Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Marcos Roberto Colombo Barnese

Efeito da hemodiálise sobre a biodisponibilidade dos ácidos graxos livres em pacientes com insuficiência renal

Rio de Janeiro

2017

Marcos Roberto Colombo Barnese

Efeito da hemodiálise sobre a biodisponibilidade dos ácidos graxos livres em pacientes com insuficiência renal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Younes-Ibrahim

Coorientador: Prof. Dr. Mauro Velho de Castro Faria

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ/REDE SIRIUS/CBA

B261 Barnese, Marcos Roberto Colombo.
Efeito da hemodiálise sobre a biodisponibilidade dos ácidos graxos livres em pacientes com insuficiência renal / Marcos Roberto Colombo Barnese – 2017.
97 f.

Orientador: Maurício Younes-Ibrahim.
Coorientador: Mauro Velho de Castro Faria.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Clínica e Experimental.

1. Ácidos graxos - Teses. 2. Lipídios - Toxicologia - Teses. 3. Hemodiálise – Teses. 4. Insuficiência renal – Teses. 5. Albumina – Teses. 6. Nefrotoxicologia - Teses. I. Younes-Ibrahim, Maurício. II. Faria, Mauro Velho de Castro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.61-78:577.115.3

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Marcos Roberto Colombo Barnese

Efeito da hemodiálise sobre a biodisponibilidade dos ácidos graxos livres em pacientes com insuficiência renal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de dezembro de 2017.

Coorientador: Prof. Dr. Mauro Velho de Castro Faria
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Maurício Younes-Ibrahim (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann
Universidade de São Paulo

_____

Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. Dr. Carlos Perez Gomes
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Marcos Lopes de Miranda
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro
2017

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roberto A. Barnese *in memoriam* e Cristina Cascione Barnese, pela dedicação, carinho e incentivo na minha formação pessoal e intelectual.

Ao professor Maurício Younes Ibrahim, com o seu amplo conhecimento científico, pelo incentivo, ensinamentos e dedicação para elaboração deste estudo.

Ao professor Mauro Velho de Castro Faria pelo incentivo e orientações precisas dentro do laboratório desde o mestrado na qual muito colaborou para realização deste projeto.

Aos professores Patrícia Burth e Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque pela dedicação e orientações dentro do laboratório que muito ajudaram na elaboração desse trabalho

RESUMO

BARNESE, Marcos Roberto Colombo. *Efeito da hemodiálise sobre a biodisponibilidade dos ácidos graxos livres em pacientes com insuficiência renal.* 2017. 97 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Ácidos Graxos não esterificados (AGNE) são transportados no sangue ligados à albumina (AB), o que evita eventos de lipotoxicidade. AGNE circulantes se encontram elevados em doenças como sepse e insuficiência renal, sendo tóxicos para as células, causando apoptose e necrose. Nosso objetivo foi avaliar o efeito da hemodiálise (HD) sobre os níveis séricos de AGNE em dois grupos de pacientes: com insuficiência renal aguda (IRA) por sepse e com insuficiência renal crônica (DRC). Objetivamos também aplicar um teste funcional para a albumina que avalie o grau de saturação da proteína por AGNE. Métodos: Prospectivamente, AB e AGNE foram medidos nas mesmas amostras de soro, coletadas pré e pós-HD, de 20 pacientes de cada grupo. As razões molares AGNE/albumina foram comparadas com aquelas obtidas em voluntários saudáveis (n=15). Valores do total e das frações de AGNE séricos (mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2)) foram determinados por HPLC. Hemodiálise convencional e/ou hemodiálise prolongada foram realizadas com membranas de polissulfona. Pelo método de focalização isoeletrica (IF) determinamos o pH de migração e a densidade da banda proteica. Resultados: As respectivas médias das concentrações de AB nos grupos IRA, DRC e controle foram de 319±113, 442±137 e 647±126 μM. AGNE total com valores aumentados pré-HD nos grupos IRA e DRC, assim como as respectivas AGNE/AB (3,91±0,32 e 2,99±0,27), controle 0,38±0,03. Após HD os AGNE diminuíram cerca de 30% nos dois grupos. AGNE/AB também diminui significativamente para 2,5±0,2 (IRA) e 2,16±0,27 (IRC). Pela IF, o pH variou após HD em ambos os grupos (IRA 5,206±0,03 para 5,347±0,02, IRC 5,266±0,03 para 5,413±0,02) e as densidades das amostras reduziram cerca de 30%. Conclusão: A hemodiálise reduziu a biodisponibilidade sérica de AGNE e contribuiu para restaurar o equilíbrio molar AGNE/AB. A FI mostrou uma boa correlação entre pH e AGNE/AB e pode ser útil para avaliar a saturação de AB nos pacientes críticos. Portanto, a HD é efetiva na depuração dos AGNE séricos, com potencial de prevenção da lipotoxicidade em pacientes com insuficiência renal aguda e crônica.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Lipotoxicidade. Hemodiálise. Insuficiência renal aguda. Insuficiência renal crônica. Albumina.

ABSTRACT

BARNESE, Marcos Roberto Colombo. *Effect of hemodialysis on the bioavailability of free fatty acids in patients with renal failure.* 2017. 97 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Non-esterified fatty acids (NEFAs) are transported in the blood bound to albumin (AB), which avoids events of lipotoxicity. Circulating NEFAs are elevated in diseases such as sepsis and renal failure, being toxic to cells, causing apoptosis and necrosis. Our objective was to evaluate the effect of hemodialysis (HD) on serum levels of NEFAs in two groups of patients: acute renal failure (ARF) due to sepsis and chronic renal failure (CKD). We also intend to apply a functional test for albumin that evaluates the degree of saturation of albumin by NEFAs. Methods: Prospectively, AB and NEFAs were measured in the same serum, collected pre- and post-HD, from 20 patients from each group. The NEFAs/albumin molar ratios were compared to those obtained in healthy volunteers (n = 15). Values of the total and the fractions of serum NEFAs (myristic (C14:0), palmitic (C16:0), stearic (C18:0), palmitoleic (C16:1), oleic (C18:1) and linoleic)) were determined by HPLC. Conventional hemodialysis and/or prolonged hemodialysis were performed with polysulfone membranes. By the isoelectric focusing method (IF) we determined the migration pH and the protein band density. Results: The respective mean AB concentrations in the ARF, CKD and control groups were 319±113, 443±137 and 647±126µM. Total NEFAs with increased pre-HD values in the ARF and CKD groups, as well as the respective NEFAs/AB (3.91±0.32 and 2.99±0.27), control (0.38±0.03). After HD the NEFAs decreases about 30% in both groups. NEFAs/AB also decreased significantly to 2.5±0.2 (ARF) and 2.16±0.27 (CKD). By IF, pH ranged after HD in both groups (ARF 5,206±0,03 for 5,347±0,02, CKD 5,266±0,03 for 5,413±0,02) and sample densities reduced by about 30%. Conclusion: Hemodialysis reduced the serum bioavailability of NEFAs and contributed to restore the NEFAs/AB molar balance. The FI showed a good correlation between pH and NEFAs/AB and may be useful to evaluate AB saturation in critically ill patients. Therefore, HD is effective in the clearance of serum NEFAs, with potential for prevention of lipotoxicity in patients with acute and chronic renal failure.

Keywords: Fatty acids. Lipotoxicity. Hemodialysis. Acute kidney disease. Chronic kidney disease. Albumin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo com os elementos envolvidos no metaboloma..... 18
Figura 2 - Sítios de ligação dos AG na albumina..... 23
Figura 3 - Processo de entrada dos AG na matriz mitocondrial..... 25
Figura 4 - Vias de sinalização do TLR4..... 33
Figura 5 - Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lipotoxicidade 34
Figura 6 - Modelo proposto de toxicidade renal pelo AGNE..... 36
Figura 7 - Esquema representativo de um capilar de hemodiálise..... 39
Figura 8 - Valores de AGNE séricos de acordo com a função renal..... 40
Figura 9 - Esquema representativo da depuração do ácido oleico *in vitro*... 45
Figura 10 - Variações da albumina sérica nos grupos sepse e DRC..... 51
Figura 11 - Redução das frações dos AGNE nos grupos sepse e DRC na hemodiálise..... 52
Figura 12 - Concentrações séricas dos AGNE pré e pós HD no grupo sepse com IRA..... 53
Figura 13 - Concentrações séricas dos AGNE pré e pós HD no grupo DRC 54
Figura 14 - Concentrações séricas dos AGNE nos grupos sepse com IRA, DRC e controle..... 55
Figura 15 - Relações séricas AGNE/albumina pré e pós HD em pacientes com sepse-IRA..... 56
Figura 16 - Relações séricas AGNE/albumina pré e pós HD em pacientes DRC..... 57
Figura 17 - Relações séricas AGNE/albumina pré e pós HD nos pacientes com sepse e IRA, DRC e grupo controle..... 58
Figura 18 - Esquema representativo das curvas dos ácidos graxos na HPLC..... 59
Figura 19 - Avaliação *in vitro* da depuração dos AGNE..... 60

Figura 20 - Correlação entre colesterol e triglicerídeos com as concentrações dos AGNE e a relação molar AGNE/albumina.... 61
Figura 21 - Depuração da ureia e AGNE em pacientes do grupo DRC..... 62
Figura 22 - Relação molar ac. oleico/albumina pré e pós HD nos pacientes sepse com IRA e DRC..... 63
Figura 23 - Gradiente de pH no gel de eletroforese utilizado para a FI da albumina..... 64
Figura 24 - Valores de pH na FI das albuminas do grupo controle e das albuminas deslipidadas..... 65
Figura 25 - Migração da albumina na FI em 2 pacientes dos grupo sepse pré e pós HD e grupo controle 66
Figura 26 - Valores de pH das albuminas na FI do grupo sepse com IRA pré e pós HD..... 67
Figura 27 - Valores de pH das albuminas na FI do grupo DRC pré e pós HD..... 68
Figura 28 - Valores de pH na FI das amostras pré e pós HD nos grupos sepse com IRA, DRC e controle..... 69
Figura 29 - Valores de pH de migração na FI em correlação com os AGNE. 70
Figura 30 - Valores de pH na FI correlacionados com as relações AGNE/albumina..... 71
Figura 31 - Correlações entre médias obtidas por HPLC e das densidades das bandas pela FI nos grupos sepse, DRC e controle..... 72
Figura 32 - Valores de pH em relação a faixas de AGNE/albumina..... 73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Ácidos graxos com cadeia de 14 a 18 carbonos..... 20
Quadro 2 - Rendimento energético pelas principais vias do metabolismo renal..... 27
Quadro 4 - Características dos pacientes do estudo..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácidos graxos
AGNE	Ácidos graxos livres não esterificados
AGNEI	Ácidos graxos não esterificados insaturados
ADP	Difosfato de adenosina
AP1	Proteína ativadora 1
ATP	Trifosfato de adenosina
Brij-35	Polioxietilene laurel
Ca^{++}-ATPase	Adenosina trifosfatase ativada por cálcio
Cis – trans	Configuração geométrica dos ácidos graxos
CoA	Coenzima A
COX 2	Cicloxigenase 2
CRP	Proteína C reativa
Curva ROC	Método estatístico (Receiver operating chracteristic)
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Dano renal crônico
ERK 1/2	Quinases reguladoras do sinal extracelular
FA	Sítios de ligação dos AG na albumina
FABP	Proteína de ligação dos ac. graxos
FADH	Dinucleotídeo de flavina e adenosina
FI	Focalização isoelétrica
GLP	Fração glicolipoproteica
H^{+}-ATPase	Adenosina trifosfatase ativada por hidrogênio
HCO_3-ATPase	Adenosina trifosfatase ativada por bicarbonato
HD	Hemodiálise
HNF-4alfa	Fator nuclear do hepatócito
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto

