



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LAURA DE OLIVEIRA SEMEÃO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO/NITROSATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA
RENAL CRÔNICA NO ESTÁGIO PRÉ DIALITICO E EM
HEMODIÁLISE**

Londrina
2022

LAURA DE OLIVEIRA SEMEÃO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO/NITROSATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA
RENAL CRÔNICA NO ESTÁGIO PRÉ DIALITICO E EM
HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestra.

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa

Londrina
2022

LAURA DE OLIVEIRA SEMEÃO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO/NITROSATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA
RENAL CRÔNICA NO ESTÁGIO PRÉ DIALITICO E EM
HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestra.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof^a. Dr^a. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de abril de 2022.

Tudo é possível para quem tem coragem

JK Rowling

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado oportunidades e sabedoria.

Agradeço a minha mãe Railda maravilhosa que sem incentivo, mãetrocínio e paciência, não teria tido determinação para essa jornada.

Gostaria de agradecer aos amigos, que fizeram parte dessa trajetória de alguma forma, entendendo os momentos em que eu não podia estar presente. Paulinha, Dani, Carol, Marina, Iasmin, Junior, Naomi, Gi, Rapha.

Aos amigos do Laboratório de Pós-Graduação: Kamila, Luciana, Carine, e em especial Pauli e Keiko que sem elas eu com certeza não estaria escrevendo os agradecimentos, obrigada por sempre ajudar e compartilhar conhecimento, não chegaria aqui sem a paciência e o ensinamento de cada uma de vocês.

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

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

SEMEÃO, Laura de Oliveira. **Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo/nitrosativo em pacientes com doença renal crônica no estágio pré-dialítico e em hemodiálise**. 2022. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Introdução: A doença renal crônica (DRC) é representada por um grupo de condições heterogêneas que afetam a estrutura e função dos rins. O estresse oxidativo/nitrosativo (EO/EN) é um desequilíbrio entre compostos antioxidantes e pró-oxidantes, sendo que este último pode contribuir para danos irreversíveis à proteínas, lipídeos, DNA e, conseqüentemente, podendo auxiliar na progressão da DRC. **Objetivo:** mensurar níveis de biomarcadores de EO/EN em pacientes em estágios pré-dialíticos e em hemodiálise (HD), comparando-os entre si e entre indivíduos sem comorbidade com a finalidade de verificar o quanto a DRC altera estes biomarcadores e demais marcadores bioquímicos em resultados laboratoriais de rotina. **Materiais e Métodos:** foi realizado um estudo controlado com amostra 114 de pacientes com DRC distribuídos em quatro grupos, de acordo com a classificação da sua taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) onde, 3a (n= 23), 3b (n= 34), 4 (n= 21) e HD (n= 26) e comparados entre si e com um grupo controle saudável (n=23). Foram realizadas análises de alguns biomarcadores do EO/EN a saber: SOD, CAT, PON, GT, GSH, GSSG, NOx, LOOH, SH e AOPP. Na análise estatística as variáveis foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) complementada com teste de Tukey ou Dunnet T3 ou por Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn. As associações entre dois sistemas categóricos foram verificadas por meio de análises de tabelas de contingência e uma curva característica de operação do receptor (ROC). **Resultados:** aumento significativo do grupo HD em relação ao controle nos biomarcadores pró-oxidantes NOx e GSSG e nos biomarcadores antioxidantes SOD, GT e GSH. SH e PON encontraram diminuídos quando comparados o grupo HD aos demais. Além disso, a AOPP mostrou-se aumentada conforme a progressão da doença. **Conclusão:** O presente trabalho evidencia o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) em pacientes pré-dialíticos e em HD, conforme a progressão da DRC. Frente aos dados apresentados, defende-se a ideia do uso dos níveis de GSSG, GSH e PON como auxiliares no monitoramento do quadro do paciente com DRC e a AOPP como potencial biomarcador no auxílio do acompanhamento da progressão da DRC em pacientes pré-dialíticos (3-4) e dialíticos.

Palavras-chave: doença renal crônica; estresse oxidativo/nitrosativo; progressão da doença; produtos avançados de oxidação proteica; sistema glutatona.

SEMEÃO, Laura de Oliveira. **Evaluation of oxidative/nitrosative stress biomarkers in patients with chronic renal disease at the pre-dialytic stage and hemodialysis.** 2022. 48 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Introduction: A chronic kidney disease (CKD) is represented by a group of heterogeneous conditions that affect the structure and function of the kidneys. Oxidative/nitrosative stress (OS/NS) is an imbalance between antioxidant and pro-oxidant compounds, the latter can contribute to irreversible damage to proteins, lipids, DNA and, consequently, may assist in the progression of the CKD. **Objective:** Measure levels of OS/NS biomarkers in patients in pre-dialysis and hemodialysis (HD), comparing them and among individuals without comorbidity for the purpose of verifying how much CKD changes these biomarkers as well as laboratory results of routine. **Materials and methods:** A study controlled with sample 114 of patients with CKD distributed in four groups, according to the classification of their estimated glomerular filtration rate (GFR_e) where, 3a (n = 23), 3b (n = 23) 34), 4 (n = 21) and HD (n = 26) and compared to each other and with a healthy control group (n = 23). Analyzes of some OS/NS namely biomarkers were performed: SOD, CAT, PON, GT, GSH, GSSG, NO_x, LOOH, SH and AOPP. In statistical analysis The variables were evaluated by analysis of variance (ANOVA) complemented with test of Tukey or Dunnet T3 or by Kruskal-Wallis complemented with the Dunn test. Associations between two categorical systems were verified by means of contingency table analyzes and a characteristic curve of receiver operation (ROC). **Results:** Significant increase in HD group in relation to control in NO_x and GSSG pro-oxidant biomarkers and antioxidant biomarkers SOD, GT and GSH. SH and PON found diminished when compared to the HD group to the others. In addition, AOPP was increased according to the progression of the disease. **Conclusion:** This work shows the increase in the levels of reactive oxygen and nitrogen (ROS/RNS) species in pre-dialic and HD patients, according to the progression of CKD. Faced with the data presented, the idea of the use of GSSG, GSH and PON1 levels are advocated as auxiliaries in monitoring the patient framework with CKD and AOPP as a potential biomarker in the aid of the accompanying CKD progression in pre-dialytic patients (3-4) and dialytics.

Key words: chronic kidney disease; oxidative/nitrosative stress; progression of disease; advanced protein oxidation products; glutathione system.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Dados demográficos de pacientes com doença renal crônica (DRC) pré-dialíticos e em hemodiálise30
- Tabela 2** – Dados de biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes pré-dialíticos com DRC e em hemodiálise31
- Tabela 3** – Resultados da análise de odds ratio baseada na DRC pré-dialise (3a a 4 estágios) e pacientes em hemodiálise como variável dependente e os biomarcadores de estresse oxidativo como variáveis exploratórias.....32
- Tabela 4** – Resultados do escore Receiver Operating Characteristic (ROC) baseado na DRC pré-dialítica (3a a 4 estágios) e pacientes em hemodiálise como variável dependente e os biomarcadores antioxidantes como variáveis exploratórias.....33
- Tabela 5** – Resultados do escore de característica de operação do receptor (ROC) com base em pacientes pré-dialíticos (A) e hemodiálise (B) como variável dependente e os biomarcadores antioxidantes como variáveis exploratórias.....35
- Tabela 6** – Resultados do escore Receiver Operating Characteristic (ROC) baseado na DRC pré-dialise (3a a 4 estágios) e pacientes em hemodiálise como variável dependente e os biomarcadores pró-oxidantes como variáveis exploratórias36
- Tabela 7** – Resultados do escore de característica de operação do receptor (ROC) com base em pacientes pré-dialíticos (A) e hemodiálise (B) como variável dependente e os biomarcadores pró-oxidantes como variáveis exploratórias38

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Resultados do escore Receiver Operating Characteristic (ROC) baseado na DRC pré-dialítica (3a a 4) e pacientes em hemodiálise como variável dependente e os biomarcadores antioxidantes como variáveis exploratórias.....34
- Gráfico 2** – Resultados do escore Receiver Operating Characteristic (ROC) baseado na DRC pré-diálise (3a a 4 estágios) e pacientes em hemodiálise como variável dependente e os biomarcadores oxidativo como variáveis exploratórias.....37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tomada de decisão de encaminhamento por TFG e albuminúria.....	14
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CAT	Catalase
DCV	Doença Cardiovascular
DM	Diabetes Mellitus
DRC	Doença Renal Crônica
DTNB	5,5-ditiobis 2-nitrobenzólico
EN	Estresse Nitrosativo
EO	Estresse Oxidativo
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
HD	Hemodiálise
HDL	High Density Lipoproteins
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes- CKD Evaluation and Management
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
LDL	Low Density Lipoproteins
LOOH	Hidroperóxidos Lipídicos
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NOx	Metabólitos do Óxido Nítrico
PON-1	Paraoxonase-1
SH	Grupamento Sulfidrila
SOD	Superóxido Dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TNB	Ácido Tionitrobenzólico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	DESENVOLVIMENTO	14
2.1	DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	14
2.2	DRC E EO	16
2.2.1	ANTIXIDANTES	17
2.2.2	PRÓ-OXIDANTES	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVOS GERAIS	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	AMOSTRAGEM.....	21
4.2	ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO.....	21
4.3.1	DETERMINAÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	21
4.3.2	DETERMINAÇÃO DA CATALASE (CAT)	22
4.3.3	DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL (GT), GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) E GLUTATIONA OXIDADA (GSSG).....	22
4.3.4	DETERMINAÇÃO DE GRUPAMENTOS SULFIDRILA (SH)	22
4.3.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PARAOXONASE-1 (PON-1)	22
4.3.6	DETERMINAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS POR QUIMILUMINESCÊNCIA (CL-LOOH)	23
4.3.7	METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO	23
4.3.8	DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTEICA (AOPP)	23
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é um problema de saúde pública que afeta aproximadamente de 8 a 13% da população, envolvendo homens e mulheres em todas as idades (KRATA et al., 2018). Em 2010, cerca de 1,9 milhões de pacientes com DRC submeteram-se à hemodiálise (HD) no mundo, por ser um tratamento eficaz para insuficiência renal, melhorando consideravelmente a qualidade de vida (KE et al., 2018).

A DRC é uma patologia caracterizada pela perda de estruturas ou função renal em um período igual ou superior a três meses, de acordo com as diretrizes *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO), causando implicações na saúde do paciente (KDIGO 2021). As estruturas renais podem ser afetadas por cistos, tumores, malformações e atrofia, enquanto a função pode ser prejudicada por comorbidades. A fibrose renal é a manifestação clínica mais comum na DRC (ROMAGNANI et al., 2017). As principais causas da DRC são *diabetes mellitus* (DM), hipertensão, glomerulonefrite e doenças cardiovasculares (DCV) (KRATA et al., 2018).

A DRC está associada ao aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs) e defesas antioxidantes insuficientes, começando já nos estágios iniciais da doença e contribuindo para a progressão da mesma (LEVIN et al., 2018).

