522.
- 25 Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 1985;113:548-555.
- 26 Hanasand M, Omdal R, Norheim KB, Gøransson LG, Brede C, Jonsson G. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta.* 2012;413(9):901-906.
- 27 Flecha BG, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med.* 1991;10(2):93-100.
- 28 Panis C, Herrera ACSA, Victorino VJ, et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133(1):89-97.
- 29 Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993;104(1-2):129-135.
- 30 Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis.* 1995;115(2):243-253.

- 31 Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998;101(8):1581.
- 32 Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J.* 2001;354(1):1-7.
- 33 Kerkeni M, Addad F, Chauffert M et al. Hyperhomocysteinemia, paraoxonase activity and risk of coronary artery disease. *Clin Biochem.* 2006 39(8): 821-825.
- 34 Toborek M, Wasik T, Drózd M, Klin M, Magner-Wróbel K, Kopieczna-Grzebieniak E. Effect of hemodialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure. *Metabolism.* 1992;41(11):1229-1232.
- 35 Ward RA, Ouseph R, Mcleish KR. Effects of high-flux hemodialysis on oxidant stress. *Kidney Int.* 2003;63(1):353-359.
- 36 Cao W, Hou F F, Nie J. AOPPs and the progression of kidney disease. *Kidney int suppl.* 2014 4(1): 102-106.
- 37 Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney Int.* 2011;80(12):1258-1270.