IKKα/IKKβ	Complexo proteínas quinases I Kappa α e β
IKKε	Proteína quinase Kappa ε
Ikβ	Proteína inibidora do Kappa B
IL1β	Interleucina 1β
IL6	Interleucina 6
IRA	Injúria renal aguda
IRF3	Fator 3 regulador de interferom
$KHCO_3$	Bicarbonato de potássio
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeo
Malonil-Coa	Malonil coenzima A
MAPKs	Proteína quinase mitógeno ativadora
MD2	Proteína mieloide tipo 2 diferenciada
MyD88	Molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88
Na^+,K^+-ATPase	Adenosina trifosfatase ativada por sódio, potássio e magnésio
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida
NEMO	Inibidor do fator nuclear Kappa/beta subunidade gama
NF-kB	Fator nuclear Kappa beta
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio
PCR	Proteína C reativa
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto isoelétrico
PPAR	Receptor de peroxissoma
PTH	Paratormônio
P66shc	Proteína reguladora na produção de oxidantes
RNA	Ácido ribonucleico
SREBP	Fatores de ligação do esterol ligadoras de proteína
TAK1	Proteína quinase ativadora do TGFβ
TBK1	Serina treonina proteína kinase
TEA	Trietanolamida
TEMED	N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina

TG	Triglicerídeos
TLR4	Receptores Toll Like 4
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIF	domínio que contém o adaptador de indução do interferon beta
TRS	Terapia renal substitutiva
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFF	Universidade Federal Fluminense
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
CH_3COOH	Ácido acético
±	Mais ou menos
Δ9,12	Nomenclatura de dupla ligação nos carbonos 9 e 12 dos ácidos graxos
C	Carbono
°C	Graus Celsius
CO_2	Gás carbônico
Pi	Fósforo inorgânico
H^+	Hidrogênio
β	Beta
ml/min	Mililítros por minuto
x	Multiplicação
=	Igual
$KHCO_3$	Bicarbonato de potássio
NAOH	Hidróxido de sódio
>,<	Maior e menor
g/l	Grama por litro
Min	Minutos
KDa	Quilo Dalton
M	Molar
A	Ampere
mA	Mili ampere
V	Volts
nm	Nanómetro
g	Força G (rotação)
mmol	Milimol
n	número
cm	Centímetro

mg/dl	Miligrma por decilítro
µM	Micromolar
µl	Microlitros
r^2	Coeficiente de determinação
v/v	Volume por volume
H_2SO^4	Ácido sulfúrico

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	**REVISÃO DA LITERATURA**	17
1.1	**O lipidoma**	17
1.2	**Os ácidos graxos**	19
1.3	**A regulação do metabolismo lipídico**	24
1.4	**O metabolismo da célula renal**	26
1.5	**Citoxicidade dos ácidos graxos**	29
1.6	**Lipotoxicidade aguda**	36
1.7	**Lipotoxicidade crônica**	38
2	**OBJETIVOS**	41
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	42
3.1	**Tipo de Estudo**	42
3.2	**Local do estudo**	42
3.3	**Características da amostra**	43
3.4	**Terapia dialítica – hemodiálise**	43
3.5	**Obtenção de soro**	44
3.6	**Estudo experimental *in vitro***	44
3.7	**Extração de lipídios do soro**	45
3.8	**Derivatização dos ácidos graxos**	46
3.9	**Separação dos ácidos graxos não esterificados por HPLC**	46
3.10	**Focalização isoelétrica**	47
3.11	**Dosagem de albumina**	48
3.12	**Albumina deslipidada**	48
3.13	**Cálculo da relação molar ácido oleico/albumina**	49
3.14	**Análise estatística**	49
4	**RESULTADOS**	50
4.1	**Características dos grupos avaliados**	50
4.2	**Avaliação dos AGNE pré e pós HD**	52

4.3 **Avaliação dos AGNE no grupo sepse com IRA**..... 53
4.4 **Avaliação dos AGNE no grupo DRC**..... 54
4.5 **Avaliação dos AGNE nos grupos sepse com IRA, DRC e controle**. 55
4.6 **Avaliação da relação AGNE/albumina no grupo sepse com IRA**..... 56
4.7 **Avaliação da relação AGNE/albumina no grupo DRC**..... 57
4.8 **Avaliação das relações AGNE/albumina pré e pós HD dos grupos sepse com IRA e DRC em relação ao grupo controle**..... 58
4.9 **Avaliação experimental da depuração de AGNE *in vitro***..... 59
4.10 **Avaliação das correlações entre colesterol e triglicerídeos com os AGNE e AGNE/albumina**..... 61
4.11 **Avaliação das taxas de redução da ureia e dos AGNE pela hemodiálise**..... 62
4.12 **Avaliação da relação molar ac. oleico/albumina nos grupos sepse com IRA e DRC**..... 63
4.13 **Avaliação da saturação da albumina pelo método de isoeletrofocalização**..... 64
4.14 **Teste funcional da saturação da albumina nos pacientes do grupo sepse com IRA**..... 67
4.15 **Teste funcional da saturação da albumina nos pacientes do grupo DRC**..... 68
4.16 **Análise do teste funcional da saturação da albumina entre os grupos sepse com IRA, DRC e controle**..... 69
4.17 **Correlações entre a FI com os AGNE e as relações AGNE/albumina**..... 70
4.18 **Determinação de faixas de pH conforme a relação molar AGNE/albumina**..... 72
5 **DISCUSSÃO**..... 74
CONCLUSÃO..... 84
REFERÊNCIAS..... 85
ANEXO A - Termo de consentimento esclarecido..... 96
ANEXO B - Aceite para publicação da revista Journal Critical Care..... 97

INTRODUÇÃO

No início da década de 90, a obesidade tornou-se preocupação mundial com uma prevalência que aumenta de forma alarmante em praticamente todos os países. Dentre os fatores apontados como responsáveis pelo aumento da obesidade podemos destacar a diminuição da atividade física e o maior consumo de alimentos com alta quantidade de calorias e pobres em nutrientes e em fibras. Segundo dados da OMS (2013) 36,9% dos homens e 38% das mulheres no mundo são obesos. Dados americanos mostram que 36,5% dos americanos adultos são obesos com custo anual de 147 bilhões de dólares e custo com saúde por pessoa obesa 1.429 dólares a mais que o não obeso[1].

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, uma em cada cinco pessoas está acima do peso. A prevalência da obesidade passou de 11,8%, em 2006, para 18,9%, em 2016, e o seu crescimento parece ter colaborado para o aumento da prevalência de diabetes e hipertensão. O diagnóstico de diabetes passou de 5,5%, em 2006, para 8,9%, em 2016. A prevalência de hipertensão, no mesmo período, saiu de 22,5% para 25,7%. Em ambos os casos, o diagnóstico é mais prevalente em mulheres. Os números fazem parte da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), realizada em todas as capitais brasileiras[2].

O grande interesse pela investigação dos lipídeos e seus lipidomas ocorre devido o aumento da obesidade na população mundial e da prevalência das doenças a ela relacionada, como hipertensão e diabetes.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O lipidoma

As abordagens ômicas incluem o genoma, o transcriptoma/proteoma e o metaboloma. Com significados diferentes e complementares, as informações ômicas permitem uma análise dos eventos biológicos que se manifestam nos indivíduos. Sumariamente, o genoma nos informa os eventos biológicos que poderão acontecer no indivíduo, a partir do patrimônio genético codificado em seu DNA. O conhecimento do transcriptoma, pelo conjunto completo do RNA transcrito, e do proteoma, pelo conjunto de proteínas, fornecem informações sobre o que está acontecendo[3,4].

O metaboloma, por sua vez, permite a identificação dos fenômenos que já aconteceram, pois ele representa o conjunto de metabólitos resultante dos processos catabólicos e anabólicos presentes num dado organismo. Atualmente, foram descritos no metaboloma humano 41.993 metabólitos, que foram classificados em *fingerprinting* (intracelulares) e *footprinting* (extracelulares), que têm sido estudados para a construção de padrões e de biomarcadores específicos para o reconhecimento de cada um dos diferentes processos fisiopatológicos[5,6].

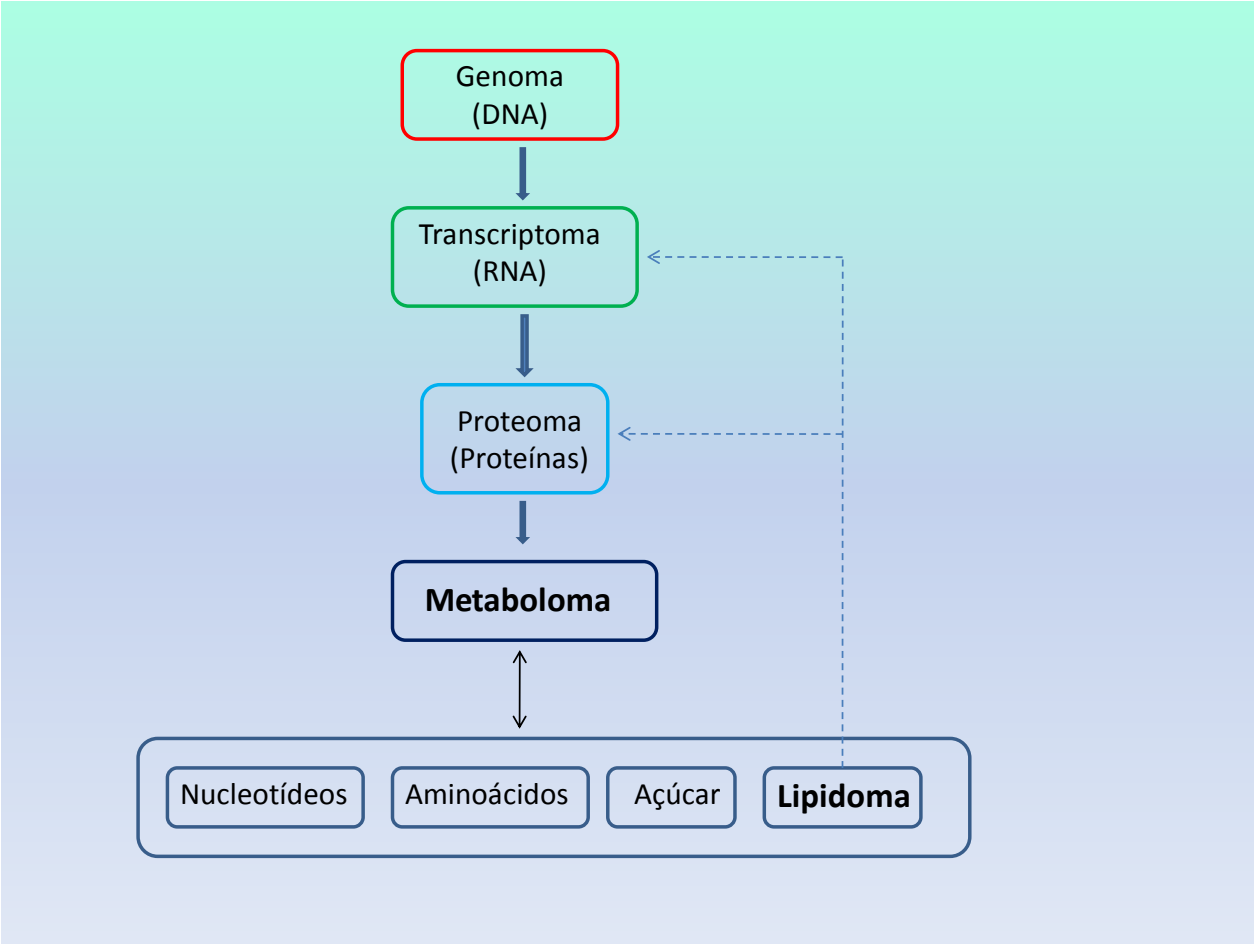
Lipidoma é como se denomina parte do metaboloma referente aos componentes lipídicos. Este campo de pesquisa é relativamente recente e foi impulsionado com o reconhecimento do papel dos lipídios em muitas doenças metabólicas, como obesidade, aterosclerose, hipertensão e diabetes[7-12] associados aos avanços de tecnologias como as cromatografias, a espectrometria de massa, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, a espectroscopia de fluorescência, a interferometria de polarização dupla e os métodos computacionais. Os estudos sobre lipídios já demonstraram que o lipidoma é capaz de interferir tanto no transcriptoma como no proteoma (Figura 1).

O metaboloma, quando aplicado ao diagnóstico de doenças, procura detectar a variação de determinados fragmentos metabólicos no plasma sanguíneo, urina, lágrima

e outros fluidos biológicos que possam melhor representar naquele momento o estado de saúde de um indivíduo[5,6].