Avalia-se a perda progressiva da função renal através da estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG) e quantificação da proteinúria. Essa perda da função renal está associada ao risco aumentado para doenças cardiovasculares (DCV) e DRC, podendo induzir ao estágio final da doença renal com a necessidade de terapias renais substitutivas como a HD ou até transplante (KRATA et al., 2018; RAVAROTTO et al., 2018).

A HD é o tratamento para estes pacientes e que tem sido bem-sucedido em prolongar a vida dos pacientes com alterações no exame de urina como a hematúria glomerular, ou achados histopatológicos vistos em biópsias renais como alterações glomerulares com ou sem envolvimento túbulo intersticial. A HD é eficaz na correção de anormalidades metabólicas relacionadas ao estresse oxidativo e nitrosativo (EO/EN), sendo este termo utilizado para caracterizar um desequilíbrio nos níveis de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011; REZAEI; MOHHAMADI, 2018).

As diretrizes da *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI) e *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) classificam a DRC nos estágios 1 a 5 com base na extensão do dano renal, como albuminúria e/ou diminuição da TFG. Essas diretrizes indicam que, independentemente da etiologia, uma vez que a redução e/ou perda da função dos néfrons atinge um limiar, resulta em declínio na TFG. Como a TFG por si só não manifesta nenhum sintoma clínico até o estágio 4 a 5, é importante avaliar tanto a TFG quanto a proteinúria para melhorar a acurácia do prognóstico da progressão da DRC (CHELLUBOINA; VEMUGANTI, 2019).

A nefropatia diabética é a causa mais comum de doença renal no indivíduo diabético, podendo cursar com perda renal e necessidade de HD nessa população. Nos estágios avançados da nefropatia, a diminuição da TFG ocorre juntamente com a disfunção renal progressiva, causada também pelo acúmulo de citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas nos glomérulos, levando à proteinúria (PICKERING et al., 2018; FARKHONDEH et al., 2019).

Na DRC algumas substâncias endógenas tendem a se acumular, como o ácido úrico, excretado principalmente pelos rins. Devido à sua excreção renal, qualquer diminuição na TFG é acompanhada pela retenção subsequente deste composto azotado (ROUMELIOTIS et al., 2019).

A uremia, caracterizada pelo aumento de ureia e de outras substâncias azotadas no sangue devido ao comprometimento da TFG, está presente em pacientes com insuficiência renal e também é fortemente associada a danos mitocondriais além do EO/EN (DUNI et al., 2017; TAYLOR, BHANDARI, SEYMOUR 2015). As toxinas urêmicas (ureia, creatinina, homocisteína, fósforo inorgânico, guanidinas, entre outras) são metabólitos que podem promover peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e redução na concentração de enzimas antioxidantes que levam à progressão da DRC (STEPNIEWSKA et al., 2015).

O mecanismo por trás do EO/EN em pacientes com DRC é complexo e multifatorial e ainda não totalmente elucidado. Fatores como níveis reduzidos de antioxidantes, aumento da geração de EROs/ERNs, e a presença de toxinas urêmicas na DRC, predis põem os pacientes a possíveis danos oxidativos. Além disso, os produtos derivados do EO/EN oxidam as lipoproteínas de baixa densidade e os radicais lipídicos formados ativam células imunes, incluindo monócitos e macrófagos, induzindo à inflamação e à liberação de mais radicais livres, que são espécies químicas altamente reativas por possuírem um elétron livre em sua camada de valência (NUHU; BHANDARI, 2018).

Pelo exposto, fica nítida a importância de se estudar cada vez mais aspectos relacionados à DRC bem como a possível ligação entre esta doença e o EO/EN. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi o de avaliar níveis de alguns biomarcadores de EO/EN pró-oxidantes e antioxidantes no sangue de pacientes nos estágio da DRC comparados entre si e a um grupo controle.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

A DRC é definida como anormalidade na estrutura ou função renal, presentes por mais de três meses, com implicações à saúde. Nessa condição, podemos encontrar algumas alterações no sedimento urinário como hematúria microscópica isolada, presença de eritrócito na glomerulonefrite proliferativa, cilindros leucocitários em pielonefrite ou nefrite intersticial, corpos gordurosos ovais ou cilindros gordurosos em doenças com proteinúria além de cilindros granulosos e células epiteliais tubulares renais. Podemos observar outras anormalidades devido a distúrbios tubulares identificados pela histologia ou por exame de imagem em doenças glomerulares (diabetes, doenças autoimunes, infecções sistêmicas, medicamentos, neoplasias); doenças vasculares (aterosclerose, hipertensão, isquemia, vasculite, microangiopatia trombótica); doenças tubulointersticiais (infecções do trato urinário, cálculos, obstrução, toxicidade por drogas) e doenças císticas ou congênitas além de história de transplante renal e TFG diminuída ($<60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$) (KDIGO, 2021).

				Categorias de albuminúria persistente		
				Descrição e intervalo		
				A1	A2	A3
				Normal ou levemente aumentado	Moderadamente aumentado	Severamente aumentado
				$<30\text{ mg/g}$ $<3\text{ mg/mmol}$	$30\text{--}300\text{ mg/g}$ $3\text{--}30\text{ mg/mmol}$	$>300\text{ mg/g}$ $>30\text{ mg/mmol}$
				Categorias de TFG ($\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$) Descrição e intervalo	G1	Normal
G2	Levemente diminuído	60–89			Monitorar	Encaminhar*
G3a	Leve a moderadamente diminuído	45–59	Monitorar		Monitorar	Encaminhar
G3b	Moderadamente ou severamente diminuído	30–44	Monitorar		Monitorar	Encaminhar
G4	Severamente diminuído	15–29	Encaminhar*		Encaminhar*	Encaminhar
G5	Falência Renal	<15	Encaminhar		Encaminhar	Encaminhar

Tomada de decisão de encaminhamento dos pacientes por TFG e albuminúria. * Os médicos que os encaminharam podem desejar discutir com seus serviços de nefrologia, dependendo das disposições locais relativas ao monitoramento ou encaminhamento.

Figura 1. Tomada de decisão de encaminhamento por TFG e albuminúria (Adaptado KDIGO, 2021).

Recomenda-se que a DRC seja classificada com base na causa, seu estágio, conforme a TFG em que a doença se encontra e presença de albuminúria. A causa da DRC

pode ser atribuída com base na presença ou ausência de doença sistêmica e na localização no rim de achados patológico-anatômicos observados ou presumidos (KDIGO 2021).

No Brasil, as taxas de incidência e prevalência da DRC crescem de forma acelerada, sendo que, no ano de 2000, o número estimado de pacientes em terapia de substituição renal foi de 42.695 e, em julho de 2012, alcançou a marca de 97.586. Esta avaliação, no Brasil, conforme preconizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS), considera que diagnosticar e tratar pacientes com DRC em suas fases iniciais pode auxiliar na redução da sobrecarga para o SUS, lentificando suas complicações, adiando o emprego da HD e necessidade de transplante (PEREIRA et al., 2016).

Tendo em vista os diversos fatores e comorbidades associados à DRC, o paciente que apresenta uma ou mais destas características, deve ser avaliado periodicamente por meio de exame de urina, albuminúria, creatinina sérica e cálculo da TFG como conduta de triagem para diagnóstico precoce (PEREIRA et al., 2016). No período de 2009 a 2018, houve aumento progressivo do número de pacientes em programa de diálise crônica, correspondendo a um aumento médio anual de 5.587 pacientes (NEVES et al., 2020).

O aumento anual no número de novos pacientes com doença renal que necessitam de transplante renal, assim como a procura e a oferta de rins, levou à expansão progressiva da espera de transplante renal na lista mundial. Isto se tornou um grande problema, pois muitos pacientes morrem enquanto esperam para receber um rim. No Brasil, o número de transplantes renais realizados por ano atende apenas uma média de 30% do total das pessoas que aguardam em fila por este órgão (BATISTA et al., 2017).

Para melhorar a função renal comprometida na DRC, existe uma remoção fisiológica compensatória do ácido úrico, embora não seja suficiente à medida que a DRC progride. Evidências sugerem que a hiperuricemia não é apenas um resultado laboratorial, mas também um fator de risco para DRC, através de vários mecanismos patogênicos moleculares. Além da função renal comprometida, outras condições associadas às DCV e alta mortalidade, como obesidade, diabetes, hipertensão e síndrome metabólica, surgem como fatores de risco para hiperuricemia (ROUMELIOTIS et al., 2019).

Pacientes em HD apresentam fatores de risco cardiovascular e uma taxa de mortalidade substancialmente mais alta (ALSHAHAWAY et al., 2019). O tratamento no estágio 5 da DRC requer um rigoroso e complexo regime terapêutico além da HD, como a terapia medicamentosa, dieta e controle de fluidos, tendo esses aspectos do tratamento uma influência direta nas taxas de morbidade e mortalidade que envolvem a doença, com resultados negativos em pacientes que não acatam essas recomendações (LINS et al., 2018).

O aumento da homocisteína tem sido associado à prevalência de DRC. Durante a progressão da DRC, os níveis de homocisteína na HD são significativamente elevados.

Concentrações mais altas de homocisteína correlacionaram-se com aumento dos níveis de cistatina C em indivíduos de meia idade sem DRC, destacando seu papel potencial como marcador de disfunção renal precoce (KATSIKI; PEREZ-MARTINEZ; MIKHAILIDIS, 2017).

Um dos mecanismos fisiopatológicos para DCV em pacientes com DRC é a formação generalizada e possivelmente acelerada de placas ateroscleróticas devido à hiperlipidemia, toxinas urêmicas, inflamação e EO/EN (BULBUL et al., 2018). Cerca de 30-50% dos pacientes com DRC apresentam níveis aumentados de proteína-C-reativa e de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas as interleucinas IL-1 e IL-6 (PLASTINA et al., 2019).

A inflamação e o EO/EN interagem em um ciclo e impulsionam a progressão da DRC, DCV e outras complicações, como desnutrição, aterosclerose, calcificação da artéria coronária, insuficiência cardíaca, anemia e distúrbios minerais e ósseos. Níveis elevados de EROs/ERNs foram encontrados nos estágios iniciais da DRC, que aumentam paralelamente à progressão para DRC e ainda mais em pacientes em HD (COLOMBO et al., 2020).

2.2 DRC E ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO

O rim é um órgão com demanda energética muito alta, e isso o torna mais vulnerável a danos causados pelo EO/EN. Por sua vez, o EO/EN está associado à progressão da doença renal. A ligação entre a DRC e suas complicações é verificada por vários mecanismos, como desacoplamento do óxido nítrico sintase endotelial induzido por toxinas urêmicas (como já descrito acima), perda de antioxidantes devido a restrições alimentares, uso de diuréticos e/ou diminuição da absorção intestinal (DAENEN et al., 2019).

A inflamação crônica evidenciada nesses pacientes está diretamente ligada ao EO/EN e o procedimento de HD pode, possivelmente, ativar mecanismos pró-oxidantes, como a oxidação de proteínas plasmáticas e lipídeos. Além disso, toda sessão de HD é caracterizada por perda de moléculas antioxidantes como vitaminas C, D e E. Por fim, níveis séricos de EROs/ERNs podem aumentar após cada sessão de HD através da bioincompatibilidade da membrana (DENG et al., 2017; LIAKOPOULOS et al., 2019; OGUNLEYE et al., 2018).