## FIGURES

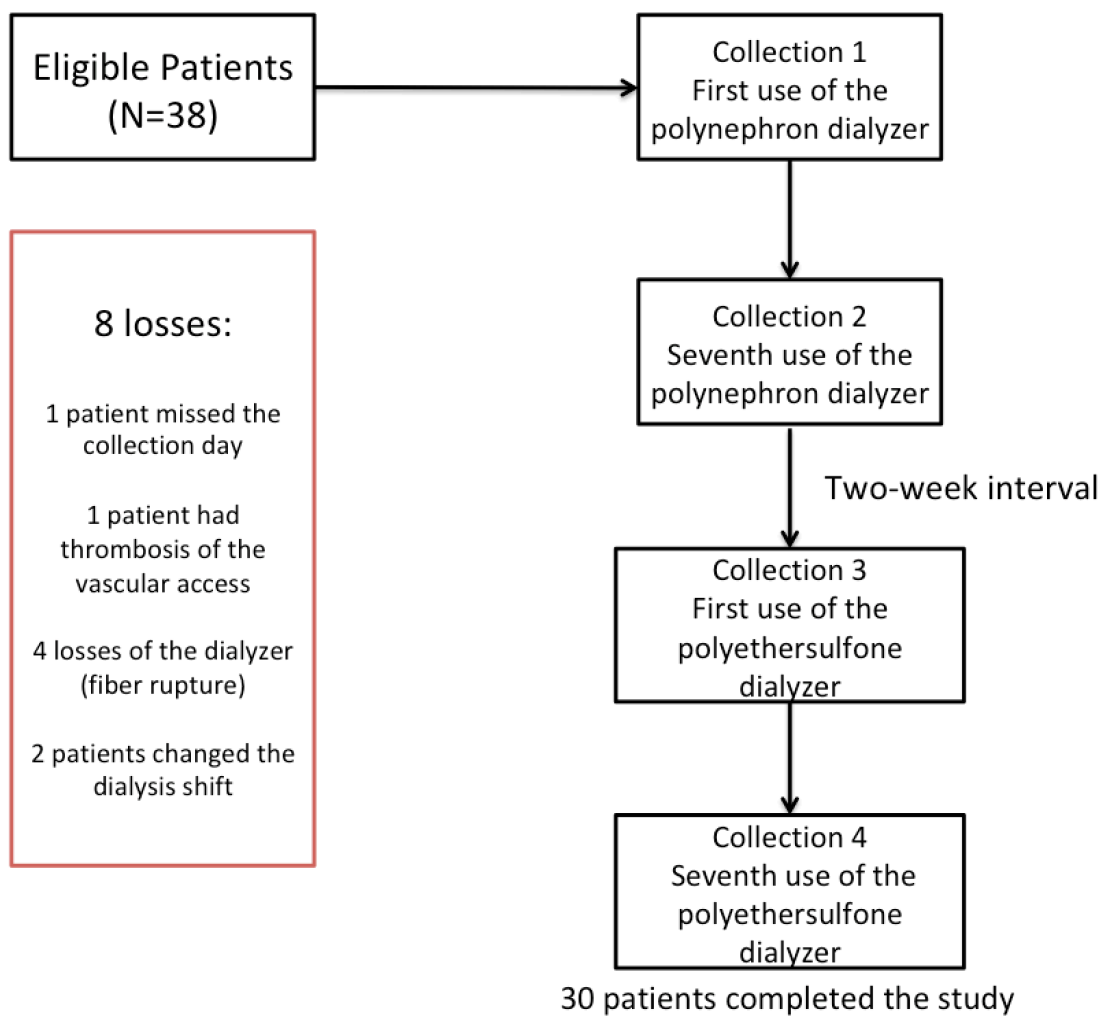


Figure 1: Flow diagram of the study

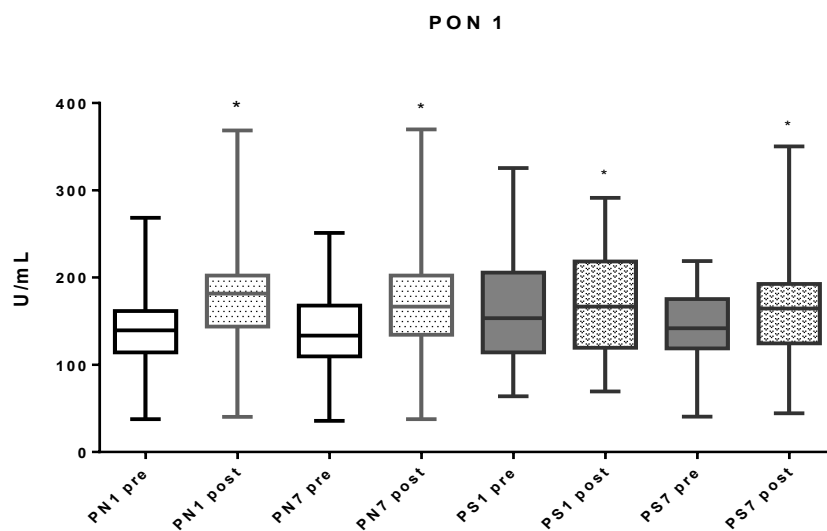


Figure 2: Median PON 1 activity pre and post-dialysis in polynephron (PN) and polyethersulfone (PS) dialyzers in the first (1) and seventh (7) use. \* $P < 0.001$  compared to the pre-dialysis activity levels.

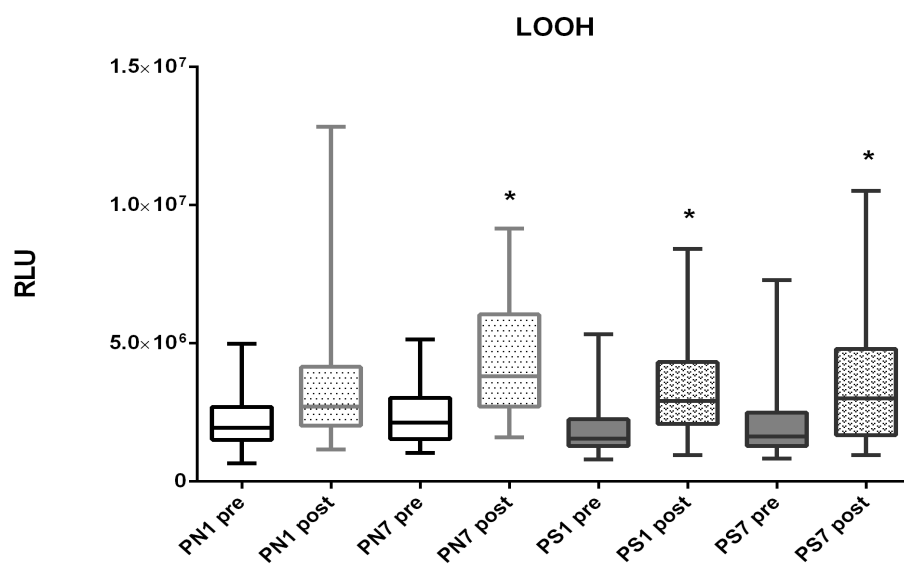


Figure 3: Median levels of Lipid Hydroperoxide (LOOH) pre and post-dialysis in polynephron (PN) and polyethersulfone (PS) dialyzers in the first (1) and seventh (7) use. Except for the first use of the polynephron dialyzer ( $P > 0.05$ ), there was a consistent increase in post-dialysis LOOH levels \* ( $P < 0.001$ ). RLU: relative light units

## TABLES

**Table 1** Demographic and laboratory characteristics of the study participants (n=30)

Age (Years, mean $\pm$ SD)	52.6 $\pm$ 13.7
Male gender no. (%)	18 (60)
Dialysis vintage (months, mean $\pm$ SD, median)	81.26 $\pm$ 79.03, 39
Albumin (g/dL, mean $\pm$ SD)	4.06 $\pm$ 0.40
<b>Co-existing illnesses</b> no. (%)	
Diabetes	8 (26.6)
Hypertension	26 (86.6)
<b>Medications</b> no. (%)	
Statin	9 (30)
Folic acid	7 (23.3)
Erythropoietin	27 (90)

SD = standard deviation

**Table 2.** SOD, catalase, GT, GSH and GSSG pre- and post-dialysis levels at first (1) and seventh (7) use of polynephron dialyzers.