A base conceitual de que os fluidos biológicos podem refletir a qualidade da saúde de um indivíduo existe desde a antiguidade. Um dos exemplo clássico dessa ideia pode ser representado pelos antigos médicos chineses que usavam formigas para avaliar a urina de pacientes, para assim detectar a presença de glicose e diagnosticar o diabetes[6].

Figura 1 - Esquema representativo com os elementos envolvidos no metaboloma



Nota: O metaboloma compreende os nucleotídeos, aminoácidos, açúcares e lipodoma além das inter-relações do lipidoma com o trascriptoma, proteoma. Os lipídeos também regulam a função protéica e transcrição de genes.
Fonte: Villas-Boas[5].

1.2 **Os ácidos graxos**

O termo lipídio indica um grupo de compostos que possuem em comum a insolubilidade em água e a solubilidade em solventes orgânicos. Os ácidos graxos (AG) principais constituintes dos lipídios orgânicos, são considerados fonte importante de energia, que é disponibilizada através da dieta humana (até 40% do fornecimento energético diário) e das gorduras armazenadas pelo organismo[1,13,14].

A ingestão de lipídios é também importante para o aporte de AG essenciais, que são assim denominados porque não são sintetizados em quantidades suficientes pelo organismo. Os lipídios são elementos essenciais para a estrutura das células para as funções das membranas celulares, das mitocôndrias e do citoplasma[13-17].

Em consequência da grande variação alimentar, tanto em quantidade como em qualidade, os lipídios assumem uma importância estratégica para a fisiologia e o equilíbrio metabólico. Nos períodos de abundância alimentar ocorre a lipogênese, e nos períodos de jejum as reservas lipídicas são utilizadas a partir da lipólise. O organismo gerencia a biodisponibilidade das diferentes formas de lipídios através de um complexo balanço energético entre o controle dos nutrientes e a ação do sistema neuro-hormonal[13-15,18-24].

A gordura corporal é armazenada no fígado e, especialmente, acumulada no tecido adiposo, formando a camada isolante térmica localizada nos tecidos subcutâneos. As propriedades elétricas permitem a propagação rápida das ondas de despolarização, como fazem os lipídios não polares ao longo das fibras nervosas mielinizadas. Os lipídios são elementos básicos para a síntese hormonal (a partir do colesterol), para mensagens de transdução intracelulares (fosfolipídios) e ativação da transcrição genética (esteróides e AG)[13-16,21].

A mudança dos hábitos alimentares e do estilo de vida da sociedade moderna têm acarretado muitos problemas para o funcionamento do organismo, sobretudo pelo crescimento da obesidade na população mundial[1]. A obesidade está associada às dislipidemias, com níveis plasmáticos elevados de AG não esterificados e ao aumento da incidência de distúrbios patológicos como a síndrome metabólica[25], o diabetes tipo 2[25-29],

as doenças cardiovasculares[25,29], as hepatopatias[25], a insuficiência renal[26,28,], a pancreatite[25] e as neoplasias[25].

Os AG são ácidos orgânicos formados por cadeia de hidrocarbonetos de 4 a 36 átomos de carbono. No organismo, os principais AG possuem cadeias de 12 a 24 carbonos, sendo os mais abundantes no sangue os AG de 14 a 18 carbonos, representados no Quadro 1[13].

Quadro 1- Ácidos graxos com cadeia de 14 a 18 carbonos

Nome comum	Fórmula geral	Nome IUPAC
Ac. mirístico	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	Ac.Tetradecanóico
Ac. palmítico	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	Ac. Hexadecanóico
Ac. esteárico	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	Ac. octadecanóico
Ac. palmitoleico (C_{16}:1)	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ac. *cis*-9-hexadecanóico
Ac. oleico (c_{18}:1)	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ac. *cis*-9-octadecanóico
Ac. linoleico (C_{18}:2)	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ac. *cis*,*cis*-9,12-octadecanóico

Fonte: Nelson[13].

Na natureza, os AG se formam a partir do ácido acético (CH_3COOH) ou são provenientes da hidrólise de gorduras naturais. Os AG são cadeias de hidrocarbonetos que têm numa extremidade uma função carboxílica (onde o carbono recebe o número 1) e, na outra extremidade, um grupamento metil conferindo a estas moléculas características anfipáticas[13].

Como regra geral, os hidrocarbonetos são dispostos em cadeia não ramificada e contêm um número par de átomos de carbono pelo fato de serem sintetizados a partir de unidades compostas por dois carbonos. Se não existe dupla ligação entre os átomos de carbono, os AG são ditos saturados, caso contrário, são denominados insaturados, podendo ainda ser mono ou poliinsaturados. Em quase todos os AG insaturados que ocorrem naturalmente as ligações duplas encontram-se em configuração *cis*. Gorduras de origem animal são geralmente ricas em AG saturados. Os óleos de origem vegetal são ricos em AG insaturados. AG *trans* são obtidos dos laticínios e da carne. O método

de hidrogenação parcial é utilizado para aumentar o prazo de validade e a estabilidade dos alimentos nas altas temperaturas, como ocorre nos óleos vegetais de fritura culinária, transformam algumas ligações duplas *cis* em ligações duplas *trans*[13].

Existem fortes evidências de que o consumo de AG *trans* pela dieta (frequentemente chamados de "gorduras *trans*") associa a uma maior incidência de doenças cardiovasculares e evitar essas gorduras na dieta reduz consideravelmente o risco de doenças cardíacas[13,16,29].

Os AG *trans* na dieta aumentam o nível de triglicerídeos e de colesterol LDL no sangue e diminuem o nível de colesterol HDL. Essas alterações por si só, são suficientes para aumentar o risco de doenças cardíacas, mas podem ter outros efeitos adversos como o aumento da resposta inflamatória, que é outro fator de risco para doenças cardíacas[15].

Cada AG possui um nome sistemático que é derivado do hidrocarboneto correspondente. A posição de qualquer dupla ligação é determinada por números, utilizando a menor numeração do carbono da dupla ligação, que podem ser escritos seguindo a letra Δ (delta), na nomenclatura delta, ou entre parênteses, na nomenclatura ômega. Quando há mais de uma dupla ligação, segue-se uma ordem crescente, como exemplo: 18:2 (Δ9,12) ou 18:2 (9,12), que significa um AG com 18 átomos de carbonos e duas duplas ligações uma entre C9 e C10 e outra entre C12 e C13[13]. Os AG podem ainda ser nomeados de acordo com a sua origem, como é o caso do ácido mirístico, do latim Mirystica – gênero da noz moscada, ou do ácido palmítico, do grego palma, que significa palmeira[13] (Quadro 1).

Os AG podem existir de maneira transitória na sua forma livre, também chamada de AG livres ou AG não esterificados (AGNE) ou serem parte constituinte de estruturas lipídicas. Estas biomoléculas desempenham diversas funções no organismo, destacando-se: reserva de energia, combustível celular, componente estrutural das membranas biológicas (fosfolipídios e esteróis representam quase metade da massa destas membranas), isolamento térmico e proteção de órgãos. Há determinados lipídios presentes em quantidades relativamente pequenas que desempenham papéis fisiológicos fundamentais como co-fatores enzimáticos, transportadores de elétrons, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares[13-16].

A Bioquímica divide os lipídios em dois grandes grupos: com ou sem cadeia de AG em sua composição. Quando os lipídios não contêm AG em sua composição eles não sofrem saponificação (reação com hidróxido de sódio a quente). Dentre estes, os principais são os terpenos, cujas unidades básicas são os isoprenóides e os principais são as vitaminas E e K[13,16].

Os lipídios também podem ser divididos em lipídios de armazenamento e lipídios estruturais de membranas. Os lipídios de armazenamento resultam da associação do glicerol (um triálcool com uma cadeia de três carbonos) com um, dois ou três AG, formando assim o mono, di ou triacilglicerol, respectivamente. Os triacilgliceróis ou triglicerídios (TG) também são conhecidos como gorduras neutras e os AG que participam de sua estrutura, de um modo geral, são diferentes entre si[13,16,25].

O ser humano é capaz de sintetizar AG, incluindo os saturados e os monoinsaturados. Porém, os AG poliinsaturados, principalmente os das classes omega-6 (família do ácido linoleico e ômega-3 - família do ácido linolênico) devem ser extraídos da dieta, já que são sintetizados apenas pelos vegetais. As células dos mamíferos não têm a capacidade de inserir uma dupla ligação antes do carbono 9 da cadeia dos AG. Portanto, os AG assim formados são classificados como essenciais e são precursores de biomoléculas importantes como as prostaglandinas, derivadas do ácido linoleico e com funções sobre a contratilidade do músculo liso e modulação da recepção da sinalização hormonal[13,16].

As propriedades físico-químicas dos AG e dos compostos que os contêm são, em grande parte, determinadas pelo tamanho e pelo grau de insaturação da sua cadeia. A característica apolar da cadeia de hidrocarboneto é responsável pela baixa solubilidade dos AG em água; quanto maior a cadeia e menor o número de duplas ligações, menor a sua solubilidade[13].

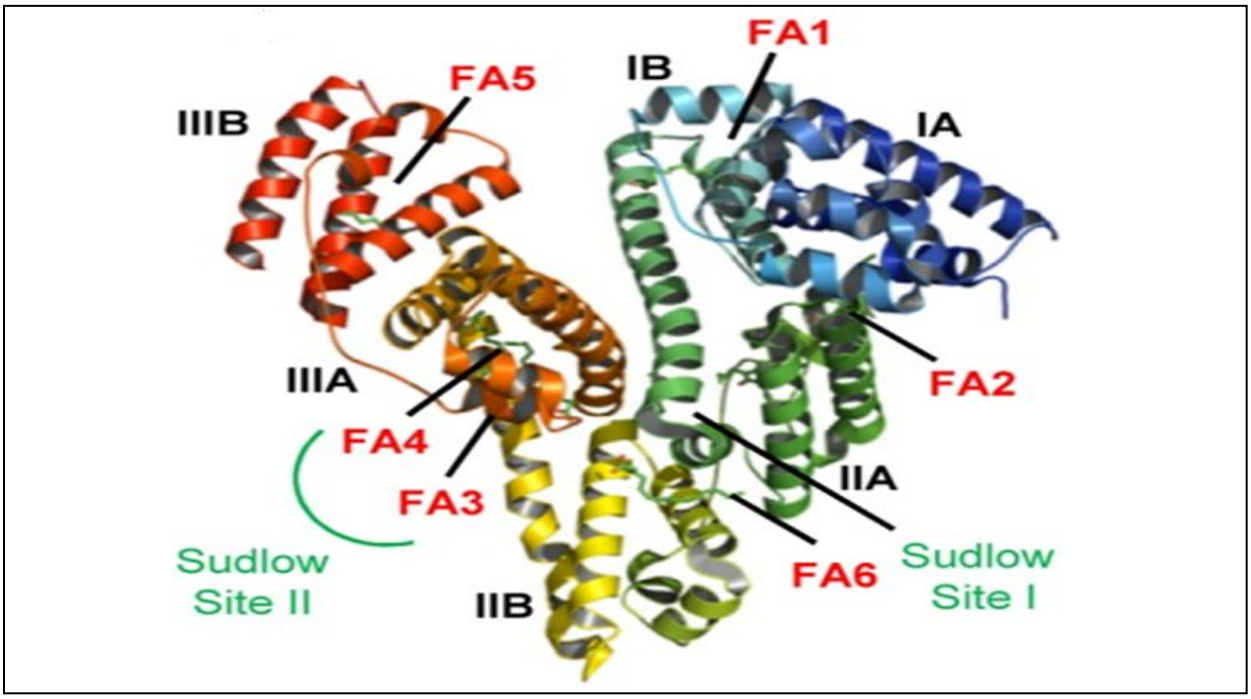
A insolubilidade em água confere às substâncias que contém AG na sua composição duas características que são de grande relevância funcional. A primeira é que por serem insolúveis, os lipídios, principais componentes das membranas celulares, estabelecem uma interface entre o meio intracelular e o extracelular, francamente hidrófilo. A segunda característica é que os TG, ricos em AG e principal fonte de armazenamento de energia, por serem hidrofóbicos, não têm que carrear peso extra da

água de hidratação quando são transportados como combustível, como ocorre com os polissacarídeos[16]. Entretanto, como os AG livres são anfipáticos, eles podem ser solubilizados na forma de sal[15].