Vários mecanismos foram postulados como responsáveis pelo aumento do EO/EN nos indivíduos em HD e, alguns estudos, sugeriram que esse aumento pode ser devido à produção de EROs/ERNs na superfície das membranas de diálise e ativação de neutrófilos em pacientes submetidos a este tratamento (OGUNLEYE et al., 2018).

O acúmulo de toxinas urêmicas como o p-cresol e o sulfato de indoxil podem potencializar processos inflamatórios (RAVAROTTO et al., 2018). A toxina indoxil sulfato confere um risco cardiovascular adicional à DRC e regula positivamente a expressão da molécula de adesão intercelular-1 e da proteína quimiotática-1 de monócitos. Também induz à ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e causa a

produção de EROs/ERNs. Assim como a forma conjugada de p-cresol, o sulfato de p-cresol, também leva à produção desses radicais de maneira dependente do tempo e da concentração (NUHU; BHANDARI, 2018). Além do p-cresol e do sulfato de indoxil, a quantificação da homocisteína é interessante para o acompanhamento de pacientes com DRC. A homocisteína é um aminoácido sulfurado formado a partir da desmetilação da metionina, sendo esta, reação dependente de vários cofatores nutricionais de vitamina B, como a vitamina B12 e vitamina B6 (folato). Um aspecto emergente do metabolismo da homocisteína é sua relação com a saúde e a doença. Uma perturbação no metabolismo da homocisteína, particularmente intracelular, pode ser a responsável pelo acúmulo de homocisteína em circulação (PASTORE et al., 2015).

Tal fato é apoiado por evidências na constatação do aumento da atividade ou expressão da NADPH oxidase em modelos animais de disfunção renal. Nesse sentido, as NADPH oxidases são um grupo de enzimas que reduzem o oxigênio molecular ao radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), fornecendo o ponto de partida para a geração de outros oxidantes reativos, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peróxidos lipídicos e peroxinitritos ($ONOO^-$). A família NADPH oxidase consiste em cinco isoformas e uma delas é expressa no nos túbulos proximais renais (NUHU; BHANDARI, 2018).

Outros problemas relacionados à DRC são distúrbios neurológicos pela oxidação da mielina e anemia, havendo diminuição da vida útil dos eritrócitos, pela deficiência de ferro, sendo resultante do aumento da rigidez da membrana e também a menor síntese dessas moléculas. A morte dos eritrócitos libera ferro e aumenta a chance de EO/EN. O EO/EN, em si, pode alterar as propriedades da membrana dos eritrócitos além de induzir a inflamação, fibrose e acelerar o envelhecimento (KRATA et al., 2018; LING; KUO, 2018).

2.2.1 Biomarcadores Antioxidantes

O comprometimento dos mecanismos antioxidantes é um fenômeno precoce e progressivo no avanço da DRC. Esta progressão resulta em alterações ateroscleróticas anteriores ao estágio 5, nas quais o principal papel é o distúrbio no equilíbrio redox (RASOOL et al., 2017).

Os antioxidantes podem ser moléculas endógenas ou advindas da dieta (LIAKOPOULOS et al., 2019). Lesões renais agudas e crônicas podem diminuir as enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (BANAEI; REZAGHOLIZADEH, 2019). A SOD é um antioxidante eficaz que evita danos causados por EROs/ERNs. Dados de estudo *in vitro* e *in vivo* sugerem que o ácido úrico, em níveis normais, preserva a estrutura e a função da SOD extracelular, impedindo sua neutralização oxidativa mediada pela aterosclerose (ROUMELIOTIS et al., 2019). A significância das EROs/ERNs na progressão da DRC tem sido demonstrada em

estudos nos quais os antioxidantes endógenos, incluindo niacina, melatonina e ácidos graxos, protegem contra a lesão renal. (LING; KUO, 2018; YARIBEYGI et al., 2019).

Distúrbios renais podem modificar as concentrações de apolipoproteínas, proteínas de transferência lipídica e enzimas ligadas às partículas de lipoproteínas de alta densidade HDL, o que pode afetar diretamente a maturação, o catabolismo e a atividade biológica. A HDL representa uma classe de lipoproteínas, cujas partículas podem ser diferentes em composição e função. Em circunstâncias normais, as partículas de HDL protegem contra a aterosclerose através do transporte reverso de colesterol, mas também se comportam como antioxidantes, removendo moléculas oxidantes da parede arterial e limitando a modificação oxidativa do LDL (KUCHTA et al., 2019). A DRC é um estado patológico associado à atividade antioxidante prejudicada das partículas de HDL, devido à atividade reduzida de enzimas associadas ao HDL, como a paraoxonase 1 (PON-1). Uma das possíveis vias de perda da atividade biológica pelas partículas de HDL na DRC é o aumento da atividade da mieloperoxidase no curso dos processos ateroscleróticos na parede da artéria humana (KUCHTA et al., 2019).

As perturbações nos sistemas antioxidantes celulares também têm impacto nos eventos de sinalização durante a patogênese da DRC, contribuindo para a apoptose celular, fibrose e diminuição da regeneração das células renais (LV et al., 2018).

2.2.2 Biomarcadores Pró-oxidantes

De acordo com Ling *et al.*, (2018), o declínio da função renal está associado ao aumento dos níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), tornando este um marcador promissor para avaliação da progressão da DRC. A AOPP comumente se acumula no rim e no plasma de pacientes com DRC, sendo uma família de compostos proteicos oxidados. Os rins reticulam os produtos proteicos do EO/EN criado pela reação da proteína plasmática com oxidantes clorados. Esses produtos são mediadores patogênicos de lesão renal (DENG et al., 2017). A albumina sérica é a principal fonte de AOPP quando é atacada por EROs/ERNs. Em pacientes com DRC, a quantificação deste biomarcador não está apenas associada à progressão da insuficiência renal, mas também possui uma relação muito significativa com eventos proteínas de fase aguda. Os níveis de AOPPs foram inversamente correlacionados com a TFG nos pacientes com DRC (RASOOL et al., 2017).

Nas células, o $O_2^{\cdot-}$ é o primeiro radical gerado nas mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomos e citosol. Na membrana plasmática e nos neutrófilos, o $O_2^{\cdot-}$ é formado pela transferência de elétrons para o oxigênio molecular através de uma reação enzimática catalisada pela família NADPH oxidases ligadas à membrana. Uma vez gerado o $O_2^{\cdot-}$, ele se torna um precursor para a formação de outras EROs/ERNs na célula. A SOD converte $O_2^{\cdot-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode gerar radical hidroxila (OH^{\cdot})

altamente reativo ao interagir com íons de metais de transição como o ferro, catalisado por mieloperoxidase (DUNI et al., 2019). A redução nos níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) acarreta o acúmulo de $O_2^{\cdot-}$ induzindo o aumento da peroxidação lipídica (NUHU; BHANDARI, 2018).

Outro biomarcador que merece ser destacado é o óxido nítrico (NO). Este é um gás que possui várias funções fisiológicas, como transmissão neural, vasodilatação, imunomodulação, contração miocítica, inibição da agregação plaquetária e regulação da transcrição de genes. O NO pode ser convertido em nitrito e nitrato e reagir com $O_2^{\cdot-}$ para formar peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). Nos rins, o NO desempenha papel em alguns mecanismos importantes, como regulação da hemodinâmica glomerular e medular, *feedback* tubuloglomerular e liberação de renina (REZAEI; MOHHAMADI, 2018). Algumas condições que podem ocorrer no sistema renal como consequência do aumento do NO incluem glomerulonefrite, insuficiência renal pós-isquêmica, nefropatia obstrutiva e rejeição de transplante renal. Por outro lado, a diminuição da produção fisiológica de NO em pacientes com DRC pode levar à retenção de sais e hipertensão. (REZAEI; MOHHAMADI, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar biomarcadores sanguíneos de EO/EN em pacientes com DRC nos estágios pré-dialíticos (3a, 3b e 4) e em hemodiálise baseado no estadiamento do *Kidney Disease: Improving Global Outcomes- CKD Evaluation and Management* (KDIGO, 2021).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar os biomarcadores antioxidantes: grupamentos sulfidrila (SH) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), sistema glutatona e paraoxonase 1 (PON 1).

Dosear os biomarcadores pró-oxidantes: subprodutos de óxido nítrico (NOx), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e produtos avançados de oxidação proteica (AOPP).

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAGEM

Trata-se de um estudo controlado, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina - CAAE 67228117.1.0000.5231 - com uma amostra de 114 pacientes com DRC atendidos no ambulatório de nefrologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) e 23 indivíduos que não possuem a doença, controles saudáveis recrutados por conveniência. Os pacientes recrutados, foram alocados em quatro grupos, de acordo com a classificação de suas TFG (3a, 3b, 4 e HD) e comparados entre si e a um grupo controle. Foi utilizado o cálculo de MDRD para estimar a TFG dos pacientes e do grupo controle. Os indivíduos com DRC e o grupo controle foram pareados de acordo com a idade, gênero e etnia.

Os critérios de inclusão foram pacientes com DRC pré-diálise (3a, 3b e 4) de ambos os sexos, idade > 18 anos em plena condição cognitiva, sem apresentar comorbidades que impediriam a participação neste estudo e que apresentaram TFG de acordo com as descritas acima. Foram excluídos do estudo pacientes que apresentavam quadro de infecção viral crônica, doença autoimune ou malignidade, tratamento com antioxidantes ou anti-inflamatórios.

Os critérios de inclusão para o grupo HD foram pacientes de ambos os sexos, idade > 18 anos em plena condição cognitiva, e realizando HD por mais de 3 meses. Para este grupo os critérios de exclusão foram pacientes que estavam realizando HD por meio de cateteres temporários, portadores de infecção ativa, história de infecção que tivessem motivado internação hospitalar nos últimos 30 dias, portadores de neoplasias ativas, portadores de Hepatites B ou C, portadores do vírus HIV e hepatopatias crônicas. Para o grupo controle os critérios de inclusão foram indivíduos de ambos os sexos, idade > 18 anos, em plena condição cognitiva, sem apresentar doença renal, quadro de infecção viral crônica, doença autoimune ou malignidade e ausência de tratamento com antioxidantes ou anti-inflamatórios.

Foi utilizado um formulário para obtenção dos dados demográficos e antropométricos. Foram coletados 20mL de sangue por punção venosa, de todos os voluntários para análise dos biomarcadores de EO/EN SOD, CAT, GPx, SH, NOx, CL-LOOH, AOPP e PON-1.

4.2 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO

4.2.1 Determinação da Superóxido Dismutase (SOD)

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

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

4.2.2 Determinação da Catalase (CAT)

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

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

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

4.2.4 Determinação de Grupamento Sulfidril (SH)

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

4.2.5 Determinação da Atividade da Paraoxonase-1 (PON-1)

A atividade total PON1 foram realizados pela metodologia descrita por Richter, Jarvink e Furlong (2008). A leitura da reação foi feita em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 280 nm para a determinação da atividade CMPase e 270 nm para atividade AREase em alta concentração de sal e sem adição de sal. Durante 4 minutos (16 leituras com intervalo de 15

segundos entre as leituras) com a temperatura mantida a 25°. A atividade total da PON 1 foi expressa em U/mL.