	<b>PN1 pre</b>	<b>PN1 post</b>	<b>PN7 pre</b>	<b>PN7 post</b>
<b>SOD (U/mgHb)</b>	56.1 (10.9-92.8)	56.1 (12.2-93.5)	52.5 (21.5-88.4)	50.3 (26.8-85.1)
<b>Catalase (U/mgHb)</b>	43.4 (22.3-57.1)*	41.5 (20.1-64.0)	53.5 (20.6-85.2)	51.1 (12.6-75.3)
<b>GT (mM/gHb)</b>	7.3 (4.6-11.3)	7.2 (4.7-10.7)	7.4 (5.8-10.8)	7.3 (5.0-9.6)
<b>GSH (mM/gHb)</b>	6.1 (3.8-8.7)	6.1 (3.6-9.7)	6.6 (4.5-9.6)	6.0 (4.3-8.6)
<b>GSSG (mM/gHb)</b>	0.4 (0.0-1.4)	0.5 (0.1-1.4)	0.3 (0.0-1.3)	0.3 (0.0-1.5)

Values are shown as medians (minimum values - maximum values). Friedman test. \*  $P < 0.01$  when compared to PN7 pre. SOD: superoxide dismutase; GT: total glutathione; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; PN1 pre: polynephron, first use, pre-dialysis; PN1 post: polynephron, first use, post-dialysis; PN7 pre: polynephron, seventh use, pre-dialysis; PN7 post: polynephron, seventh use, post-dialysis.

**Table 3.** SOD, catalase, GT, GSH and GSSG pre- and post-dialysis levels at first (1) and seventh (7) use of polyethersulfone (PS) dialyzers.

	<b>PS1 pre</b>	<b>PS1 post</b>	<b>PS7 pre</b>	<b>PS7 post</b>
<b>SOD (U/mgHb)</b>	50.0 (23.7-89.6)	45.4 (10.3-77.8)	51.1 (15.0-99.0)	48.8 (16.4-98.7)
<b>Catalase (U/mgHb)</b>	50.0 (33.2-65.8)	53.0 (30.6-83.4)	50.2 (15.6-73.2)	52.8 (28.0-77.2)
<b>GT (mM/gHb)</b>	6.7 (0.0-12.1)	6.7 (0.0-11.9)	7.0 (5.0-8.6)	6.6 (5.1-10.8)
<b>GSH (mM/gHb)</b>	5.8 (0.0-10.4)	5.9 (0.0-9.7)	6.0 (4.5-7.9)	5.8 (3.8-8.4)
<b>GSSG (mM/gHb)</b>	0.3 (0.0-0.8)	0.3 (0.0-1.1)	0.3 (0.0-1.4)	0.3 (0.1-1.2)

Data are medians (minimum values - maximum values). Friedman test. SOD: superoxide dismutase; GT: total glutathione; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; PS1 pre: polyethersulfone, first use, pre-dialysis; PS1 post: polyethersulfone, first use, post-dialysis; PS7 pre: polyethersulfone, seventh use, pre-dialysis; PS7 post: polyethersulfone, seventh use, post-dialysis.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que a prática do reuso do dialisador até o sétimo uso não interfere com a melhora da atividade da PON 1 após a sessão de hemodiálise e que tanto o reuso como o tipo da membrana dos dialisadores estudados são neutros para os marcadores de atividade antioxidante (SOD, GT, GSH e GSSG), para marcador de oxidação proteica (AOPP) e resultam em aumentos semelhantes de marcador de oxidação lipídica (LOOH) pós-diálise nestes pacientes. Apesar de o resultado da catalase pré-diálise do primeiro uso do dialisador polinefron ter sido menor quando comparado com o pré-diálise do sétimo uso do mesmo dialisador, não podemos considerar este achado como um efeito positivo do reuso; isto merece ser reavaliado em outros estudos. Considerando o potencial da PON1 no processo de aterosclerose e de possível efeito na mortalidade cardiovascular desta população, a constatação de que a prática do reuso não prejudica a atividade da PON1, não reduz as defesas antioxidantes intracelulares e nem piora os valores de LOOH ou de AOPP, tais resultados apontam para o fato de que o reuso dos dialisadores não interfere com a atividade da PON 1 e não piora o estado redox dos pacientes, pelo menos por sete usos dos dialisadores testados. Tais fatos são um tanto quanto tranquilizadores, especialmente para os países em desenvolvimento, onde não há recursos financeiros para sustentar o uso único de dialisadores.