Outra característica física dos AG que é influenciada pelo comprimento da cadeia e grau de saturação desta, diz respeito ao ponto de fusão. À temperatura ambiente (25°C) os AG saturados de 12 a 24 carbonos têm consistência serosa, enquanto os insaturados com o mesmo comprimento de cadeia carbônica são líquidos oleosos. Esta diferença ocorre pela conformação espacial das cadeias de hidrocarbonetos[13].

Fisiologicamente, os AG são transportados no plasma ligados à albumina. A albumina se liga a mais de 99% dos AG presentes no plasma com uma fração molar menor que 1. Cada molécula de albumina é capaz de ligar até 7 moléculas de AG, como representado na Figura 2[30-32]. Os ácidos palmítico, esteárico oleico e linoleico representam 80% dos AG ligados à albumina[32]. Quando há um excesso de AG na circulação, aparecem às frações livres nos plasma, responsáveis pelos potenciais efeitos de lipotoxicidade sistêmica.

Figura 2 - Sítios de ligação dos AG na albumina



Legenda: FA – sítios de ligação dos AG na albumina.
Fonte: Roy[31].

1.3 **A regulação do metabolismo lipídico**

Para realizar o processo de oxidação para produção de energia, as células dos vertebrados obtêm AG através de três vias: da alimentação; da mobilização de gorduras armazenadas em tecidos especializados (tecido adiposo) e no fígado a conversão do excesso dos carboidratos em gorduras[15,27].

Quando as moléculas combustíveis provenientes da dieta são absorvidas pelo organismo em quantidades superiores às suas necessidades diárias, elas permanecem estocadas no tecido adiposo na forma de TG. Quando ocorre déficit de energia, estes TG são hidrolisados gerando glicerol e AG, para ser utilizado como combustível metabólico por diferentes tecidos, principalmente fígado, coração, rins e músculo esquelético. O controle metabólico fica a cargo dos sistemas nervoso e endócrino, de maneira que a síntese (lipogênese) e a degradação (lipólise) não ocorram simultaneamente[14,15,21-23]. A principal enzima reguladora da síntese de AG é a acetil-CoA carboxilase, que catalisa a reação:

$$\text{Acetil-CoA} + CO_2 + \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Malonil-CoA} \qquad (1)$$

O grupo malonil coenzima A (Malonil-CoA) ativado entra em um ciclo de reações com quatro passos básicos em que cada passagem pelo ciclo aumenta a cadeia de AG em dois átomos de carbono. A síntese de AG é rigorosamente controlada e ocorre no citosol[14,16].

Quando o organismo utiliza AG como fonte de energia, ele o faz através da oxidação. A oxidação do AG é uma via catabólica de degradação para produção de energia e ocorre na matriz mitocondrial, após a ativação e a entrada dos AG na mitocôndria. A ativação dos AG consiste na entrada destes na mitocôndria (Figura 3), na forma de acil coenzima A (acil-CoA). Este processo depende da ligação do AG com a CoA, formando o acil-CoA no citosol. A reação é catalisada pela enzima acil-CoA sintetase, localizada na membrana mitocondrial externa[15,24]:

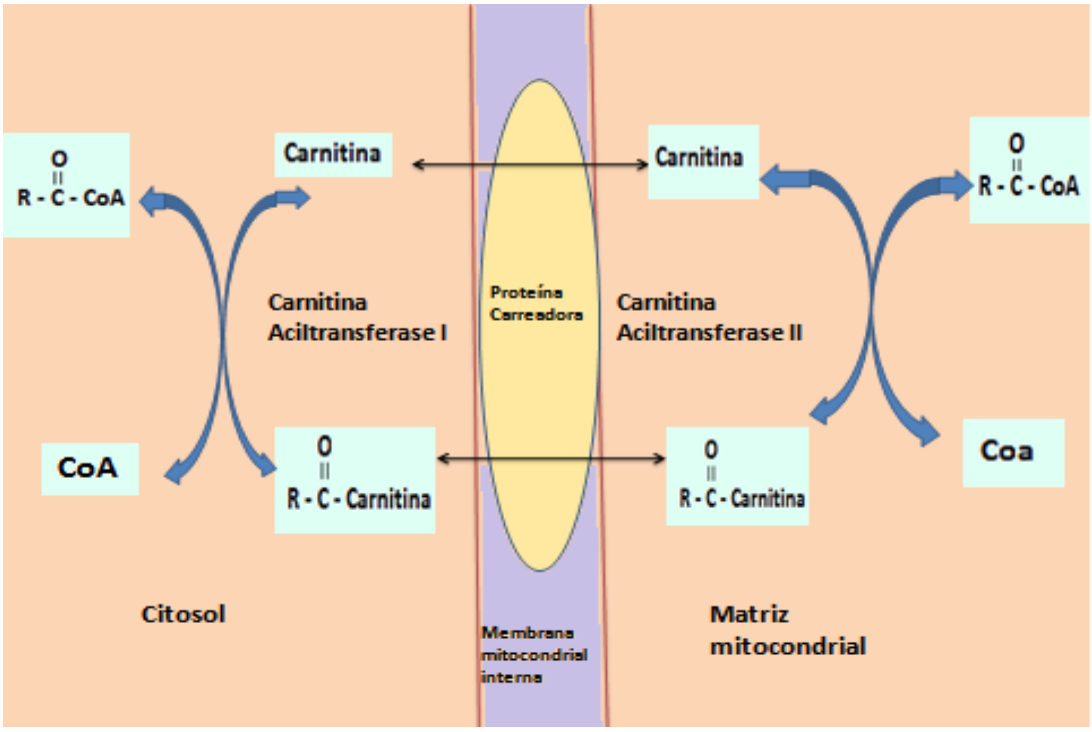
AG + CoA + ATP ⇆ acil-CoAgraxo + AMP + Pi (2)

Após a primeira reação, o radical acila é transportado, através da membrana mitocondrial, do citosol para a matriz, transporte este mediado pelo carreador específico que é a carnitina. A transferência do radical acila da coenzima A (CoA) para a carnitina é catabolizada pela enzima Carnitina-acil-trasferase I:

Acil-CoA + carnitina → acilcarnitina + CoA (3)

Do lado da matriz mitocondrial, a carnitina doa novamente o radical acila para a CoA, regenerando o acil-CoA no meio interno da mitocôndria. A reação é catalisada pela Carnitina-acil-transferase II, localizada na face interna da matriz mitocondrial e é o inverso da reação acima demonstrada.

Figura 3 - Processo de entrada dos AG na matriz mitocondrial



Fonte: Nelson[15].

A oxidação dos AG ocorre sempre em seu carbono β e por isso é dita β-oxidação. Neste processo o AG sofre quebra por oxidação de sua cadeia, convertendo-a em uma nova carbonila de um AG agora dois carbonos mais curta. Cada ciclo libera 1 dinucleotídeo de nicotinamida (NADH) + H^+ + 1 dinucleotídeo de flavina e adenosina reduzida ($FADH_2$) + 1 Acetil-CoA. A síntese de ATP acoplada à β-oxidação utiliza elétrons do NADH e do $FADH_2$ formados na cadeia respiratória a partir da oxidação dos radicais acetil dos acetil-CoA no ciclo de Krebs[15].

A regulação da via de β-oxidação é feita pela enzima reguladora Carnitina-acil-transferase I, que regula a velocidade de entrada do AG na mitocôndria e, desta forma, modula a velocidade de sua degradação[24]. Esta enzima é inibida por Malonil-CoA, um intermediário cuja concentração aumenta na célula quando esta tem carboidrato disponível. Caso o AG seja insaturado, ele sofre primeiramente dois passos enzimáticos adicionais: conversão do isômero *cis* em *trans* e saturação da dupla ligação pela adição de água[14].

1.4 **O metabolismo da célula renal**

A massa de tecido renal corresponde apenas a 0,5% do peso corporal total, mas seu fluxo sanguíneo recebe cerca de 20% do débito cardíaco. Este sangue é filtrado através dos glomérulos a uma taxa de 100ml/minuto e aproximadamente 99% do ultrafiltrado glomerular é reabsorvido ativamente nos túbulos renais[33].

O intenso mecanismo de transporte ativo necessário para a reabsorção tubular é realizado de forma integrada pelas enzimas localizadas nas membranas do epitélio renal, denominadas ATPases transportadoras de íons, incluindo: adenosina trifosfato ativada por sódio, potássio e magnésio (Na^+,K^+ATPase), adenosina trifosfato ativada por cálcio (Ca^{2+}ATPase), adenosina trifosfato ativada por hidrogênio (H^+ATPase) e adenosina trifosfato ativada por bicarbonato (HCO_3^-ATPase). Estas ATPases realizam suas funções com gasto energético obtido da hidrólise de ATP. Dentre as ATPases, a Na^+,K^+ATPase é a que consome o maior percentual de ATP, cerca de 60 a 80% do total[34].

Para a manutenção de um contínuo suplemento de ATP de forma a garantir a energia para processos de transporte, a célula renal necessita metabolizar substratos e gerar ATP. A síntese de ATP celular é dependente de processos metabólicos tais como oferta de oxigênio, transporte de substratos, distribuição de enzimas relacionadas ao uso de substratos endógenos e/ou exógenos.

Cada segmento do néfron, de uma maneira geral, utiliza um substrato preferencial para fornecimento de ATP, bem como estoca um tipo específico de substrato para os casos de alterações nas vias normais de fornecimento de substratos exógenos[34].

A célula renal gera cerca de 95% de seu ATP intracelular através de fosforilação oxidativa mitocondrial. Os diferentes substratos que são normalmente utilizados e as respectivas quantidades de ATPs gerados são representados no Quadro 2. Os principais AG utilizados para produção de ATP pelas células renais são o ácido oleico, ácido palmítico e ácido linoleico[34].

Quadro 2 - Rendimento energético pelas principais vias do metabolismo renal

Reação	ATP
1 palmítico → 16 CO_2	+129
1 glicose → 6 CO_2	+ 36
1 glutamina → 5 CO_2	+ 27
1 lactato → 3 CO_2	+ 18
2 glutamina→ glicose + 4 CO_2	+14
2 lactato→ 1 glicose	**- 6**

Fonte: Gong[33].

Nos túbulos proximais, os AG entram nas células através das suas membranas basolaterais em quantidades que guardam correlações lineares com as suas concentrações no sangue arterial. Entretanto, somente uma pequena proporção de AG captados pela célula é oxidada, sendo a maioria dos AG incorporada na forma de TG[33,34].

Nos rins, a β-oxidação de AG tem se mostrado importante para a produção de ATP no córtex e na medula externa, enquanto na medula interna esta função é principalmente atribuída aos carboidratos. Nas células tubulares a β-oxidação de AG para acetil-CoA

ocorre tanto na mitocôndria quanto nos peroxissomos. No citosol, os AG são convertidos em acil-CoA, que é impermeável à membrana mitocondrial, e necessitam sofrer uma esterificação pelos derivados da carnitina para serem transportados através da membrana mitocondrial[34].

Na matriz mitocondrial, Acil-CoA é metabolizado para acetil-CoA pela hidroxiacil-CoA desidrogenase e o acetil-CoA entra no ciclo do ácido tricarboxílico. Nos peroxissomos do citosol, AG são convertidos para acetil-CoA por acil-CoA oxidase e constituem uma via de menor importância energética no rim[34].

O paciente com insuficiência renal crônica (DRC) pode apresentar alterações do metabolismo lipídico secundário ao estado urêmico[35]. A uremia pode gerar modificações do metabolismo lipídico e, por conseguinte, produzir alterações na concentração de AGNE.

A hipertrigliceridemia é a anormalidade lipídica mais comum em pacientes renais crônicos, cuja prevalência e gravidade se correlaciona diretamente com a gravidade da insuficiência renal[36,37]. A hipertrigliceridemia leve pode estar presente em aproximadamente 30% de pacientes com taxa de filtração glomerular entre 15 e 30 ml/minuto, enquanto 60 a 80% dos pacientes com DRC avançada (<15ml/min) apresentam hipertrigliceridemia moderada[35].