4.2.6 Determinação de Hidroperóxidos por Quimiluminescência (CL-LOOH)

A avaliação da formação de hidroperóxidos por quimiluminescência foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Flecha, Llesuy e Boveris (1991) e Panis *et al.* (2012). A quimiluminescência estimulada por t-butil foi empregada para analisar os níveis de hidroperóxidos presentes no soro. Este teste baseia-se no consumo das defesas antioxidantes e a formação de hidroperóxidos resultando em um aumento da emissão de fótons, ou seja, em um aumento de quimiluminescência que está relacionado com o estresse oxidativo. Este experimento foi realizado em luminômetro Glomax (TD 20/20). Todo o experimento foi realizado ao abrigo da luz para evitar a fosforescência, a 30°C, durante 60 minutos. Os resultados foram expressos em unidades relativas de luz (URL). Os resultados quantitativos foram obtidos após a integração da área sobre a curva utilizando o OriginLab 9.0 software.

4.2.7 Metabólitos do Óxido Nítrico (NOx)

A determinação da concentração de subprodutos do NOx foi realizada pela técnica descrita por Navarro-Gonzalvez *et al.* (1998). O método de detecção baseia-se na redução de nitrato a nitrito, mediada por reações de óxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess. A quantificação de NOx foi feita em leitora de microplacas Asys Expert Plus, Biochrom® (Holliston, MA, EUA), sendo as leituras feitas em 540 nm. A concentração de óxido nítrico foi expressa em µM.

4.2.8 Determinação de Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas (AOPP)

Para a quantificação de AOPP no plasma utilizou-se o método descrito por Hanasand *et al.* (2012). Esse teste foi usado para medir a oxidação protéica. A leitura da reação da AOPP foi realizada em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 340 nm. A concentração de AOPP foi expressa em µmoles/L de equivalente de cloramina T.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi feita pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, para avaliação da distribuição dos dados e homogeneidade, respectivamente. Caso a distribuição esteja normal, foram realizados testes paramétricos como ANOVA e complementados pelo

teste de Tukey. Caso contrário, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. As associações entre dois sistemas categóricos foram verificadas por meio de análises de tabelas de contingência (testes de qui-quadrado). Os resultados da curva de característica de operação do receptor (ROC) pela diferença na área de otimização sob a curva foram usados para descrever e comparar a precisão do diagnóstico. Os dados foram considerados como significativos quando $p < 0,05$ e todos os testes foram feitos utilizando o software SPSS Statistic® 20 (IBM, Armonk, NY, EUA).

5 RESULTADOS

AOPP as a potential biomarker to monitoring progression of chronic renal kidney disease in pre-dialysis and hemodialysis

Laura de Oliveira Semeão¹; Ana Paula Michelin¹; Andressa Keiko Matsumoto¹; João Victor de Lima Pedrão²; Guilherme Martins Porto²; Fábio Roston¹; Vinícius Álvares Daher Delfino¹; Décio Sabbatini Barbosa¹

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

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

Name: Laura de Oliveira Semeão

Mailing address: Avenida Robert Koch, 60.

Telephone number: +55 (43) 33712451

e-mail address: lsemeao@gmail.com

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by a progressive loss of renal function for more than 3 months accompanied by structural damage and inflammation. Oxidative and nitrosive stress (OS/NS) is associated with disease progression. Objectives: To evaluate the biochemical parameters and the involvement of OS/NS in the progression of the CKD in pre-dialic and hemodialysis steps. Main methods: a study controlled with a sample of 114 patients with CKD allocated into four groups, according to the classification of their estimated glomerular filtration ratio (eGFR) (3a, 3b, 4 and HD) and compared to each other and to a healthy group (n = 23). Analyzers of the OS/NS (SOD, CAT, PON, GT, GSH, GSSG, NOX, LOOH, SH and AOPP) were held. The results were considered significant when $p < 0.05$. Main results: The most relevant result in this study was related to the glutathione system and AOPP levels, which have been increased according to the disease progression between stages as well as when compared to control. Comparing stages 3a, 3b, 4 and HD CKD with control, a significant increase was observed in SOD, GT, GSSG, NOx and AOPP. Comparing the same stages of CKD with control, observed lower level of PON and SH OS/NS biomarkers. Conclusion: Because of the data presented, the idea of using GSSG, GSH and PON1 levels as auxiliaries in monitoring the condition of patients with CKD and AOPP as a potential biomarker to assist in monitoring the progression of CKD in pre-dialysis patients (3-4) and dialysis is defended.

Keywords: Chronic kidney disease; oxidative stress.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is a pathology characterized by the loss of structures or renal function in a period equal to or greater than three months, due to the patient's health. Cysts, tumors, malformations and atrophy can affect renal structures, while function can be impaired by comorbidities. Renal fibrosis is the most common clinical manifestation in CKD [1].

Progressive loss of renal function is assessed by estimating the glomerular filtration rate (GFR) and quantifying proteinuria. This loss of renal function is associated with an increased risk of cardiovascular disease (CVD) and chronic renal failure, which can lead to end-stage renal disease with the need for renal replacement therapies such as hemodialysis (HD) or even transplantation [1, 3].

CKD is associated with an increase in reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) and insufficient antioxidant defenses, starting in the early stages of the disease and contributing to its progression [2].

HD is the treatment for these patients that have been successful in prolonging the life of patients with kidney changes, such as changes in urine; glomerular hematuria, or histopathological changes seen on renal biopsies; glomerular changes with or without interstitial tubule involvement, and it is effective in the correction of metabolic abnormalities related to oxidative and nitrosative stress (OS/NS) [4].

The Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) and Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines classify CKD into stages 1 to 5 based on the extent of kidney damage or decrease in GFR. These guidelines indicate that, regardless of etiology, once the reduction and/or loss of nephron function reaches a certain threshold it results in a decline in GFR. As a GFR by itself does not manifest any clinical symptoms until stage 4 to 5, it is important to evaluate both a GFR and albuminuria to improve the accuracy of the prognosis of progression of CKD [5].

The mechanism behind OS/NS in patients with CKD is complex, multifactorial, and not yet fully elucidated. Factors such as reduced levels of antioxidants, increased generation of ROS/RNS, and the presence of uremic toxins in the CKD predispose patients to possible oxidative damage. In addition, OS/NS-derived products oxidize low-density lipoproteins and form lipid radicals, activate immune cells, including monocytes and macrophages, inducing inflammation and the release of more free radicals, which are highly reactive species because they have a free electron in its valence shell [6].

This study aimed to evaluate the biochemical parameters and evaluate the involvement of OS/NS in this progression could elucidate some aspects of the DRC pathophysiology in the pre-dialysis and HD stage.

Materials and methods

Sampling

This is a controlled study, approved by the Research Ethics Committee of the State University of Londrina - CAAE 67228117.1.0000.5231 - with a sample of 114 patients with CKD treated at the nephrology outpatient clinic of the Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) and 23 individuals who do not have the disease. The recruited patients were divided into four groups, according to their GFR classification (3a, 3b, 4 and HD).

Inclusion criteria were patients with pre-dialysis CKD (3a, 3b and 4) of both sexes, age > 18 years in full cognitive condition, without comorbidities that would prevent participation in this study and who presented GFR as described above. Patients with a chronic viral infection, autoimmune disease or malignancy, treatment with antioxidants or anti-inflammatory drugs were excluded from the study.

Inclusion criteria for the HD group were patients of both sexes, age > 18 years in full cognitive condition, and undergoing HD for more than 3 months. For this group, the exclusion criteria were patients who were undergoing HD through temporary catheters, patients with active infection, history of infection that had motivated hospital admission in the last 30 days, patients with cancer, patients with Hepatitis B or C, patients of the HIV virus and chronic liver diseases. For the control group, the inclusion criteria were individuals of both sexes, age > 18 years, in full cognitive condition, without kidney disease, chronic viral infection, autoimmune disease or malignancy and no treatment with antioxidants or anti-inflammatory drugs.

Was used a form to obtain demographic and anthropometric data. Twenty mL of total blood were collected by venipuncture from all volunteers for analysis of OS/NS biomarkers: SOD, CAT, GPx, SH, NOx, CL-LOOH, AOPP and PON-1.

Systemic analysis of OS/NS biomarkers

Determination of superoxide dismutase (SOD)

This technique is based on the inhibition that this enzyme promotes in the auto-oxidation of pyrogallol in an aqueous solution. The amount of SOD that was able to inhibit 50% of the pyrogallol oxidation was defined as a unit of enzyme activity. The SOD reaction was read on a Perkin Elmer® microplate reader, model EnSpire (Waltham, MA, USA) with a wavelength of 420 nm [7].

Determination of Catalase (CAT)

The analysis of catalase activity was done through the measurement of H₂O₂ decay and oxygen generation. The reading was performed on a Perkin Elmer® microplate reader; model EnSpire (Waltham, MA, USA) at the wavelength of 240 nm [8].

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

The formation of TNB (thionitrobenzoic acid) was monitored spectrophotometrically at 412 nm through the supernatant added in flat-bottom microplates, resulting from the reaction of two reduced glutathione (GSH) molecules and one of dithio-bis-nitrobenzoic acid. In the presence of glutathione reductase and NADPH, the oxidized glutathione (GSSG) resulting from the first reaction (or one already present in the sample) is reconverted into GSH which is reoxidized to GSSG forming more TNB and obtaining the amounts of total glutathione (GT) in the sample. The amount of GSSG was obtained by calculation through the subtraction of $GT - GSH/2$ [9].

Determination of sulfhydryl group (SH)

The method of analysis is based on the reaction of 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) with the sulfhydryl group of proteins. The reaction was read in a Perkin Elmer® microplate reader; model EnSpire (Waltham, MA, USA) with a wavelength of 412 nm. The results were expressed in μM [10].

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

The total activity of PON-1 was determined by the hydrolysis formation of phenylacetate (phenol). The rate of phenylacetate hydrolysis was determined on a Perkin Elmer® microplate reader, model EnSpire (Waltham, MA, USA) at wavelength 270 nm, measured over 4 minutes (16 readings ranging from 15 seconds between readings) with the temperature maintained at 25°. The activity was expressed as U/mL based on the molar extinction coefficient of phenylacetate that is equal to $1.31 \text{ mMol/Lcm}^{-1}$ [11].

Determination of hydroperoxides by chemiluminescence (CL-LOOH)

The evaluation of the formation of hydroperoxides by chemiluminescence is defined to t-butyl-stimulated chemiluminescence was employed to analyze the levels of hydroperoxides present in serum. This test is based on the consumption of antioxidant defenses and the formation of hydroperoxides resulting in an increase in the emission of photons. These analyses were performed in a Glomax luminometer (TD 20/20). The entire experiment was carried out from the light to avoid phosphorescence at 30°C for 60 minutes. The results were expressed in relative units of light (URL) [12].