## REFERÊNCIAS

- 1 FOLEY, Robert N.; PARFREY, Patrick S.; SARNAK, Mark J. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 32, n. 5, p. S112-S119, 1998.
- 2 United States Renal Data System. 2016 USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. **National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD**, 2016.
- 3 ATTMAN, Per-Ola; SAMUELSSON, Ola; ALAUPOVIC, Petar. Lipoprotein metabolism and renal failure. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 21, n. 6, p. 573-592, 1993.
- 4 VAN HIMBERGEN, T. M. et al. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. **Neth J Med**, v. 64, n. 2, p. 34-8, 2006.
- 5 DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M. I. Paraoxonase and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 4, p. 473-480, 2001.
- 6 MACKNESS, Michael I.; ARROL, Sharon; DURRINGTON, Paul N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. **FEBS letters**, v. 286, n. 1-2, p. 152-154, 1991.
- 7 LITVINOV, Dmitry; MAHINI, Halleh; GARELNABI, Mahdi. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 11, p. 523, 2012.
- 8 IKEDA, Yukio et al. Low human paraoxonase predicts cardiovascular events in Japanese patients with type 2 diabetes. **Acta Diabetologica**, v. 46, n. 3, p. 239-242, 2009.



- 9 VAN HIMBERGEN, Thomas M. et al. Paraoxonase (PON1) and the risk for coronary heart disease and myocardial infarction in a general population of Dutch women. **Atherosclerosis**, v. 199, n. 2, p. 408-414, 2008.
- 10 IKEDA, Y. et al. Human serum paraoxonase concentration predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients. **Clinical Nephrology**, v. 67, n. 6, p. 358-365, 2007.
- 11 BOSCH, Enrique et al. SP425 Oxidation markers and bisphenol A (BPA) serum levels relationship in hemodialysis (HD) patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. suppl\_3, p. iii518-iii519, 2015.
- 12 GUGLIUCCI, Alejandro et al. Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: correlation with low molecular AGE adduct clearance. **Clinica Chimica Acta**, v. 377, n. 1, p. 213-220, 2007.
- 13 GUGLIUCCI, Alejandro et al. Serum paraoxonase 1 (PON1) lactonase activity is lower in end-stage renal disease patients than in healthy control subjects and increases after hemodialysis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n. 1, p. 61-67, 2011.
- 14 TWARDOWSKI, Zbylut J. History of hemodialyzers' designs. **Hemodialysis International**, v. 12, n. 2, p. 173-210, 2008.
- 15 GOTTSCHALK, Carl W.; FELLNER, Susan K. History of the science of dialysis. **American Journal of Nephrology**, v. 17, n. 3-4, p. 289-298, 1997.
- 16 BLAGG, Christopher R. Belding Hibbard Scribner—Better Known as Scrib. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 12, p. 2146-2149, 2010.
- 17 SHALDON, Stanley; SILVA, H.; ROSEN, S. M. Technique of refrigerated coil preservation haemodialysis with femoral venous catheterization. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5406, p. 411, 1964.

18 DENNY, Gerald B.; GOLPER, Thomas A. Does hemodialyzer reuse have a place in current ESRD care: "To be or not to be"? In: **Seminars in Dialysis**. NIH Public Access, 2014. p. 256.

19 GALVAO, Tais Freire et al. Dialyzer reuse and mortality risk in patients with end-stage renal disease: a systematic review. **American Journal of Nephrology**, v. 35, n. 3, p. 249-258, 2012.

20 UPADHYAY, Ashish; SOSA, Marie Anne; JABER, Bertrand L. Single-use versus reusable dialyzers: the known unknowns. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 2, n. 5, p. 1079-1086, 2007.

21 MACKNESS, Bharti et al. Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. **IUBMB life**, v. 62, n. 6, p. 480-482, 2010.

22 KHERSONSKY, Olga; TAWFIK, Dan S. Structure- reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. **Biochemistry**, v. 44, n. 16, p. 6371-6382, 2005.

23 KERKENI, Mohsen et al. Hyperhomocysteinemia, paraoxonase activity and risk of coronary artery disease. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 821-825, 2006.