A literatura propõe como causas da hipertrigliceridemia o aumento da concentração de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), cujo catabolismo se encontra diminuído na DRC e a diminuição da atividade da lipoproteína lipase (LPL) e da lípase hepática, responsáveis pelo metabolismo dos triglicerídios[38].

A diminuição de atividade da LPL é multifatorial, pode ser devida a um déficit na sua síntese, ao estado de reconhecida resistência insulínica do paciente urêmico, diminuição da expressão de LPL e à alterações nos níveis de paratormônio (PTH), que ocorre no hiperparatireoidismo secundário e que diminui acentuadamente a atividade da LPL[39]. Na uremia, além das alterações metabólicas, ocorrem modificações hormonais que podem comprometer o metabolismo lipídico[39].

A carnitina é essencial para o transporte de AG de cadeia longa para o interior da mitocôndria, podendo apresentar-se sob a forma livre ou esterificada. O túbulo renal proximal reabsorve 90% da carnitina filtrada, sendo que o clearance de acil-carnitina é

de quatro a oito vezes maior que o da carnitina livre, devido à reabsorção preferencial desta última[40,41].

Nos pacientes urêmicos em tratamento conservador, a concentração plasmática de acil-carnitina aumenta proporcionalmente ao declínio da taxa de filtração glomerular, alterando a proporção carnitina livre/ésteres de carnitina que determina uma deficiência relativa de carnitina. Esta condição é agravada pela redução na ingestão proteica secundária à restrição dietética e à perda de apetite presentes na uremia[40,41].

Os pacientes em hemodiálise perdem carnitina através da membrana dialítica, com redução da concentração plasmática em torno de 75%. Nesta população, a redução de carnitina pode interferir com o transporte de AG de cadeias longas para o interior da mitocôndria no processo de β-oxidação, podendo determinar aumento de TG e elevação da concentração de AGNE no soro[42,43]. A elevação dos AGNE também pode estar relacionada diretamente ao menor consumo das células renais devido ao dano renal agudo ou crônico representados pela lesão celular e/ou diminuição da massa renal[44].

1.5 **Citotoxicidade dos ácidos graxos**

Os AG representam uma importante fonte de energia para o organismo, no entanto eles podem ser responsáveis por efeitos tóxicos sobre diferentes tipos celulares, na dependência, principalmente, de suas concentrações séricas na forma livre. Os AG são transportados no sangue pela albumina. Teoricamente como a albumina possui 7 sítios de ligação para os AGNE, a relação molar AG/albumina seria igual a 7[30,31]. Quanto maior a relação AG/albumina, maior a possibilidade de existência de AG na forma livre e de seus efeitos citotóxicos. Em diferentes situações clínicas, o nível sérico de determinados AG como o ácido oleico pode aumentar consideravelmente a relação AG/albumina, atingindo valores acima de 2, ou ainda maiores[45]. A ligação dos AG na molécula de albumina sofre interferência de outras moléculas metabólicas como ocorre com a bilirrubina, que compete com os AG pelo sítio de ligação na proteína[30].

O acúmulo de AG em tecidos não adaptados ao seu armazenamento causa transtornos celulares denominados de lipotoxicidade[44-48]. Quando ocorre saturação da capacidade de ligação da albumina aos AG, estes são redistribuídos primeiramente para as células que estão diretamente expostas aos AG no soro, ou seja, hemácias, células brancas e células endoteliais[48]. Em 1977, Gordon[45] demonstrou o potencial de toxicidade dos AG saturados sobre as células de mamíferos, provocando fendas citoplasmáticas com alterações degenerativas irreversíveis, lesões não observadas com os AG insaturados.

Na literatura, o termo lipotoxicidade foi utilizado pela primeira vez em 1994, quando Young Lee et al.[47] descreveram a lipotoxidade das células beta na patogênese do diabetes não insulino-dependente em um modelo de ratos obesos e diabéticos. Neste modelo, duas semanas previamente ao início da hiperglicemia, os AG livres séricos começaram a se elevar progressivamente, ao mesmo tempo em que a secreção de insulina estimulada pela glicose estava inibida. O conteúdo de triglicerol das ilhotas pancreáticas se elevou 10 vezes em relação ao controle, dado este que foi correlacionado com os AG livres, que por sua vez encontravam-se correlacionados com a concentração sérica de glicose. A redução da hiperlipidemia também reduziu todas as anormalidades das células betas e preveniu a hiperglicemia.

A lipotoxicidade está associada à situações patológias, como no trauma, a sepse, a pancreatite, o embolismo, as neoplasias, as vasculopatias, o diabetes e especialmente a obesidade e a síndrome metabólica[25-29,48]. A lipotoxicidade também contribui para a disfunção orgânica sistêmica, como foi descrito na doença renal crônica,[26,28,44,48] e o seu mecanismo parece envolver o acúmulo de ácido graxo não esterificado e de triglicerídeos[48]. Níveis elevados de AG circulantes do tecido adiposo podem acarretar acúmulo de metabólitos potencialmente tóxicos como o acil-CoA-ac.graxo, diacilglicerol e ceramida. O mecanismo de injúria celular envolve a geração de espécies reativas ao oxigênio, liberação de fatores pró fibróticos e inflamatórios, transtorno de sinalização celular, necrose e apoptose[48-51]. O excesso de lipídios é dirigido para caminhos metabólicos alternativos, não oxidativos, que resultam na formação de moléculas lipídicas reativas, que por sua vez, promovem disfunção celular grave (lipotoxicidade) e morte celular programada (lipoapoptose)[51,52].

Apesar dos mecanismos citotóxicos envolvendo os AGNE não serem completamente conhecidos, sabe-se que eles podem alterar a fluidez da membrana celular e interferir na atividade de diversos sistemas de transporte[53-55]. Estudos já demonstraram que a elevação aguda de AGNE aumenta a concentração de isoprostanes F2, que é um biomarcador de stress oxidativo[56].

A configuração do AG pode determinar o grau de lipotoxicidade. Na maior parte dos AG insaturados presentes na natureza, as ligações duplas se encontram na configuração *cis*. A configuração *trans* pode ser obtida pela hidrogenação parcial, muito utilizada para aumentar o prazo de validade dos produtos alimentares e para dar estabilidade em altas temperaturas para os óleos vegetais utilizados para frituras. Vários estudos mostram que essa configuração está relacionada a inflamação, disfunção endotelial e maior incidência de doenças cardiovasculares[13,29,57].

Outros estudos têm mostrado diferenças entre os efeitos biológicos, deletérios ou não, dos AGNE saturados e insaturados. Em células musculares expostas ao ácido saturado palmítico ocorre aumento do nível do diacilglicerol e consequente ativação da via proteína Kinase C – fator nuclear B, resultando em aumento da interleucina 6 e diminuição da expressão dos genes envolvidos no controle da capacidade oxidadativa das células musculares (PPAR coativador 1) e da síntese de triglicerídos. Em contraste, a exposição destas células ao ac. oleico não ocorreram as mesmas alterações[58-61].

Os AGNE estão relacionados a mecanismos de apoptose e de necrose celular. Estudo realizado em 2004 por Artwohl et al.[62] com endotélio de cordão umbilical demonstrou que os AGNE afetam a proliferação endotelial, levando a apoptose de células podendo contribuir para a disfunção micro e macrovascular. A elevação de AGNE também está associada à morte celular por necrose evidenciada em estudo com leveduras, mecanismo esse mediado pela mitocôndria[62,63].

A elevação dos AGNE também está associada a apoptose cardíaca em modelos de isquemia-reperfusão. Observa-se ainda, correlação entre os níveis de AG circulantes e teciduais com a presença de arritmias e liberação enzimática pós-infarto miocárdico[46,64].

Além dos efeitos de necrose e apoptose, os AGNE podem produzir outros efeitos deletérios através de mecanismos de modulação imunológica, inibição da Na,K-ATPase e da expressão genética, contribuindo na disfunção orgânica observado em várias

patologias[65-74]. A ação dos AGNE sobre a atividade da bomba Na,K-ATPase foi descrita pela primeira vez em 1971 por Ahmed K e Thomas BS[73]. Macgrecor et al.[74] que posteriormente sugeriram que a Na,K-ATPase seria um sítio adicional onde mensageiros lipídicos poderiam interagir em condições fisiológicas normais, mas consideraram que tal ação seria improvável devido à adsorção dos AGNE pelas proteínas plasmáticas.

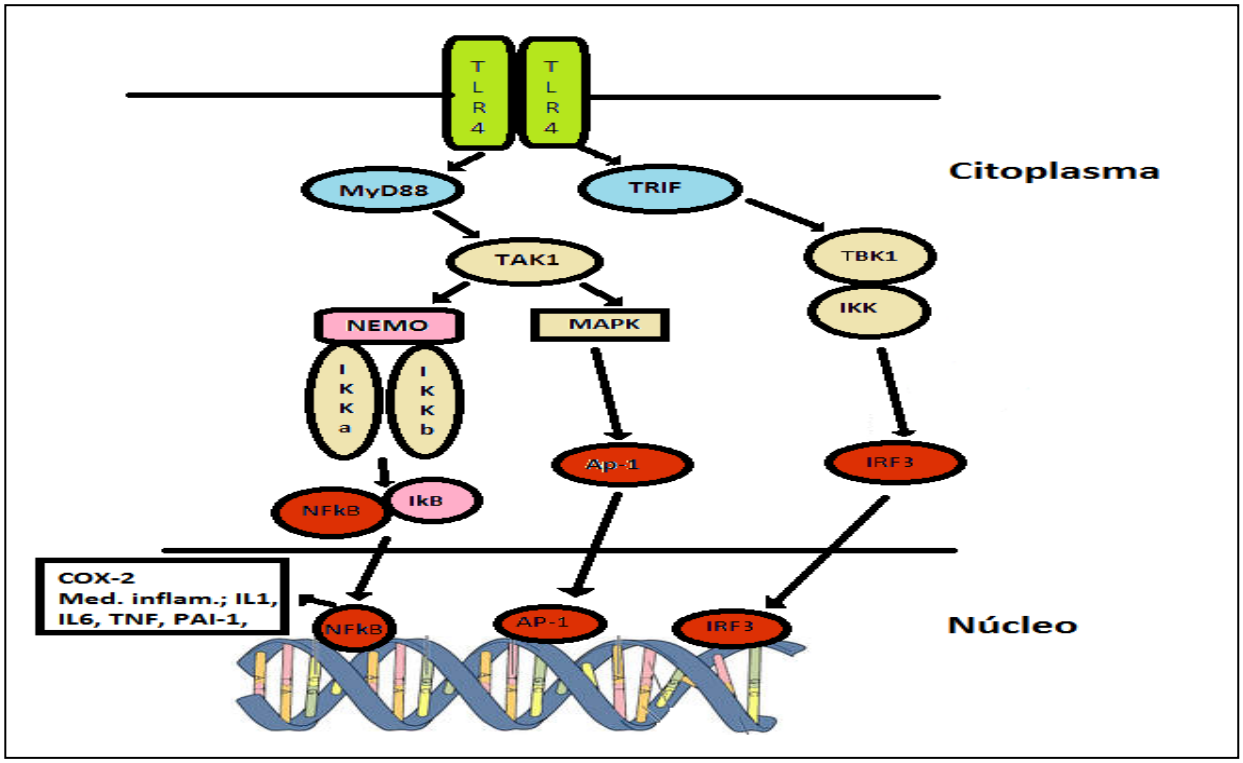
Estudos realizados com a fração glicolipoproteica (GLP) presente na membrana de *Leptospira interrogans,* considerada como uma endotoxina, mostram que a GLP provoca inibição nas diferentes isoformas da enzima Na,K-ATPase e este efeito biológico integra a base da fisiopatologia celular na leptospirose[66-68,71,72].

Os AGNE também estão associados à alterações no sistema imune. A incorporação de lipídios pode alterar a arquitetura da membrana celular e expor vias de sinalização com efeito quimiotático para a cascata de reações inflamatórias[75]. Abuquerque et al.[76] em 2012, avaliou o potencial de injúria pulmonar com ácido oleico em ratos e evidenciou o aumento de edema, a migração celular, as citocinas dependentes da ativação das quinases reguladoras do sinal extracelular (receptor ERK1/2), fenômenos estes associados à inibição da Na,K-ATPase.