Nitric Oxide Metabolites (NOx)

The detection method is based on the reduction of nitrate to nitrite, mediated by oxidation-reduction reactions occurring between the nitrate in the sample and the cadmium-

copper system of the reactants, with subsequent diazotization and colorimetric detection of the azocomposite formed by the addition of the reagent of Griess. NO_x quantification was done on a Perkin Elmer® microplate reader; model EnSpire (Waltham, MA, USA) and the readings were made at 540 nm. The NO_x concentration was expressed in µM [13].

Determination of advanced protein oxidation products (AOPP)

The reaction was carried out in an acid medium (citric acid), and in the presence of oxidized proteins in the sample, the reaction with the potassium iodide of the reagents that absorb at 340 nm occurs. The reaction was read on a Perkin Elmer® microplate reader; model EnSpire (Waltham, MA, USA) at wavelength 340 nm. The concentration of AOPP was expressed in µmoles/L of chloramine T-equivalent [14].

Statistical analysis

Data management and statistics were performed with the SPSS Statistic® 20 program (IBM, Armonk, NY, USA). Initially, normal distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test) were checked. If these criteria were reached ($p \geq 0.05$), variables were evaluated by analyses of variance (ANOVA) complemented with the Tukey test or Dunnett T3. Data that did not reach normal distribution and homogeneity of variance criteria were analyzed by the non-parametric test of Kruskal-Wallis complemented with Dunn's test. Associations between two categorical systems were checked using analyses of contingency Tables (Chi-square tests). The receiver operating characteristic (ROC) curve results by the difference in optimizing area under the curve were used to describe and compare the accuracy of diagnostic. Significant results were established at $p < 0.05$.

Results and discussion

Table 1 shows sociodemographic data from our study data. There were no differences in the proportion of sex and age. These results indicate that the study was matched in order to obtain homogeneous data. We found a difference between the prevalence diabetes and hypertension in CKD group when compared to the control group, demonstrating that the control group has no comorbidity.

Table 1. Demographic data pre-dialytic CKD, hemodialysis patients and control group.

	CTL (n=23)	3a (n=23)	3b (n=34)	4 (n=31)	HD (n=26)	F/X²	df	P
Age (years)	66.09±2.03	68.27±2.09	68.62±1.71	69.13±1.58	63.35±0.90	0.814	4	>0.05
Sex. n. (%)								
Male (74)	12 (52%)	13 (56.5%)	20 (58.8%)	16 (51.6%)	13 (50%)	0.443	4	>0.05
Female (63)	11(48%)	10 (43.5%)	14 (41.2%)	15 (48.4%)	13 (50%)			
Diabetic. n.(%)								
No (83)	23 (100%)	10 (43.5%)*	19 (55.9%)*	11 (36.7%)*	20 (74.1%)	29.971	4	0.001
Yes (53)	0 (0%)	13 (56.5%)*	15 (44.1%)*	19 (63.3%)*	6 (25.9%)*			
Hypertensive. n.(%)								
No (38)	23(100%)	2 (8.7%)*	7 (20.6%)*	1 (3.3%)*	9 (33.3%)*	69.093	4	0.001
Yes (95)	0 (0%)	21 (91.3%)*	27 (79.4%)*	30 (96.7%)*	17 (66.7%)*			

Values are shown as mean ± SD. Anova test with Tukey or T3 Dunnet Chi X2 test. *p<0.05 compared CKD group (3a, 3b, 4 and HD) to control group. CTL: Control group, 3a, 3b, 4 and HD: chronic kidney disease stages.

Table 2 shows the significant differences in the oxidative stress variables between control individuals and CKD patients. ANOVA indicated that, compared to the control group to CKD groups we found significantly lower levels, 3a and HD group, controls presented

lower levels of SOD. PON was higher levels in CTL, 3a and 3b groups when compared to the HD group. GT was lower levels in controls, 3a, 3b and 4 groups when compared to HD. GSH was higher levels in 3a, 3b and 4 compared to the controls group and 3a, 3b and 4 were higher levels compared to HD group. HD group had a higher value of GSSH when compared to others groups. NOx, we obtained higher levels from groups 3b, 4 and HD compared to the control group, and a lower level in 3a group compared to HD. SH showed a lower level and significant difference in HD when compared to other groups. Regarding to the AOPP biomarker, we obtained higher levels in groups 3b, 4 and HD when compared to the control group and lower levels when compared 3a with 4 and HD groups. Catalase and LOOH did not have a significant difference between groups.

Table 2. Oxidative stress biomarkers data pre-dialytic CKD and hemodialysis patients.

	CTL (n=23) ^a	3a (n=23) ^b	3b (n=34) ^c	4 (n=31) ^d	HD (n=26) ^e	F/X ²	df	P
SOD (USOD/gHb/min)	39.39±3.31 ^{b, c, d, e}	59.99±3.12 ^{a, e}	65.36±3.07 ^a	64.98±3.65 ^a	77.21±3.30 ^{a, b}	14.66	4	<0.05
CAT (abs/min/gHb)	53.84±3.61	59.06±2.57	58.46±2.84	58.73±2.88	50.69±1.56	1.742	4	0.145
PON 1(U/mL)	191.59±10.21 ^e	187.05±9.01 ^e	177.89±7.6 ^e	174.56±7.47	147.09±8.02 ^{a, b, c}	4.467	4	<0.05
GT (mM/gHb)	5.86±0.67 ^e	6.88±0.31 ^e	6.50±0.21 ^e	6.77±0.19 ^e	8.20±0.25 ^{a, b, c, d}	6.672	4	<0.05
GSH (mM/gHb)	4.46±0.17 ^{b, c, d}	5.48±0.18 ^{a, e}	5.27±0.175 ^{a, e}	5.57±0.159 ^{a, e}	4.47±0.10 ^{b, c, d}	8.544	4	<0.05
GSSG (mM/gHb) ^φ	0.53(0.23-12.21) ^e	0.59(0.20-1.23) ^e	0.62(0.12-1.21) ^e	0.58(0.17-1.06) ^e	4.47(3.20-5.61) ^{a, b, c, d}	60.441	4	<0.05
NO (μmol/L)	5.85±0.33 ^{c, d, e}	9.60±1.03 ^e	11.94±1.05 ^a	10.65±0.76 ^a	13.90±1.11 ^{a, b}	3.044	4	<0.05
LOOH (URL)	1.60x10 ⁶ ±1.33x10 ⁴	1.49x10 ⁶ ±9.88x10 ⁴	1.60x10 ⁶ ±1.21x10 ⁵	1.54x10 ⁶ ±1.64x10 ⁵	1.59x10 ⁶ ±1.34x10 ⁴	0.137	4	0.969
SH (μM)	329.75±12.97 ^e	349.08±6.27 ^e	340.72±8.53 ^e	325.41±8.97 ^e	244.91±11.00 ^{a, b, c, d}	25.413	4	<0.05
AOPP (μmol/L/eq chloramin T) ^φ	62.02 (37.24-110.79) ^{c, d, e}	85.12 (63.09-147.71) ^{d, e}	88.39 (57.67-277.01) ^{a, e}	127.66 (64.90-366.96) ^{a, b}	152.55 (68.53-239.58) ^{a, b, c}	14.888	4	<0.05

Parametric data were analyzed with ANOVA complemented with Tukey or T3 Dunnet and are expressed as means ± standard error. Non-parametric data were analyzed by Kruskal-Wallis complemented with Dunn's test and are expressed as Median (minimum-maximum values). ^a different from CTL; ^b different from 3a; ^c different from 3b; ^d different from 4 and ^e different from HD; ^φ These variables were processed in Ln transformation. CTL: control; 3a, 3b, 4 and HD: chronic kidney disease stages; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; PON: paraoxonase; GT: total glutathione; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; NOx: nitric oxide metabolites; LOOH: lipid hydroperoxides; SH: sulfhydryl groups; AOPP: advanced protein oxidation products. URL: unity relative of light.

Table 3 shows that CKD patients have a chance of 2.16 times to have an increase in catalase ($p = 0.037$), GSSG ($p = 0.001$) with a chance of 10.70 times and AOPP ($p = 0.009$) with a chance of 2.93 times. The biomarker PON-1 ($p = 0.030$) shows 0.57 times the chances of reduction in this study.

Table 3. Results of odds ratio analysis based on pre-dialytic CKD (3a to 4 stages) and hemodialysis patients as dependent variable and the oxidative stress biomarkers as explanatory variables.

Parameters	B	df	P	Odds Ratio	CI 95%
SOD (USOD/gHb/min)	0.64	3	0.072	1.89	0.94-3.81
CAT (abs/min/gHb)	0.77	3	0.037	2.16	1.04-4.47
PON 1(U/mL)	-0.56	3	0.030	0.57	0.34-0.94
GT (mM/gHb)	0.51	3	0.133	1.67	0.85-3.30
GSH (mM/gHb)	-2.51	3	0.454	0.77	0.40-1.50
GSSG (mM/gHb)	2.37	3	0.001	10.70	3.94-29.08
NOx (μ M)	0.18	3	0.579	1.20	0.63-2.28
LOOH (URL)	0.03	3	0.920	0.96	0.51-1.84
SH (μ M)	-0.61	3	0.093	0.54	0.26-1.10
AOPP (μ mol/L/eq chloramin T)	1.07	3	0.009	2.93	1.30-6.60

SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; PON: paraoxonase; GT: total glutathione; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; NOx: nitric oxide metabolites; LOOH: lipid hydroperoxides; SH: sulfhydryl groups; AOPP: advanced protein oxidation products. URL: unity relative of light.

In the data from the ROC curve (Table 4), it can be observed that the biomarkers of OS that presented the best performance in the early stages like 3a and 3b of CKD were SH, with its AUC being 0.669 [confidence interval (CI) 95% 0.560-0.779; $p = 0.023$] in G3a, G3b an AUC of 0.655 [CI 95% 0.541-0.779; $p = 0.015$] and HD an AUC of 0.850 [CI 95% 0.740-0.960; $p < 0.000$]; to PON1 with an AUC of 0.668 in G3a [95% CI 0.531-0.806; $p = 0.017$]. In the final stages of the disease, the antioxidant with the highest performance was GSH with AUC of 0.725 in G4 [CI 95% 0.620-0.831; $p = 0.001$]. The other variables did not show significant values or relevant AUC.

Table 4. Results of Receiver Operating Characteristic (ROC) score based on pre-dialytic CKD (3a to 4 stages) and hemodialysis patients as dependent variable and the antioxidant biomarkers as explanatory variables.

Exploratory Variables	Groups	AUC	P	CI 95%
SOD (USOD/gHb/min)	3a	0.433±0.06	0.372	0.303-0.564
	3b	0.543±0.06	0.501	0.420-0.665
	4	0.535±0.07	0.621	0.392-0.665
	HD	0.067±0.04	0.675	0.000-0.149
CAT (abs/min/gHb)	3a	0.478±0.07	0.769	0.341-0.615
	3b	0.401±0.06	0.119	0.279-0.523
	4	0.533±0.07	0.641	0.394-0.673
	HD	0.510±0.09	0.912	0.334-0.685
SH (µM)	3a	0.669±0.05	0.023	0.560-0.779
	3b	0.655±0.05	0.015	0.541-0.779
	4	0.536±0.06	0.615	0.400-0.671
	HD	0.850±0.05	0.000	0.740-0.960
PON 1 (U/mL)	3a	0.668±0.07	0.017	0.531-0.806
	3b	0.538±0.06	0.547	0.415-0.661
	4	0.432±0.07	0.344	0.293-0.570
	HD	0.731±0.07	0.008	0.584-0.878
GSH (mM/gHb)	3a	0.570±0.07	0.347	0.434-0.707
	3b	0.508±0.06	0.896	0.380-0.636
	4	0.725±0.05	0.001	0.620-0.831
	HD	0.400±0.08	0.249	0.230-0.570

Results expressed in area under the curve \pm SEM. SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; PON: paraoxonase; GSH: reduced glutathione; SH: sulfhydryl groups. AUC: area under the curve.