24 PARTHASARATHY, Sampath; BARNETT, Joellen; FONG, Loren G. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1044, n. 2, p. 275-283, 1990.

25 ARII, Kaoru et al. Pitavastatin induces PON1 expression through p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in Huh7 cells. **Atherosclerosis**, v. 202, n. 2, p. 439-445, 2009.

26 DEAKIN, Sara et al. Simvastatin modulates expression of the pon1 gene and increases serum paraoxonase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 11, p. 2083-2089, 2003.

27 PARK, Do-Sim et al. Antioxidative Activity after Rosuvastatin Treatment in Patients with Stable Ischemic Heart Disease and Decreased High Density Lipoprotein Cholesterol. **Korean Circulation Journal**, v. 46, n. 3, p. 309-314, 2016.

28 FURLONG, Clement E. Comments on genetic and developmental variability of sensitivity to chlorpyrifos/chlorpyrifos oxon exposure as modulated by plasma paraoxonase (PON1). **Comments provided to US EPA SAP on Chlorpyrifos** <http://www.epa.gov/scipoly/sap/2002/june/chlorphyr.pdf>, 2002.

29 GINSBERG, Gary et al. Genetic polymorphism in paraoxonase 1 (PON1): Population distribution of PON1 activity. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 12, n. 5-6, p. 473-507, 2009.

30 BROPHY, Victoria H. et al. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 6, p. 1428-1436, 2001.

31 TEIBER, John F.; DRAGANOV, Dragomir I.; LA DU, Bert N. Purified human serum PON1 does not protect LDL against oxidation in the in vitro assays initiated with copper or AAPH. **Journal of Lipid Research**, v. 45, n. 12, p. 2260-2268, 2004.

32 ROZENBERG, Orit et al. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 6, p. 774-784, 2003.

33 TWARD, Aaron et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. **Circulation**, v. 106, n. 4, p. 484-490, 2002.

34 SHIH, Diana M. et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. **Nature**, v. 394, n. 6690, p. 284, 1998.

35 MACKNESS, Bharti et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. **Circulation**, v. 107, n. 22, p. 2775-2779, 2003.

36 BHATTACHARYYA, Tamali et al. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. **Jama**, v. 299, n. 11, p. 1265-1276, 2008.

37 JURETIĆ, Dubravka et al. Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. **Croat Med J**, v. 42, n. 2, p. 146-150, 2001.

38 DANTOINE, Thierry F. et al. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, n. 11, p. 2082-2088, 1998.

39 SZTANEK, Ferenc et al. Decreased paraoxonase 1 (PON1) lactonase activity in hemodialyzed and renal transplanted patients. A novel cardiovascular biomarker in end-stage renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 7, p. 2866-2872, 2012.

40 PARAGH, György et al. The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. **Nephron**, v. 80, n. 2, p. 166-170, 1998.

41 ITAHARA, Takashi et al. Serum paraoxonase and arylesterase activities in hemodialysis patients. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 7, n. 3, p. 152-158, 2000.

42 HENNING, Bernhard F.; HOLZHAUSEN, Helge; TEPEL, Martin. Continuous reduction of plasma paraoxonase activity with increasing dialysis vintage in hemodialysis patients. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, v. 14, n. 6, p. 572-576, 2010.

43 TIBBLES, Patrick M.; EDELSBERG, John S. Hyperbaric-oxygen therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 25, p. 1642-1648, 1996.

44 KOHEN, Ron; NYSKA, Abraham. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.

45 HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990.

46 FENTON, H. J. H. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 65, p. 899-910, 1894.

47 HABER, Fritz; WEISS, Joseph. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. In: **Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**. The Royal Society, 1934. p. 332-351.

48 SAWYER, Donald T.; VALENTINE, Joan S. How super is superoxide?. **Accounts of Chemical Research**, v. 14, n. 12, p. 393-400, 1981.

49 HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

50 GOSMANOVA, Elvira O.; LE, Ngoc-Anh. Cardiovascular complications in CKD patients: role of oxidative stress. **Cardiology Research and Practice**, v. 2011, 2011.

51 CUSHING, Susan D. et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 13, p. 5134-5138, 1990.

52 RICHARD BRUCKDORFER, K. et al. The influence of oxidized lipoproteins, oxidation products and antioxidants on the release of nitric oxide from the endothelium and the response of platelets to nitric oxide. **BioFactors**, v. 6, n. 2, p. 191-199, 1997.

53 FERRARO, Barbara et al. Peroxynitrite-induced oxidation of plasma lipids is enhanced in stable hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 63, n. 6, p. 2207-2213, 2003.