Os AGNE também podem causar inibição da ativação linfocitária, o que pode representar um efeito imunossupressor clinicamente relevante[77]. Estudos relacionando AGNE e inibição de linfócitos T demonstraram que o ácido esteárico tem um papel inibidor da proliferação linfocitária. Esta inibição é reversível pela adição de ácido oleico e também de albumina[77,78].

A literatura tem mostrado o papel dos AGNE sobre os receptores Toll like (TLR4) relacionado a processos inflamatórios. Os receptores Toll like são expressos em todas as células humanas. Eles são receptores-chave da imunidade inata e potentes indutores da resposta pró-inflamatória[79] (Figura 4).

Figura 4 - Vias de sinalização do TLR4



Nota: TLR4 ativa as vias do MyD88 e do domínio TIR que contém o TRIF. MyD88 ativa a TAK1 que por sua vez ativa o complexo proteínas quinases I Kappa α e β e inibidor do fator nuclear NEMO/IKKα/IKKβ que catalisa a degradação de IκB e libera o NF-κB que atuará no núcleo. TAK1 atua também no MAPKs levando a ativação do AP-1. Por outro lado TRIF ativa TBK1/IKKε, ativando a transcrição do IRF3. TRIF também ativa TAK1 na fase tardia de ativação do TLR4. O NF-κβ ativas vias como a da COX-2 e da produção de inúmeros medidores inflamatórios como CRP, PAI-1 IL6, TNF e IL1β.

Fonte: Eguchi[80].

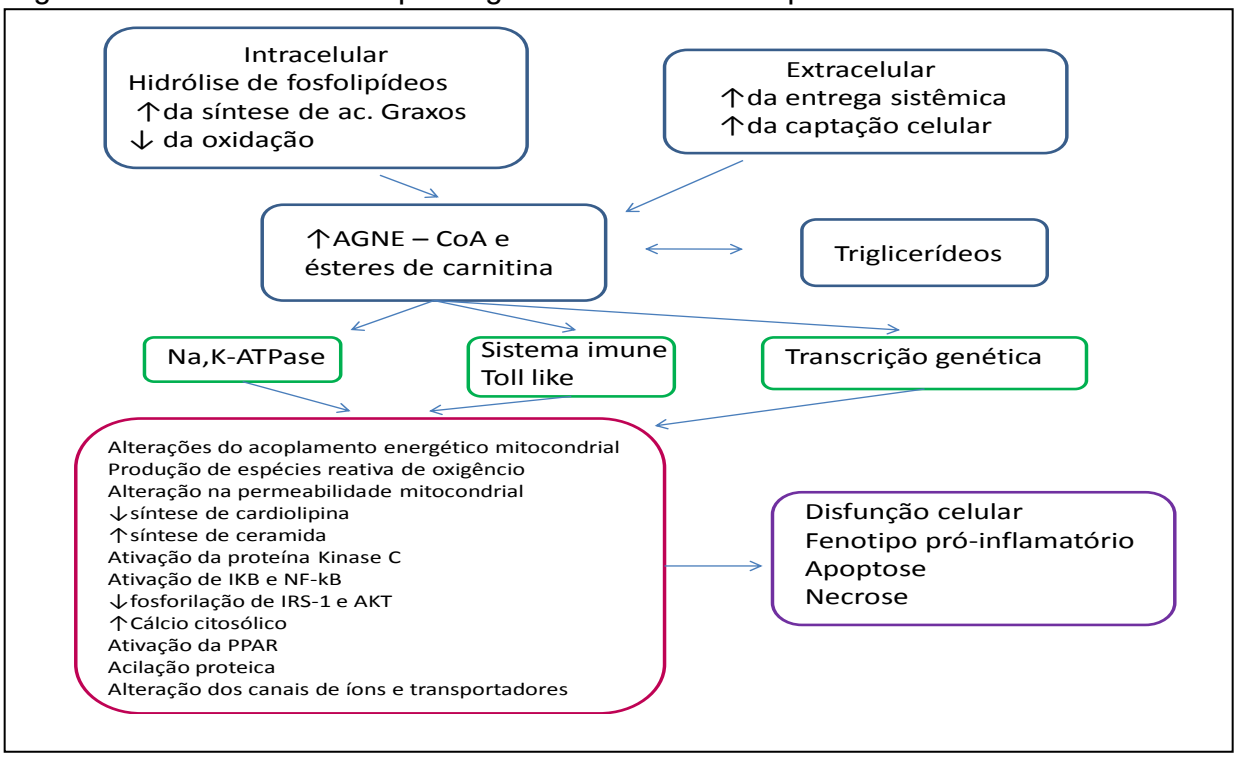
O TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) componente da bactéria gram negativa bem com extratos da membrana externa da *Leptospira santarosai* sorotipo Shermani e ativa vias de sinalização inflamatória incluindo o fator NF-κβ (fator nuclear kappa beta). O papel dos AGNE observado na resistência insulínica é dependente da ativação do NF-κβ; que por sua vez é responsável pela ativação de outras vias como a da cicloxigenage (COX-2) e da produção de medidores inflamatórios como proteína C reativa (PCR), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), interleucinas 6 e 1B (IL6, IL1β) e fator de necrose tumoral (TNF)[80-85].

A ausência de receptor TLR4 em murinos submetidos a estudo com dieta rica em gorduras não levou ao aumento dos marcadores inflamatórios e da resistência a insulina (efeito este verificado no grupo controle – animais normais), evidenciando a importância

do papel dos receptores TLR4. Este efeito dos AGNE nos receptores TLR4 pode ocorrer via proteína mieloide diferenciada tipo 2 (MD2)[58,86].

Os AGNE também podem agir no núcleo das células afetando a transcrição de vários genes como NF-κβ, já descrito anteriormente, bem como nos receptores da peroxisoma (PPAR), fator nuclear hepatócito (HNF-4 alfa), receptor X hepático e fatores de ligação do esterol ligadoras de proteínas (SREBP). Curiosamente, o aporte de ácido oleico na dieta oral pode contribuir para redução dos níveis plasmáticos dos AGNE (via ativação do receptor da peroxisona), modulando o potencial de citotoxicidade dos mesmos no organismo[76,87]. A Figura 5 sintetiza os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lipotoxicidade.

Figura 5 - Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lipotoxicidade



Fonte: Weimberg[48].

Entretanto, alguns estudos sugerem que nem todos os AG promovem ativação dos receptores Toll com consequente quadro inflamatório. Lee et al.[59] estudando células epiteliais, verificaram que a ativação de NF-κβ e expressão de COX-2 dependente da ativação da via TLR4 pelos AG saturados, mas não pelos insaturados.

Os AGNE podem causar efeitos biológicos deletérios nos rins. Kume et al.[88] em 2007 avaliando dieta rica em AG em ratos, observou alterações no balanço renal entre lipogênese e lipólise, com consequente acumulo de lipídios e injúria renal.

Alguns estudos descrevem o efeito da elevação do AGNE no meio tubular renal. A presença de albumina muito saturada de AG nos túbulos renais pode alterar o meio redox promovendo a apoptose[49], como também são responsáveis pela elevação de espécies reativas ao oxigênio via mitocôndria e da P66shc que é um mediador de stress oxidativo e de injúria renal[88,89,93].

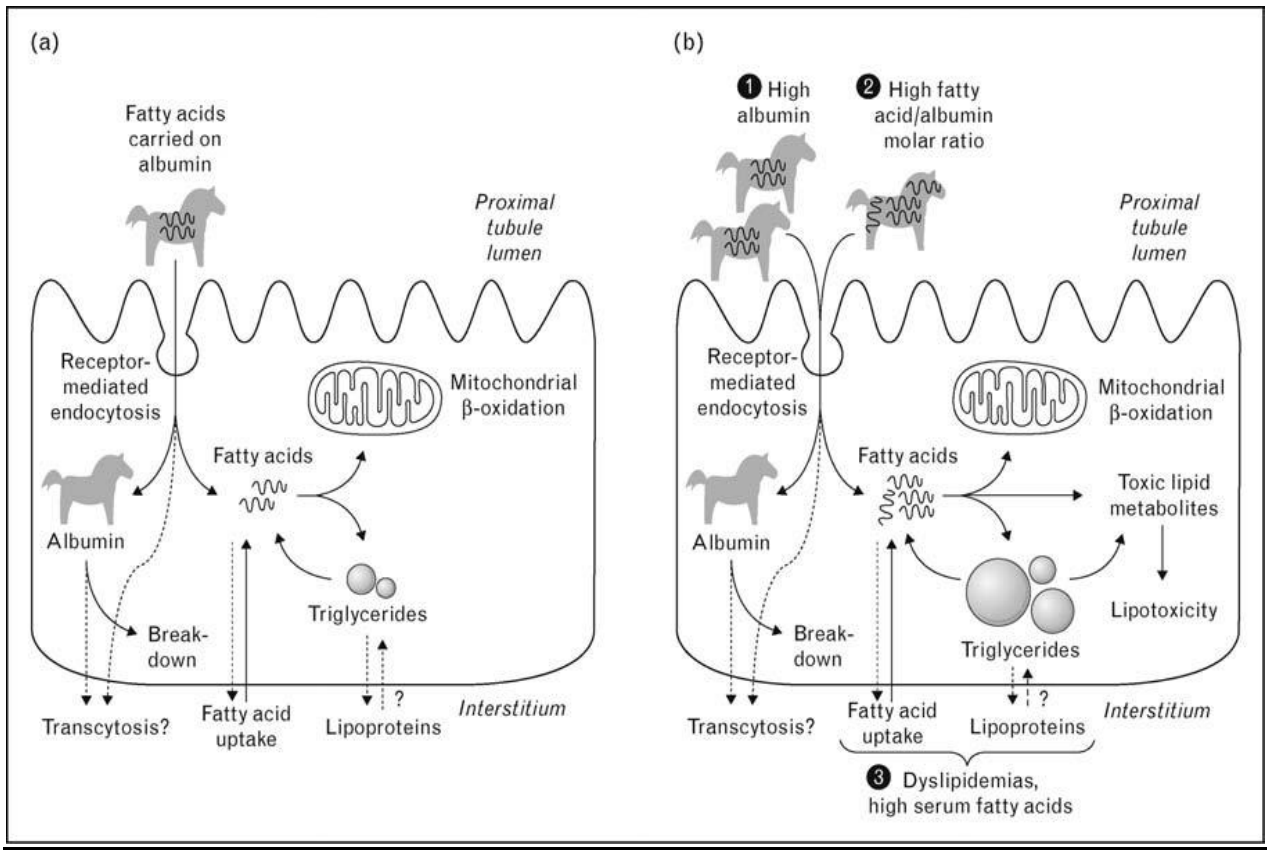
Nos modelos de isquemia renal estão implicados a ativação da fosfolipase A_2 e acúmulo de AGNE, principalmente o ácido oleico, sendo que diferentes tipos celulares têm diferentes suscetibilidades a privação de oferta de oxigênio. Células do túbulo proximal de camundongos são mais sensíveis que as células de cães, provavelmente por composições diversas de AG nas membranas celulares[90,91].

Nos modelos de lesão renal por isquemia, os AG apresentam comportamentos diferentes. O ácido mirístico e palmítico mostram-se protetores da integridade da membrana celular, já os ácidos linoleico e aracdônico possuem um comportamento bifásico, em baixas concentrações são moderadamente protetores e em altas concentrações induzem aumento da lesão celular[92].

Um elegante modelo proposto de lesão renal associado à elevação dos AGNE, está associado a sobrecarga de AG ligados à albumina oferecida às células tubulares. Em condições normais uma pequena fração da albumina ultrapassa a barreira glomerular e atinge o túbulo proximal sendo então reabsorvida pelas células tubulares.

Em situações nas quais ocorre maior oferta de AG, seja devido a uma relação AG/albumina elevada ou à sobrecarga de albumina no túbulo proximal (muito comum nas glomerulopatias), os AG podem ser responsáveis pela geração de lesão tubular renal[93] (Figura 6).