In the graph of the ROC curve (Graph1), based on the analysis of data from all patients with CKD (pre-dialysis), it can be observed that the biomarkers of EO with the best pre-dialytic CKD (A) performance were SH (AUC = 0.633) and at PON 1 (AUC=0.583). In the graph of the ROC curve (Graph1), based on the analysis of data from all patients with CKD (hemodialysis), it can be observed that the biomarkers of EO with the best dialytic CKD (B) performance were SH (AUC = 0.744) and at PON 1 (AUC=0.633).

Graph 1. Results of Receiver Operating Characteristic (ROC) score based on pre-dialytic CKD (A) and hemodialysis patients (B) as dependent variable and the antioxidant biomarkers as explanatory variables.

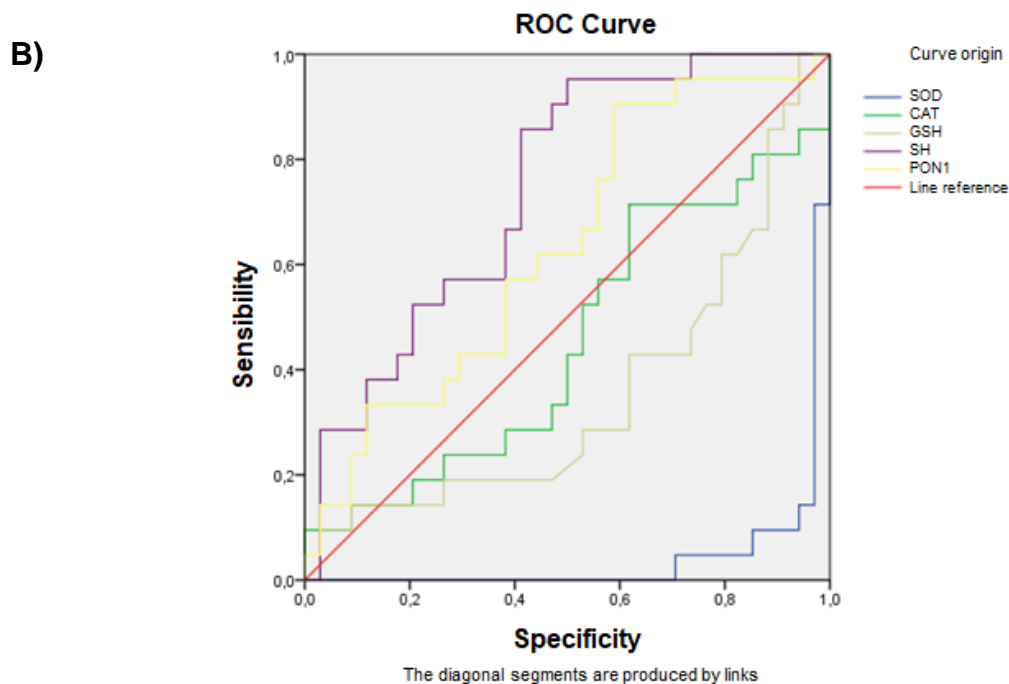
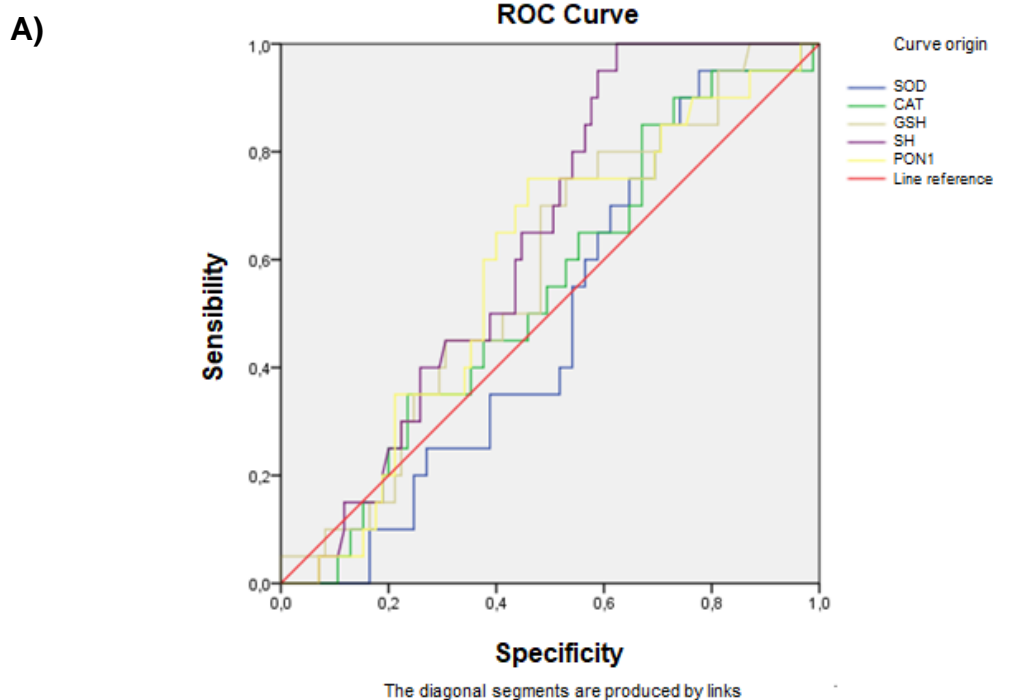


Table 5. Results of Receiver Operating Characteristic (ROC) score based on pre-dialytic CKD (A) and hemodialysis patients (B) as dependent variable and the antioxidant biomarkers as explanatory variables.

A)

Variable (s)	AUC	P	CI 95%
SOD	.485	.832	0.363-0.606
CAT	.541	.573	0.411-0.671
GSH	.580	.269	0.452-0.707
SH	.633	.066	0.523-0.742
PON1	.583	.248	0.454-0.713

B)

Variable (s)	AUC	P	CI 95%
SOD	.041	.000	0.000-0.091
CAT	.452	.556	0.291-0.614
GSH	.356	.074	0.199-0.512
SH	.744	.003	0.614-0.873
PON1	.633	.100	0.483-0.783

In contrast, the highest performing pro-oxidant biomarker at the stage G4 of CKD was AOPP with its AUC of 0.703 [95% CI 0.569-0.838; $p = 0.005$]. In HD patients, the biomarkers were the GSSG with an AUC of 0.996 [CI 95% 0.988-1,000; $p = 0.001$]; NOx with AUC of 0.653 [CI 95% 0.504-0.803; $p = 0.040$] and AOPP with its AUC of 0.720 [CI 95% 0.603-0.836; $p = 0.003$]. The other variables did not show significant values or relevant AUC.

Table 6. Results of Receiver Operating Characteristic (ROC) score based on pre-dialysis CKD (3a to 4 stages) and hemodialysis patients as the dependent variable and the oxidative biomarkers as explanatory variables.

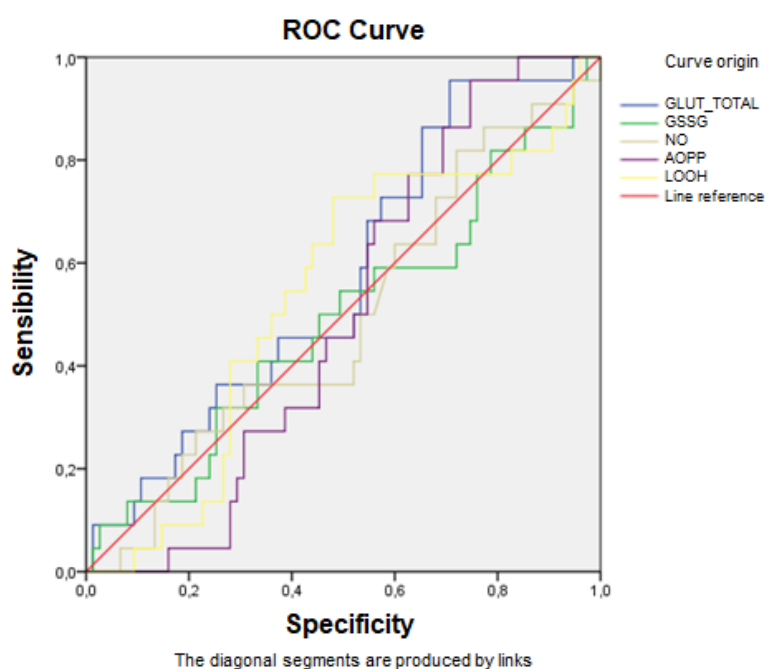
Exploratory Variables	Group	AUC	P	CI 95%
GT mM/gHb	3a	0.392±0.07	0.149	0.250-0.534
	3b	0.378±0.06	0.056	0.257-0.500
	4	0.520±0.06	0.780	0.393-0.647
	HD	0.475±0.06	0.001	0.629-0.879
GSSG (mM/gHb)	3a	0.337±0.06	0.021	0.220-0.445
	3b	0.366±0.05	0.046	0.263-0.485
	4	0.367±0.07	0.061	0.250-0.484
	HD	0.996±0.00	0.001	0.988-1.000
NO (µM)	3a	0.382±0.07	0.115	0.243-0.521
	3b	0.507±0.06	0.909	0.381-0.634
	4	0.459±0.06	0.564	0.328-0.590
	HD	0.653±0.07	0.040	0.504-0.803
LOOH (URL)	3a	0.526±0.07	0.725	0.384-0.669
	3b	0.531±0.06	0.629	0.404-0.657
	4	0.469±0.06	0.667	0.334-0.604
	HD	0.465±0.07	0.640	0.310-0.620
AOPP (µM)	3a	0.334±0.05	0.018	0.222-0.445
	3b	0.370±0.06	0.039	0.250-0.490
	4	0.703±0.06	0.005	0.569-0.838
	HD	0.720±0.06	0.003	0.603-0.836

Results expressed in area under the curve \pm SEM. GT: total glutathione; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; NOx: nitric oxide metabolites; LOOH: lipid hydroperoxides; AOPP: advanced protein oxidation products. URL: unity relative of light. AUC: area under the curve.

In the ROC curve graph (Graph 2) based on the analysis of data on pro-oxidant biomarkers from all patients with CKD (pre-dialysis) it can be observed that the OS biomarker presented pre-dialysis (A) performance was GLUT_TOTAL (AUC = 0.573) and LOOH (AUC= 0.538). From all patients with CKD (hemodialysis) it can be observed that the EO biomarker presented the best dialytic CKD (B) performance was GLUT_TOTAL (AUC = 0.923), GSSG (AUC = 0.905) and AOPP (AUC = 0.900).