- 54 LEVINE, Rodney L. et al. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. **Stress Response: Methods and Protocols**, p. 15-24, 2000.
- 55 YILMAZ, Mahmut Ilker et al. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 47, n. 1, p. 42-50, 2006.
- 56 HIMMELFARB, Jonathan; MCMENAMIN, Elizabeth; MCMONAGLE, Ellen. Plasma aminothiols oxidation in chronic hemodialysis patients. **Kidney international**, v. 61, n. 2, p. 705-716, 2002.
- 57 CEBALLOS-PICOT, IrÈne et al. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 6, p. 845-853, 1996.
- 58 SPITTLE, Margaret A. et al. Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 38, n. 6, p. 1408-1413, 2001.
- 59 HANDELMAN, Garry J. et al. Elevated plasma F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. **Kidney international**, v. 59, n. 5, p. 1960-1966, 2001.
- 60 WITKO-SARSAT, Véronique et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney international**, v. 49, n. 5, p. 1304-1313, 1996.
- 61 WITKO-SARSAT, Véronique et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure<sup>1, 2</sup>. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 5, p. 2524-2532, 1998.
- 62 FLOCCARI, Fulvio et al. Oxidative stress and uremia. **Medicinal Research Reviews**, v. 25, n. 4, p. 473-486, 2005.

63 ZHANG, Zheng et al. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 25, p. 9491-9496, 2004.

64 CHEUNG, Alfred K. Biocompatibility of hemodialysis membranes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 1, n. 2, p. 150-161, 1990.

65 WARD, Richard A.; MCLEISH, Kenneth R. Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors?. **Artificial Organs**, v. 27, n. 3, p. 230-236, 2003.

66 MORENA, Marion et al. Oxidative stress in hemodialysis patients: Is NADPH oxidase complex the culprit?. **Kidney International**, v. 61, p. S109-S114, 2002.

67 CRISTOL, J. P. et al. Enhancement of reactive oxygen species production and cell surface markers expression due to haemodialysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 9, n. 4, p. 389-394, 1994

68 VARAN, H. Ibrahim et al. Acute effects of hemodialysis on oxidative stress parameters in chronic uremic patients: comparison of two dialysis membranes. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 3, p. 39, 2010.

69 WARD, Richard A.; OUSEPH, Rosemary; MCLEISH, Kenneth R. Effects of high-flux hemodialysis on oxidant stress. **Kidney International**, v. 63, n. 1, p. 353-359, 2003.

70 FRANK, Rolf Dario et al. Role of contact system activation in hemodialyzer-induced thrombogenicity. **Kidney International**, v. 60, n. 5, p. 1972-1981, 2001.

71 HOROZ, Mehmet et al. The Influence of Hemodialysis Membrane Permeability on Serum Paraoxonase-1 Activity and Oxidative Status Parameters. **Artificial Organs**, v. 35, n. 10, p. 923-929, 2011.

72 URENA, P. et al. Permeability of cellulosic and non-cellulosic membranes to endotoxin subunits and cytokine production during in-vitro haemodialysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 7, n. 1, p. 16-28, 1992.

72 LONNEMANN, Gerhard et al. Permeability of dialyzer membranes to TNF $\alpha$ -inducing substances derived from water bacteria. **Kidney International**, v. 42, n. 1, p. 61-68, 1992.

74 SCHINDLER, R. et al. Induction of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist during contaminated in-vitro dialysis with whole blood. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 11, n. 1, p. 101-108, 1996.

75 SUSANTITAPHONG, Paweena; RIELLA, Cristian; JABER, Bertrand L. Effect of ultrapure dialysate on markers of inflammation, oxidative stress, nutrition and anemia parameters: a meta-analysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, n. 2, p. 438-446, 2013.

76 RICHTER, Rebecca J.; JARVIK, Gail P.; FURLONG, Clement E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 1, n. 2, p. 147-152, 2008

77 MARKLUND, Stefan; MARKLUND, Gudrun. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **The FEBS Journal**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

78 AEBI, Hugo. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.



79 ANDERSON, Mary E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 548-555, 1985.

80 TIETZE, Frank. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502-522, 1969.

81 HANASAND, Marita et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 9, p. 901-906, 2012.

82 PANIS, C. et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 1, p. 89-97, 2012.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### **“Efeito do reúso e do tipo da membrana do dialisador sobre a atividade da paraoxonase 1 de pacientes em hemodiálise”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“Efeito do reúso e do tipo da membrana do dialisador sobre atividade da paraoxonase 1 de pacientes em hemodiálise”**, a ser realizada nesta clínica de hemodiálise (Instituto do Rim de Londrina). O objetivo da pesquisa é determinar se o reúso do dialisador e do tipo de sua membrana influenciam na atividade da paraoxonase 1. Esta substância pode ser importante para a proteção contra doenças cardiovasculares como o infarto do miocárdio. Será também estudado o efeito do reuso do dialisador sobre algumas outras substâncias que interferem com a produção e remoção de substâncias oxidantes do organismo humano. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: através da coleta de 10ml de sangue no dia dos exames mensais (imediatamente antes da sessão de hemodiálise) e de 10ml de sangue ao final da sessão neste dia. Esta coleta se repetirá em outras 3 ocasiões. Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Após a análise dos marcadores do estudo, o material colhido será descartado.