Figura 6 - Modelo proposto de toxicidade renal pelo AGNE



Nota: Sob condições normais (A), AG entram na célula tubular proximal pelo lado basolateral bem como apical carreada pela albumina. A albumina é degradada nos lisossomas. Dependendo da necessidade energética da célula, AG são direcionados para b-oxidação na mitocôndria ou armazenamento como triglicerídeo. (B) Algumas situações podem teoricamente levar ao aumento da oferta do AG no túbulo proximal, como aumento da filtração da albumina ou relação aumentada AGNE/albumina. Nessas condições, pode ocorrer aumento dos AG intracelular excedendo a capacidade b-oxidativa da mitocôndria. Isso leva a acúmulo de TG e geração de metabólitos tóxicos.
Fonte: Bobulescu[93].

1.6 **Lipotoxicidade Aguda**

Os modelos descritos de lipotoxicidade na literatura podem ser divididos em lipotoxicidade aguda e crônica, de acordo com a evolução do quadro clínico e dos efeitos produzidos no organismo.

Um dos modelos estudados de lipotoxicidade aguda refere-se à leptospirose com Síndrome de Weil, na qual os pacientes comumente evoluem com quadro de insuficiência renal e hemorragia pulmonar, com elevado índice de letalidade[94].

Em 1995, Younes-Ibrahim et al.[72] demonstrou que a fração glicoproteica da *Leptospira interrogans* inibe a enzima Na,K-ATPase purificada de cérebro e de rim de ratos. Burth et al.[66] em 1997 mostrou que os AGNE como ácido oleico e palmitoleico presentes nesta fração glicoproteica são os responsáveis pela inibição da atividade da Na,K-ATPase. Os pacientes com leptospirose cursam com elevadas concentrações circulantes de AG não esterificados insaturados (AGNEI), especialmente o ácido oleico, além de uma notável baixa na concentração de albumina do soro, produzindo uma relação molar ácido oleico/albumina aumentada. Após entrarem na corrente sanguínea, as leptospiras têm tropismo preferencial para os rins e fígado, onde ativam a resposta imune e liberam a GLP pela lise bacteriana. O aumento dos níveis de AGNE no sangue (principalmente ácido oleico) suplanta a capacidade molar máxima de ligação da albumina, predispondo a disfunção endotelial e a consequente disfunção orgânica sistêmica na leptospirose grave[67,68].

In vitro, tanto a GLP como o ácido oleico inibem preparações purificadas de Na,K-ATPase, mas esse efeito pode ser revertido pela presença de albumina ou de soro de indivíduos sadios, sugerindo o papel protetor da lipotoxicidade desempenhado pela albumina[66,67].

Martins[95] em 2011 avaliou os AG séricos em pacientes com síndrome de Weil e sugere que a relação molar ácido oleico/albumina é um bom marcador biológico para o prognóstico de mortalidade, com especificidade e sensibilidade elevadas, conforme demonstrou a análise feita por curva ROC. Esses dados sugerem que a manutenção de uma relação molar fisiológica AGNE/albumina possa representar uma nova estratégia terapêutica para os pacientes com leptospirose.

Assim como na Síndrome de Weil, a sepse é caracterizada por infecção grave, que envolve inflamação sistêmica e alterações no metabolismo lipídico, podendo levar a falência orgânica múltipla com elevada morbidade e mortalidade e que também apresenta elevação dos AGNE com potenciais efeitos deletérios ao organismo[96-101].

Alterações metabólicas incluindo a diminuição da oxidação dos AG e suas consequentes elevações no plasma devido ao aumento da lipólise tecidual, especialmente em fígado, coração, rim e músculo esquelético, causam consequências nocivas para o organismo, como ocorre em diversas condições patológicas[98-102].

Os pacientes com sepse costumam evoluir com baixos níveis de albumina, favorecendo assim a elevação dos AGNE livres na corrente sanguínea[32]. Além disso, durante a sepse e endotoxemia, ocorre diminuição da expressão hepática das enzimas metabolizadoras de AG, o que poderia explicar o aumento das concentrações plasmáticas de AGNE nestes pacientes[102].

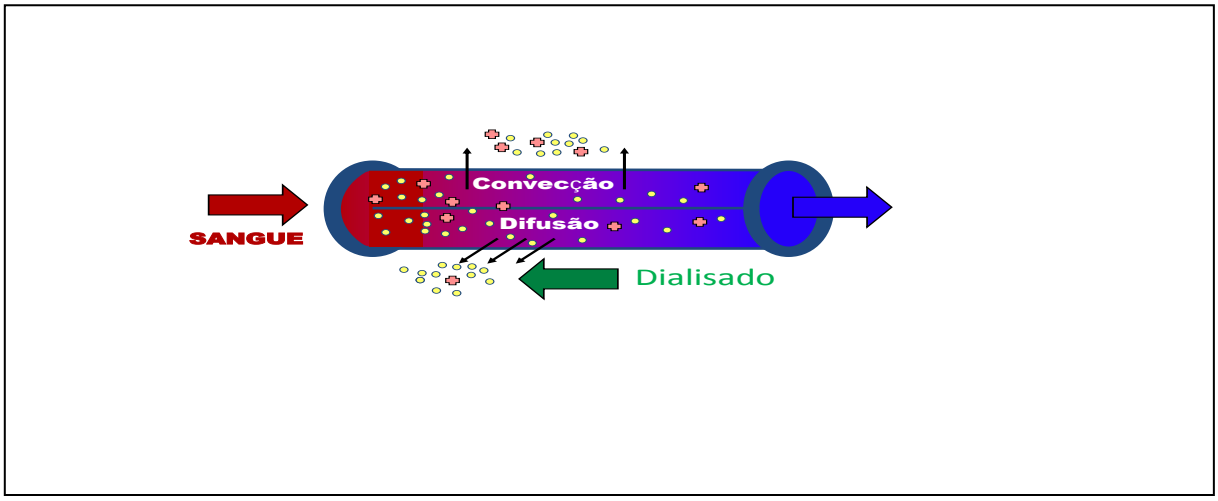
1.7 **Lipotoxicidade Crônica**

Em algumas situações clínicas, os efeitos deletérios dos AGNE podem estar associados às suas alterações crônicas. Um grupo aparentemente vulnerável aos níveis elevados de AGNE são os pacientes com insuficiência renal crônica. Muitos desses pacientes evoluem com necessidade de terapia renal substitutiva (TRS), através da hemodiálise ou diálise peritoneal.

A diálise foi inicialmente descrita em 1914 por Abel[103], em um trabalho experimental de depuração extracorpórea realizado com tubos semipermeáveis e desde então evoluiu com um grande avanço tecnológico. No entanto, as bases para a aplicação do princípio físico-químico da terapia dialítica (hemodiálise) ainda permanecem as mesmas.

A hemodiálise consiste na passagem do sangue por uma membrana semipermeável, envolvida por uma determinada solução de solutos, permitindo que ocorra passagem de substâncias hidrofílicas através dos mecanismos de difusão (livre passagem de solutos através do gradiente) ou convecção (arraste devido a diferença de pressões existentes no meio sanguíneo em relação ao meio do dialisado). Figura 7.

Figura 7 - Esquema representativo de um capilar de hemodiálise



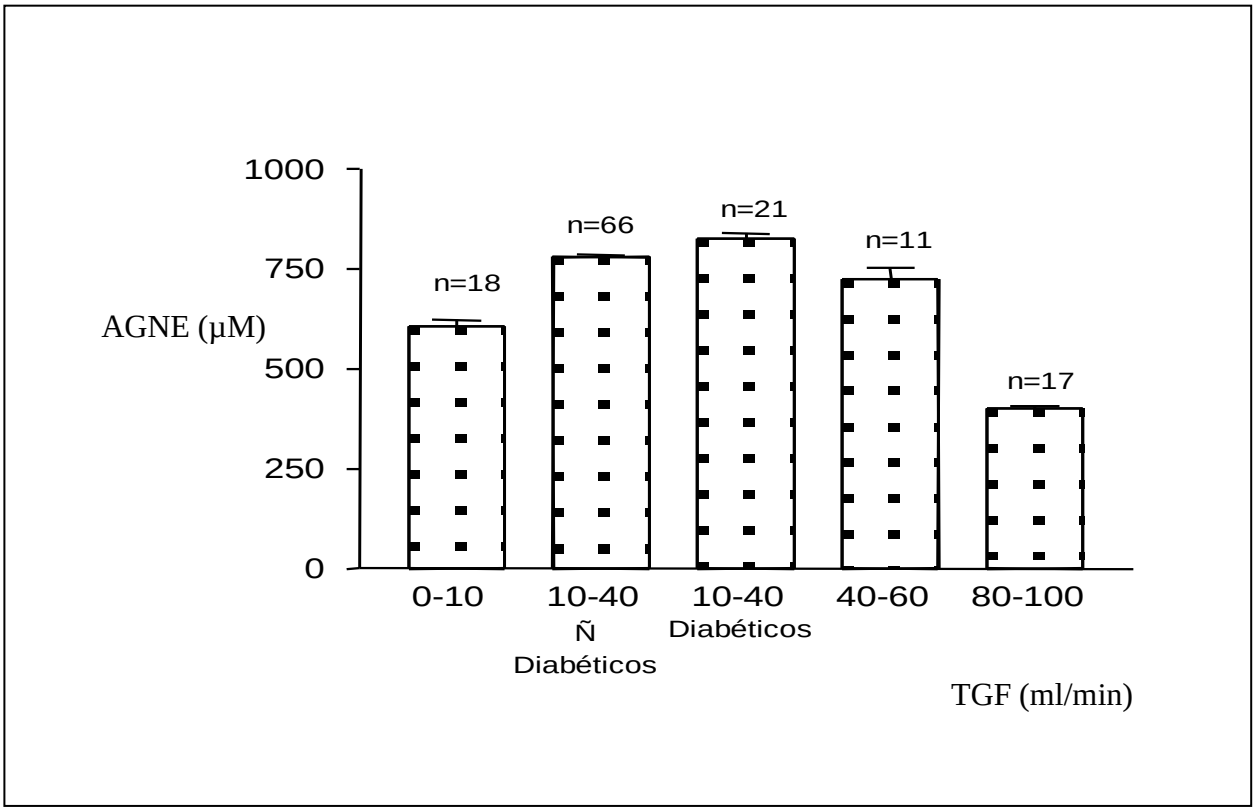
Nota: A figura mostra os mecanismos de difusão e convecção do capilar de terapia dialítica.
Fonte: Skvorecki[33].

O desenvolvimento tecnológico e o melhor entendimento da fisiopatologia da DRC têm contribuído para o aumento na sobrevida dos pacientes. No entanto, alguns aspectos da hemodiálise continuam incompreendidos[104]. De modo geral, os pacientes evoluem com agravamento de doenças vasculares, apesar de todos os cuidados atuais, muitas vezes não associadas à doença de base. A presença de albumina sérica diminuída é comum nesses pacientes e é um forte marcador prognóstico de mortalidade[105]. As causas da hipoalbuminemia não estão totalmente esclarecidas bem como a associação da hipoalbuminemia com as complicações clínicas e ao óbito[104,105].

Em estudo do nosso grupo, realizado por Ferreira[106] em 2003, foram encontradas alterações significativas nos níveis de AGNE em pacientes com DRC, onde os valores circulantes dos AGNE variaram inversamente com a perda da função renal. No entanto, em pacientes com taxa de depuração muito baixa que já estavam em diálise, os níveis séricos dos AGNE eram menores. Nossa pergunta foi se a terapia dialítica poderia estar associada à redução dos AGNE nesses pacientes (Figura 8).

Da mesma forma como a lipotoxicidade aguda, o aumento da relação AGNE/albumina plasmática nos pacientes renais crônicos pode ser um dos fatores que contribuem para a maior mortalidade e o aumento das lesões cardiovasculares encontradas nesses pacientes. O papel da terapia dialítica na depuração dos AGNE ainda é um tema muito pouco estudado na literatura.

Figura 8 - Valores de AGNE séricos de acordo com a função renal



Fonte: Ferreira[106].