Graph 2. Results of Receiver Operating Characteristic (ROC) score based on pre-dialytic CKD (A) and hemodialysis patients (B) as dependent variable and the pro-oxidant biomarkers as explanatory variables.

A)



B)

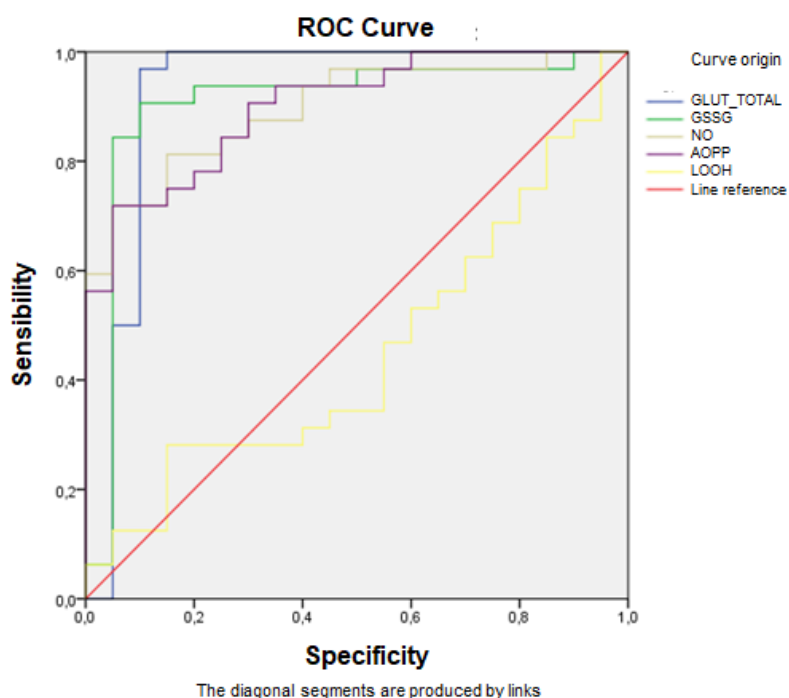


Table 7. Results of Receiver Operating Characteristic (ROC) score based on pre-dialytic CKD (A) and hemodialysis patients (B) as dependent variable and the pro-oxidant biomarkers as explanatory variables.

A)

Variable (s)	AUC	P	CI 95%
GLUT_TOTAL	.573	.297	0.445-0.702
GSSG	.492	.904	0.349-0.634
NO	.492	.904	0.356-0.627
AOPP	.496	.959	0.381-0.612
LOOH	.538	.587	0.404-0.673

B)

Variable (s)	AUC	p	CI 95%
GLUT_TOTAL	.923	.000	0.818-1.000
GSSG	.905	.000	0.800-1.000
NO	.897	.000	0.814-0.980
AOPP	.900	.000	0.820-0.980
LOOH	.453	.573	0.292-0.614

The main finding of this study were regarding the AOPP and system glutathione. Are an important biomarkers of OS/NS in CKD, and it is significantly increased along with the progression of the disease to stages 3a, 3b, 4 and HD when compared to each other and the CTL group. Increased plasma AOPP is a marker of oxidant-induced protein damage and has been reported in patients with diabetes, CKD, act as a pathogenic mediators of many disorders. In addition, AOPP, GSSG, GT and NO_x showed expressive results as a biomarker of OS/NS related to specificity and sensitivity, especially in more advanced stages of the disease. OS/NS irreversibly modifies proteins and the increase of AOPP in the plasma of patients with CKD indicates the effects of this phenomenon highlighting the importance of protein oxidation during the development of CKD [15,16].

The increase in AOPP levels can be explained by the fact that the cumulative iron load used for the treatment of anemia, being a common finding in HD patients, can be a resource of ROS/RNS. Furthermore, the elevated concentration of AOPP can also be affected by high levels of uremic toxins and disturbances in the regulation of calcium phosphate homeostasis [17]. In the study by Gryszczynska et al. (2017), it was found that in CKD both in the non-dialysis stages and in the dialysis stages of the disease there is an

increase in the formation of AOPP [16]. AOPP levels correlate with the severity and progression of CKD, and in HD patients, they have the highest concentrations [18].

GSH is a tripeptide molecule found in normal cells *in vivo* that has antioxidant properties such as scavenging oxygen ions and other reactive species. This fact can be explained because in the intermediate stages of the disease, the body can increase the production of antioxidant substances to fight OS/NS. The study by Bober et al. (2010) demonstrated increased GSH levels in stage 4 of CKD when compared to the CTL group, corroborating our study, where stage 4 is significantly increased when compared to the CTL and HD groups.

GSH levels in patients with stage 5 CKD were significantly lower compared to CTL. In our study, we can observe that there is no significant difference in the HD and CTL groups, but we observed an increase in molecules in groups 3a, 3b and 4 [19].

In the study by Levin et al., (2018) they found significantly higher total glutathione activity in patients with moderate renal failure (G3) compared to individuals in the control group. In our study, there was no significant difference between these groups. Derouiche et al., (2020) found significantly lower levels when compared to HD patients in the control group.

In the study by Fayed et al., (2016) patients with HD had a significant reduction in pre-HD GSH levels compared to controllers with a greater reduction in post-HD levels compared to pre-HD. Reduction in the glutathione level in HD patients can occur as a result of the inhibition of glutathione production, an increase in erythrocyte hemolysis and glutathione exposure as GSSG and loss of antioxidant enzymes through the dialyzer, or by the body's consumption to contain the OS/NS.

SOD is a defense enzyme against oxidants species, responsible for converting the superoxide anion into oxygen and hydrogen peroxide. In this study, it increased when compared to the control. However, Sahni, Gupta and Bhalla (2012) reported that SOD levels significantly decreased in patients with CKD stages 3b to 5 when compared to controls.

In the studies by Razool et al. (2017) they found a decrease in serum SOD levels in patients with stage 5 CKD compared to the control group. In our study, a significant increase was observed in all CKD groups when compared to the CTL group, and also significant increase to HD group when compared to 3a and CTL group, which can be explained by the increase in ROS/RNS and the system tries to compensate, increasing antioxidant activities.

Furthermore, Sahni et al., (2012) observed a decreased in the enzyme activity of SOD in severe and moderate CKD groups and we cannot observed in our study [20]. The difference in these results can be explained because the study mentioned used different stages in the same group to perform the analyses. The same situation can be seen in the

study by Xu et al., (2015) and Chen et al., (2016) where SOD also presented decreased levels in 6 patients in the pre-dialysis stages [21].

PON-1 is an enzyme that can be the ability to hydrolyze organophosphate compounds and has peroxidase activity. It is found in plasma HDL, can protect LDL from oxidation, and therefore has antioxidant activity. In our study, it was not possible to observe a significant difference in the levels of PON-1 in stages 3a, 3b and 4 of CKD compared to control subjects [22]. Corroborating these results, Samouilidou et al. (2018) also do not report significant differences in PON-1 levels when comparing control subjects with patients with pre-dialysis CKD from 1 to 5. In our study, the PON biomarker can observe a significant difference decreased in the HD Group when compared to 3a, 3b and control group.

Regarding NOx, Bahadoran et al., (2016) also found increased levels in patients with CKD (eGFR <60mL/min/1.73m²) when compared to controls. Furthermore, they demonstrated a direct association between serum NOx and CKD. The progression from intermediate levels of CKD to more advanced stages is related to the increase in OS/NS in these patients [24]. In our study the biomarker NOx had a significant increase in 3a with HD 3b and 4 with control and control group and HD.

In the study by Capusa et al., (2012), found decreased SH values in patients with CKD on HD when compared to CTL, which is in line with our study, which also obtained decreased values in the HD group when compared to the CTL group and to the pre-dialysis groups (3a, 3b and 4).

In the ROC curve data, it can be observed that the antioxidants with the best performance in the early stages of CKD were SH (AUC=0.669 [G3a]; AUC=0.665 [G3b]; AUC=0.850 [HD]). PON1 with AUC of 0.668 in G3a. The antioxidant GSH, on the other hand, performs better in the final stage (G4) of CKD, and its AUC is 0.725. In contrast, the pro-oxidant biomarker with the highest performance in stage 4 and HD group of CKD was AOPP with an AUC of 0.703 and 0.720 respectively.

The AOPP also presented an important result in the ROC analysis, emphasizing the relationship of the test performed with the CKD. AOPP is considered a good marker for OS/NS due to its role in the pathophysiology of CKD and the complications that the increase in these products can cause, being an independent risk factor for cardiovascular events [17].

Derouiche et al., (2020) was not found sensitivity and specificity in the GSH biomarker in HD patients at ROC analysis, differently in the present study, we observe sensitivity and specificity in the total glutathione biomarkers, probably due to the significant increase in GSSG in HD patients.

Final considerations

According to the results, it was possible to conclude that the CKD has a high impact on biochemical and OS/NS changes compared to people who are not sick and that these changes imply the worsening of the disease. The present work shows the occurrence of an increase in the levels of ROS/RNS species in pre-dialtical and HD patients, as follows the progression of the CKD, accompanying the stages according to eGFR. Because of the data presented, the idea of using GSSG, GSH and PON1 levels as auxiliaries in monitoring the condition of patients with CKD and AOPP as a potential biomarker to assist in monitoring the progression of CKD in pre-dialysis patients (3-4) and dialysis is defended.

Conclusion

According to the results, the idea of using GSSG, GSH and PON1 levels as auxiliaries in monitoring the condition of patients with CKD and AOPP as a potential biomarker to assist in monitoring the progression of CKD.

Conflict of interests

There are no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgments

L.O.S. acknowledges a Master's degree scholarship and, A.P.M. and A.K.M. acknowledge the Ph.D. scholarship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil, finance code 001).

References

- [1] KRATA, N. et al. Oxidative Stress in Kidney Diseases: The Cause or the Consequence? **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. v.66, p.211-220, 2018.
- [2] LEVIN, A. et al. Serum glutaredoxin activity as a marker of oxidative stress in chronic kidney disease: A pilot study. **Nephron**, v. 140, n. 4, p. 249–256, 2018.
- [3] RAVAROTTO, V. et al. Oxidative stress – chronic kidney disease – cardiovascular disease: A vicious circle. **Life Sciences**. v.210, p. 125-131, 2018.
- [4] REZAEI, F.; MOHHAMADI, R. Comparison of Saliva Nitric Oxide between Chronic Kidney Disease Before and After Dialysis and with Control Group. **The Open Dentistry Journal**, v. 12, n. 1, p. 213–218, 2018.
- [5] CHELLUBOINA, B., VEMUGANTI, R. Chronic kidney disease in the pathogenesis of acute ischemic stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v.39, p1893-1905, 2019.