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

Não existe um benefício imediato para os participantes da pesquisa, mas os seus resultados poderão ajudar no entendimento do efeito do reúso do dialisador sobre estas substâncias. Quanto aos riscos, estes são os mesmos apresentados durante a

coleta dos exames mensais para a avaliação do tratamento de hemodiálise. Caso algum evento adverso, decorrente do processo de coleta da amostra de sangue necessária para a pesquisa ou outro evento atribuível à sua participação neste estudo ocorra, adotaremos as medidas médicas apropriadas para garantir sua integridade.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar aqui mesmo na clínica, ou com o pesquisador Reynaldo Miguita Junior pelo telefone (43) 3132-7000 , e-mail: [miguitajunior@gmail.com](mailto:miguitajunior@gmail.com), endereço: Rua Eng. Omar Rup, 100 - Jardim Ipiranga, Londrina – PR, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br)..

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

Reynaldo Miguita Junior

CRM18035

**Pesquisador Responsável**

\_\_\_\_\_, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

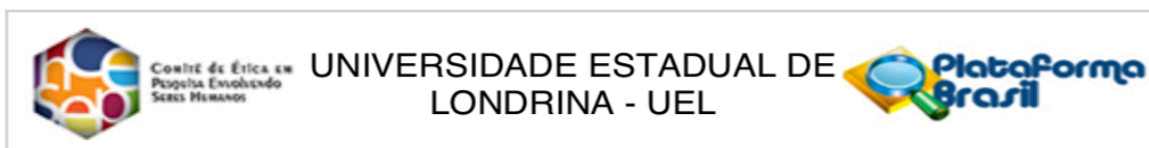
Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### Aprovação do CEP/Uel



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito do reúso e do tipo de membrana do dialisador sobre a atividade da paraoxonase 1 de pacientes em hemodiálise.

**Pesquisador:** Reynaldo Miguita Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 56111616.9.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCS - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Stricto sensu

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.585.869

##### Apresentação do Projeto:

O arquivo "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_700505.pdf" em seu item Introdução diz: A doença cardiovascular (DCV) é um importante fator de mortalidade em pacientes renais crônicos em diálise. Possui gênese multifatorial, e responde por quase 50% das mortes nesta população. Pacientes em hemodiálise (HD) apresentam perfil lipídico anormal, caracterizado por níveis elevados de triglicérides, de lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e níveis diminuídos de lipoproteína de densidade alta (HDL). A paraoxonase 1 (PON1) tem atraído significativo interesse por ser a proteína responsável pela maior parte da atividade antioxidante da HDL. Em pacientes em HD, a atividade reduzida da PON1 foi demonstrada estar associada a maior mortalidade cardiovascular. No tratamento dos pacientes renais crônicos através de HD o sangue atravessa um filtro (dialisador) que é composto por fibras ocas formadas por uma membrana semipermeável onde ocorrem as trocas entre o sangue e o fluido de diálise (dialisato). O tratamento se repete três vezes por semana com duração de 4 horas cada sessão de HD. As membranas dos hemodialisadores são compostas por diferentes substâncias como celulose, celulose modificada, celulose sintética e membranas sintéticas como a polissulfona, que são mais biocompatíveis. Recentemente, uma nova membrana sintética, polinefron, foi introduzida no mercado nacional. Tal membrana é composta de poliétersulfona mas, diferentemente do que ocorre com outras