- [6] NUHU, F; BHANDARI, S. Oxidative Stress and Cardiovascular Complications in Chronic Kidney Disease, the Impact of Anaemia. **Pharmaceuticals**. v.11, p.1-15, 2018.
- [7] MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.
- [8] AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- [9] TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, p. 502–522, 1969.
- [10] HU, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN and Simon MI (eds). **Methods in Enzymology**. California: Academic Press, p.380-382, 1994.
- [11] RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Methods in Genetics and Clinical Interpretation. Determination of Paraoxonase 1 Status Without the Use of Toxic Organophosphate Substrates. **Journal of the American Heart Association**, p. 2–7, 2008.
- [12] FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence: An Assay For Oxidative Stress In Biopsies Of Heart, Liver, And Muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, p. 93–100, 1991.
- [13] NAVARRO-GONZÁLEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids. **Clinical Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 679–681, 1998.
- [14] HANASAND, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 9–10, p. 901–906, 2012.
- [15] DENG, Q. et al. Huang Gan Formula Eliminates the Oxidative Stress Effects of Advanced Oxidation Protein Products on the Divergent Regulation of the Expression of AGEs Receptors via the JAK2/STAT3 Pathway. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- [16] GRYSZCZYNSKA, B. et al. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- [17] DZIEDZIC, M. et al. Levels of renalase and advanced oxidation protein products with regard to catecholamines in haemodialysed patients. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 24, n. 3, p. 453–458, 2017.
- [18] VINERANU, I. V. et al. The Relationship between Advanced Oxidation Protein Products, Vascular Calcifications and Arterial Stiffness in Predialysis Chronic Kidney Disease Patients. **Medicina**. v57, p452, 2021.

- [19] RASOOL, M. et al. Comparative study of extrapolative factors linked with oxidative injury and anti-inflammatory status in chronic kidney disease patients experiencing cardiovascular distress. **PLoS ONE**, p. 1–13, 2017.
- [20] SAHNI, N.; GUPTA, K. L.; BHALLA, A. K. Intake of Antioxidants and their Status in Chronic Kidney Disease Patients. **Journal of Renal Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 389–399, 2012.
- [21] CHEN, C. et al. High homocysteine, low vitamin B-6, and increased oxidative stress are independently associated with the risk of chronic kidney disease. **Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 236–241, 2016.
- [22] KENNEDY, D. J. et al. Diminished Antioxidant Activity of High-Density Lipoprotein-Associated Proteins in Chronic Kidney Disease. **Journal of the American Heart Association**, p. 1–7, 2017.
- [23] BAHADORAN, Z. et al. Serum nitric oxide is associated with the risk of chronic kidney disease in women: Tehran lipid and glucose study. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 76, n. 4, p. 304–308, 2016.
- [24] MODARESI, A; NAFAR, M; SAHRAEI, Z. Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 9, p. 165–179, 2015.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, foi possível concluir que defende-se a ideia do uso dos níveis de GSSG, GSH e PON1 como auxiliares no monitoramento do quadro do paciente com DRC e a AOPP como potencial biomarcador no auxílio do acompanhamento da progressão da DRC em pacientes pré-dialíticos (3-4) e dialíticos.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121–126, 1994.
- ALSHAHAWAY, M. et al. Effect of febuxostat on oxidative stress in hemodialysis patients with endothelial dysfunction: a randomized, placebo-controlled, double-blinded study. *International Urology and Nephrology*, v. 51, n. 9, p. 1649–1657, 2019.
- BAHADORAN, Z. et al. Serum nitric oxide is associated with the risk of chronic kidney disease in women: Tehran lipid and glucose study. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 76, n. 4, p. 304–308, 2016.
- BANAEI, S.; REZAGHOLIZADEH, L. The role of hormones in renal disease and ischemia-reperfusion injury. *Iranian journal of basic medical sciences*, v. 22, n. 5, p. 469–476, 2019.
- BATISTA, C. M. M. et al. Perfil epidemiológico dos pacientes em lista de espera para o transplante renal. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 30, n. 3, p. 280–286, 2017.
- BULBUL, M.C. et al. Disorders of lipid metabolism in chronic kidney disease. *Blood Purification*. v.46, p.144-152, 2018.
- CHEN, C. et al. High homocysteine , low vitamin B-6 , and increased oxidative stress are independently associated with the risk of chronic kidney disease. *Nutrition*, v. 32, n. 2, p. 236–241, 2016.
- CIANCIOLO, G. et al. Folic Acid and Homocysteine in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease Progression : Which Comes First ? *Cardio Renal Medicine*, v. 7, p. 255–266, 2017.
- COLOMBO, G. et al. Plasma protein thiolation index (PTI) as a biomarker of thiol-specific oxidative stress in haemodialyzed patients. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 89, p. 443–451, 2015.
- DAENEN, K. et al. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, v. 34, n. 6, p. 975–991, 2019. .
- DENG, Q. et al. Huang Gan Formula Eliminates the Oxidative Stress Effects of Advanced Oxidation Protein Products on the Divergent Regulation of the Expression of AGEs Receptors via the JAK2/STAT3 Pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2017, 2017.
- DUNI, A. et al. Oxidative Stress in the Pathogenesis and Evolution of Chronic Kidney Disease: Untangling Ariadne's Thread. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 15, p. 3711, 2019.
- DZIEDZIC, M. et al. Levels of renalase and advanced oxidation protein products with regard to catecholamines in haemodialysed patients. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 24, n. 3, p. 453–458, 2017.

- FARKHONDEH, T.; SAMARGHANDIAN, S.; ROSHANRAVAN, B. Impact of chrysin on the molecular mechanisms underlying diabetic complications. *Journal of Cellular Physiology*. p. 1-15, 2019.
- FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence: An Assay For Oxidative Stress In Biopsies Of Heart, Liver, And Muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 10, p. 93–100, 1991.
- GRYSZCZYNSKA, B. et al. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. *BioMed Research International*, v. 2017, 2017.
- HANASAND, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chimica Acta*, v. 413, n. 9–10, p. 901–906, 2012.
- HU, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN and Simon MI (eds). *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, p.380-382, 1994.
- KATSIKI, N.; PEREZ-MARTINEZ, P.; MIKHAILIDIS, D. P. Homocysteine and Non-Cardiac Vascular Disease. *Current Pharmaceutical Design*, v. 23, n. 22, p. 3224–3232, 2017.
- KAUR, J.; YOUNG, B. E.; FADEL, P. J. Sympathetic Overactivity in Chronic Kidney Disease: Consequences and Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 8, p. 1–18, 2017.
- KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. v. 100, n. 4, 2021.
- KE, G. et al. Effect of ascorbic acid on mineral and bone disorders in hemodialysis patients: A systematic review and meta-analysis. *Kidney and Blood Pressure Research*, v. 43, n. 5, p. 1459–1471, 2018.
- KENNEDY, D. J. et al. Diminished Antioxidant Activity of High-Density Lipoprotein-Associated Proteins in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Heart Association*, p. 1–7, 2017.
- KRATA, N. et al. Oxidative Stress in Kidney Diseases: The Cause or the Consequence? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. v.66, p.211-220, 2018.
- KUCHTA, A. et al. Plasma levels of pre β 1-HDL are significantly elevated in non-dialyzed patients with advanced stages of chronic kidney disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 5, p. 1–10, 2019.
- LEVIN, A. et al. Serum glutaredoxin activity as a marker of oxidative stress in chronic kidney disease: A pilot study. *Nephron*, v. 140, n. 4, p. 249–256, 2018.
- LIAKOPOULOS, V. et al. Oxidative stress in hemodialysis: Causative mechanisms, clinical implications, and possible therapeutic interventions. *Seminars in Dialysis*, v. 32, n. 1, p. 58–71, 2019.

- LING, X.C.; KUO, K. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Renal Replacement Therapy*. p.1-9, 2018.
- LV, W.; BOOZ, G.W.; FAN, F.; WANG, Y.; ROMAN, R.J. Oxidative stress and renal fibrosis: Recent insights for the development of novel therapeutic strategies. *Frontiers in Physiology*. v.9, p1-11, 2018.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.
- MODARESI, A; NAFAR, M; SAHRAEI, Z. Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, v. 9, p. 165–179, 2015
- NAVARRO-GONZÁLEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids. *Clinical Chemistry*, v. 22, n. 3, p. 679–681, 1998.
- NUHU, F; BHANDARI, S. Oxidative Stress and Cardiovascular Complications in Chronic Kidney Disease, the Impact of Anaemia. *Pharmaceuticals*. v.11, p.1-15, 2018.
- OBARA, M. et al. Elimination of lipid peroxide during hemodialysis. *Nephron - Clinical Practice*, v. 106, n. 4, 2007.
- OGUNLEYE, A. et al. Changes in antioxidant status associated with haemodialysis in chronic kidney disease. *Ghana medical journal*, v. 52, n. 1, p. 29–33, 2018.
- PASTORE, A. et al. Homocysteine, cysteine, folate and vitamin B12 status in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. *Journal of Nephrology*, v. 28, n. 5, p. 571–576, 2015.
- PEREIRA, E. R. S. et al. Prevalence of chronic renal disease in adults attended by the family health strategy. *Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*, v. 38, n. 1, p. 22–30, 2016.
- PEREIRA, E. R. S. et al. Prevalência de doença renal crônica em adultos atendidos health strategy. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 38, n. 1, p. 22–30, 2016.
- PEREIRA, M. B. P. O papel dos antioxidantes no combate ao estresse oxidativo observado no exercício físico de musculação. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 7, n. 40, p. 1–10, 2013.
- PICKERING, R.J. et al. Recent novel approaches to limit oxidative stress and inflammation in diabetic complications. *Clinical and Translational Immunology*. v.7, p. 1-20, 2018.
- PLASTINA, J. C. R. et al. Functional iron deficiency in patients on hemodialysis: prevalence, nutritional assessment, and biomarkers of oxidative stress and inflammation. *Brazilian Journal of Nephrology*, 2019.
- RASOOL, M. et al. Comparative study of extrapolative factors linked with oxidative injury and anti-inflammatory status in chronic kidney disease patients experiencing cardiovascular distress. *PLoS ONE*, p. 1–13, 2017.

- RAVAROTTO, V. et al. Oxidative stress – chronic kidney disease – cardiovascular disease: A vicious circle. *Life Sciences*. v.210, p. 125-131, 2018.
- REZAEI, F.; MOHHAMADI, R. Comparison of Saliva Nitric Oxide between Chronic Kidney Disease Before and After Dialysis and with Control Group. *The Open Dentistry Journal*, v. 12, n. 1, p. 213–218, 2018.
- RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Methods in Genetics and Clinical Interpretation. Determination of Paraoxonase 1 Status Without the Use of Toxic Organophosphate Substrates. *Journal of the American Heart Association*, p. 2–7, 2008.
- ROUMELIOTIS, S. et al. Dietary Antioxidant Supplements and Uric Acid in Chronic Kidney Disease: A Review. *Nutrients*, v. 11, n. 8, p. 1911, 2019.
- SAHNI, N.; GUPTA, K. L.; BHALLA, A. K. Intake of Antioxidants and their Status in Chronic Kidney Disease Patients. *Journal of Renal Nutrition*, v. 22, n. 4, p. 389–399, 2012.
- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, v. 27, p. 502–522, 1969.
- WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, v. 49, p. 1304–1313, 1996.
- WITKO-SARSAT, V.; GAUSSON, V.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney International*, v. 63, n. 84, p. S11–S14, 2003.
- YARIBEYGI, H.; ATKIN, S.L.; SAHEBKAR, A. A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. *Journal of Cellular Physiology*. v.234, p.1300-1312, 2019.