**Endereço:** LABESC - Sala 14

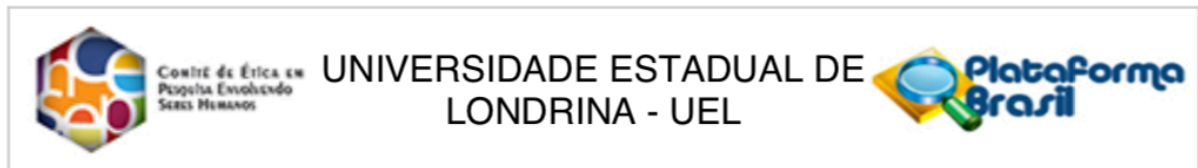
**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR **Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.585.869

membranas de diálise como o polissulfona, é desprovida de bisfenol (BPA, um agente com potencial de interferir no funcionamento de várias glândulas endócrinas) em sua estrutura. Estudo recém-publicado demonstrou ocorrer significativo aumento de BPA plasmático em pacientes hemodialisados com membranas de polissulfona e que o inverso ocorre em pacientes dialisados com polinefron. Além disto, quando se compara os pacientes em hemodiálise com dialisadores de polissulfona versus polinefron, ocorre aumento de marcadores de estresse oxidativo nos utilizando polissulfona. Os dialisadores podem ser desprezados após uso único ou serem processados manual ou automaticamente e serem posteriormente reutilizados, sempre para o mesmo paciente (prática do reuso). Esta prática possui vantagens e desvantagens, porém, no Brasil e em muitos outros países ocorre principalmente por motivos econômicos. Estudos têm demonstrado que após a sessão de HD a atividade da PON1 aumenta. Não se sabe a influência do reuso e do tipo da membrana do dialisador na atividade da PON1. Além disto, há poucos estudos sobre efeito do reuso sobre a atividade antioxidante enzimática intracelular em eritrócitos. O paciente em HD apresenta estresse oxidativo aumentado e inflamação que estão associados à mortalidade cardiovascular elevada. Em função do exposto, portanto o conhecimento do efeito do reuso e do tipo de membrana do dialisador na atividade da PON1 e as repercussões sobre o ambiente redox intracelular em hemácias merecem maiores investigações.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Identificar o efeito do reuso de dois tipos de dialisadores (polinefron e polissulfona) sobre a atividade da PON1 de pacientes em HD.

Objetivo Secundário:

Demonstrar o efeito do reuso de dois tipos de dialisadores (polinefron e polissulfona) sobre alguns biomarcadores de agressão oxidativa e defesa antioxidante de pacientes em HD.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

O estudo não acrescenta riscos maiores aqueles do tratamento de hemodiálise já realizado pelos pacientes.

Benefícios:

Os pacientes envolvidos não estarão sujeitos a nenhum benefício imediato pela participação no estudo.

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

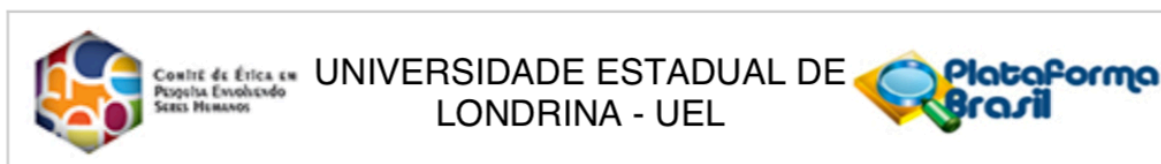
**UF:** PR

**Telefone:** (43)3371-5455

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.585.869

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa visa determinar o efeito do reuso do dialisador na atividade da paraoxonase 1. Este CEP entende e ressalta a relevância do estudo e considera que todos os esclarecimentos solicitados foram devidamente prestados, estando este projeto de pesquisa apto a ser realizado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta todos os termos de apresentação obrigatória devidamente preenchidos e assinados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_700505.pdf	05/06/2016 10:42:22		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_recomendadoCEP.pdf	05/06/2016 10:41:49	Reynaldo Miguita Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	05/06/2016 10:40:00	Reynaldo Miguita Junior	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	05/06/2016 10:38:54	Reynaldo Miguita Junior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Instcoparticipante.pdf	15/05/2016 11:44:25	Reynaldo Miguita Junior	Aceito
Outros	Termo_Confidencialidade.pdf	26/04/2016 18:53:20	Reynaldo Miguita Junior	Aceito

**Situação do Parecer:**

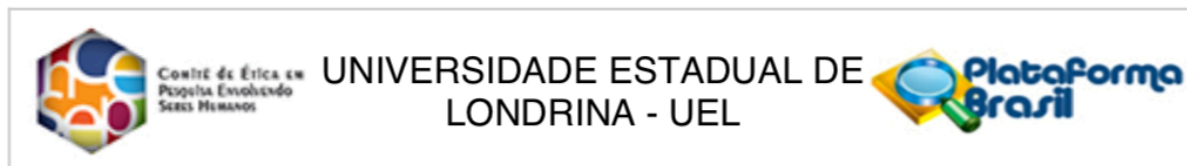
Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

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





Continuação do Parecer: 1.585.869

LONDRINA, 12 de Junho de 2016

---

**Assinado por:**  
**Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br