2 **OBJETIVOS**

Analisar a biodisponibilidade sérica dos AGNE de cadeia longa em pacientes com insuficiência renal (aguda e crônica) e seu potencial de lipotoxicidade.

Objetivos secundários:

a) estudar o papel da hemodiálise sobre a relação molar AGNE/albumina;

b) desenvolver um método laboratorial rápido que auxilie a determinação dos limites séricos críticos da relação molar AGNE/albumina, que possa ser empregado na prática clínica como um teste funcional para a albumina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Estudo observacional com coorte transversal divididos em 3 grupos: grupo de pacientes com insuficiência renal crônica (DRC); grupo de pacientes com sepse e insuficiência renal aguda (IRA), ambos os grupos de pacientes submetidos a tratamento hemodialítico; grupo de controle com indivíduos sem insuficiência renal. Amostras de soro foram coletadas e avaliadas com resultados laboratoriais obtidos nos momentos pré e pós hemodiálise, em ambos os grupos dialisados, no período compreendido entre julho de 2015 a dezembro de 2016. Realizamos também um estudo *in vitro,* abordando a capacidade de depuração dos AG por dois diferentes tipos de membrana que são empregadas clinicamente para a hemodiálise.

3.2 Local do estudo

A análise laboratorial foi realizada nos Laboratórios de Biologia Celular e Laboratório Integrado de Nefrologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), no Laboratório Enzimologia e Sinalização Celular da Universidade Federal Fluminense (UFF) e Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz.

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) n.14017313.4.0000.5259. Todos os pacientes foram devidamente informados sobre o estudo e a autorização com a assinatura do consentimento por escrito.

3.3 **Características da amostra**

Critério de inclusão: Os pacientes foram divididos em três grupos: O primeiro grupo incluiu pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de DRC, mantidos em terapia renal substitutiva ambulatorial (hemodiálise) há mais de 6 meses; o segundo grupo foi formado por pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de sepse[107] com IRA, submetidos a hemodiálise; e o terceiro, um grupo controle, formado por voluntários sem os critérios bioquímicos clássicos empregados para dislipidemia e/ou insuficiência renal[108-110]. Foram incluídos 20 pacientes com DRC, 20 pacientes com sepse e IRA e 15 controles. Os critérios de exclusão foram pacientes menores de 18 anos e gestantes. As amostras coletadas foram processadas para os exames bioquímicos e as alíquotas de soro congeladas a -70^0 C, com posterior extração e derivatização dos AG.

3.4 **Terapia dialítica - hemodiálise**

A terapia dialítica empregada no estudo foi a hemodiálise (HD), para qual utilizamos máquina Fresenius 4008S® com membranas capilares F8® (Fresenius®) e Polyflux® 210H (Gambro®). De um modo geral, os pacientes com sepse foram preferencialmente submetidos a modalidade de hemodiálise lenta em relação a hemodiálise convencional, com acesso vascular temporário através de cateter venoso central e com tempo de hemodiálise e retirada de volume de ultrafiltração variáveis. Nos pacientes com insuficiência renal crônica, o modo de HD empregado foi a hemodiálise convencional, com duração em torno de 4h. A grande maioria dos pacientes tinha acesso venoso através da fístula arteriovenosa e teve retirada de volume variável, de acordo com as necessidades individuais, em função do ganho de peso interdialítico de cada paciente.

3.5 **Obtenção de soro**

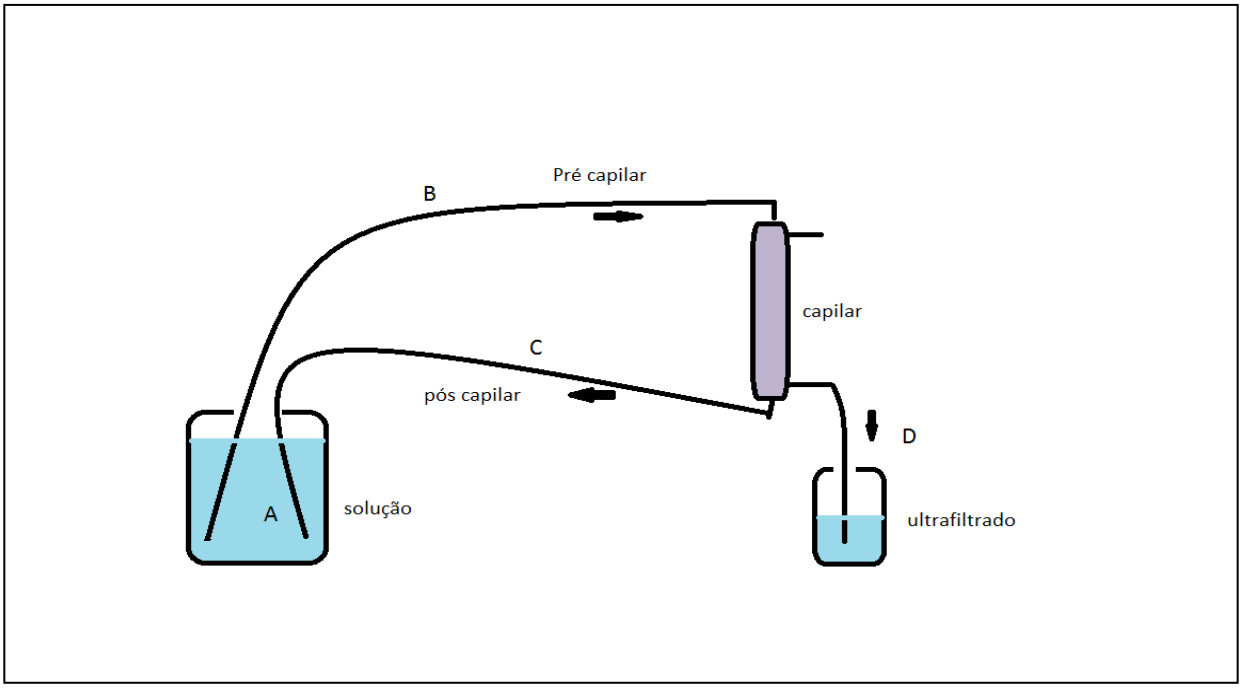
Foram colhidas 2 amostras de aproximadamente 5 ml de sangue de cada paciente, uma no início e outra no final da hemodiálise (exceto no grupo controle). A primeira e a segunda coleta sempre foram feitas pelo mesmo acesso venoso utilizado na hemodiálise. Parte da alíquota foi utilizada para o hemograma. Depois de coaguladas, as amostras foram centrifugadas a 4000 x g, por 15 min a 25ºC e aliquotadas em tubos Eppendorf. Uma alíquota foi retirada para exames bioquímicos tradicionais. As amostras foram armazenadas em freezer a -70°C. Quando transportadas, as amostras foram acondicionadas em gelo seco. Foram avaliados os seguintes ac. graxos: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2), que compõem mais de 90% dos AG totais do soro. Para a avaliação do hemograma e perfil bioquímico sérico (ureia, creatinina, sódio, potássio) foram usados kits comerciais.

3.6 **Estudo experimental *in vitro***

Avaliamos *in vitro* a capacidade de depuração dos AGNE pelas membranas utilizadas para hemodiálise, através de um circuito extracorpóreo, com foco especial na depuração do ácido oleico. Utilizamos máquina Fresenius 4008S® com dois tipos de capilares de alto fluxo FX60® (Fresenius) e Polyflux® 210H (Gambro). Preparamos uma solução padrão de AGNE com ácido oleico 400µM e com albumina humana (Vialebex®) 150,6µM. Preenchemos o circuito extracorpóreo com a solução padrão, que recirculou na membrana capilar num fluxo de 200ml/min, durante 1 hora. Foram coletadas amostras da solução antes do início do experimento (A), no início do experimento, dentro do circuito e imediatamente antes da primeira passagem pelo capilar (B), dentro do circuito e imediatamente após a primeira passagem pós capilar (C) e sequencialmente, dentro do circuito, amostras imediatamente após a passagem no capilar nos tempos 15 (C1), 30

(C2), 45 (C3) e 60 minutos (C4); e amostra coletada do efluente dialisado (D) ao final dos procedimentos. Todas as amostras foram submetidas a extração e derivatização de lipídios para posterior leitura na HPLC, além da dosagem de albumina (Figura 9).

Figura 9 - Esquema representativo da depuração do ácido oleico *in vitro*



Nota: Amostra coletada no início de experimento da solução padrão (A) – AGNE com ac. oleico 400µM e albumina 150,6µM; (B) amostra colhida pré filtro no início da HD; (C1 a C4) amostras no tempo 15, 30, 45 e 60 minutos pós filtro; (D) dialisado. Amostra do dialisado coletada ao final do procedimento.
Fonte: O autor, 2017.

3.7 **Extração de lipídios do soro**

Utilizamos a metodologia descrita por Dole e Meinrtz[111]. Para cada 100 µl de amostra de soro ou de padrões de AG de cadeia longa C:14-C:18 (palmitoleico, oleico, linoleico, palmítico e esteárico) são adicionados 10µl do padrão interno, o ácido margárico, em isopropanol (0,5 mg/ml). Essa mistura é agitada e a ela são adicionados 500µl da mistura isopropanol / n-heptano / ácido fosfórico (40:10:1v/v). Após agitação e 10 min de incubação à temperatura ambiente, acrescentamos 200µl de n-heptano e 300µl

de água destilada, agitando em aparelho vortex e centrifugamos a 500 x g, por 5 min a 25ºC. Retiramos 200 µl da camada superior e o volume foi evaporado em tubos de 1,3 x 10 cm com tampa de rosca em corrente de nitrogênio.

3.8 **Derivatização dos ácidos graxos**

Utilizando a técnica de Püttmann[112] os lipídios extraídos após secagem são adicionados 8µl do reagente catalítico derivatizador (50 mmol/l de brometo de bromofenacil e 5 mmol/l de 18-crown-6 em acetonitrila), 500µl de acetonitrila e aproximadamente 1 mg de $KHCO_3$. São inseridas barras magnéticas e realizada a selagem dos tubos com tampas de teflon. Os tubos são mantidos sob agitação durante 45 min a 85ºC. Os tubos são pesados antes e depois desse período de agitação para que sejam verificadas eventuais perdas de volume. Em casos de perda por evaporação a amostra é descartada. Após agitação, a barra magnética é retirada e a mistura derivatizada é centrifugada a 15.000 x g, por 20 min a 25ºC. O sobrenadante é diretamente usado para aplicação na coluna de cromatografia líquida de alta performance (HPLC)[113].

3.9 **Separação dos ácidos graxos não esterificados por HPLC**

A cromatografia líquida de alta performance é feita com aparelho Varian munido de coluna de fase reversa para separação de AG (Fatty Acid Column, Waters®, 3,9x150mm) e detector de UV. Na coluna são aplicados 40µl dos extratos de AG derivatizados, sendo que a fase móvel é constituída de um gradiente linear de acetonitrila em água (65% de acetonitrila) e o fluxo 1ml/min. O eluato é monitorado a 254nm. O tempo

de corrida é de 30 min. Os resultados são computados e analisados pelo programa Varian Prostar 3.0.

3.10 **Focalização isoelétrica**

O método de focalização isoelétrica (FI) foi escolhido para este estudo pelo fato das moléculas de albumina, na dependência da quantidade de AG ligados, adquirirem uma nova carga elétrica efetiva (carga final dos AG com a proteína) bem como uma nova conformação descrito por Basu et al.[114]. Desta forma, dependendo da sua saturação com AG, a albumina adquire novos pontos isoelétricos que podem ser analisados pela FI.

No método da FI, para o preparo do gel são utilizados 2,0ml de poliacrilamina 7% (bisacrilamina + acrilamida); 3,0µl de TEMED (N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina); 2,0ml de água destilada; 4,0ml de persulfato de amônio 0,14%; 0,2ml de anfólito (Ampholyte High Resolution pH 4-6/Sigma).

Utilizamos duas soluções tampões: um tampão do catodo com trietanolamina (TEA) 0,4% e um tampão anodo com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,2%.

Depois de polimerizado, o gel é colocado na cuba eletroforética sem as amostras e submetido a corrente elétrica de 200V, amperagem 1,5mA (fonte Incibrás®) durante 30 minutos, para a formação do gradiente de pH no gel. A seguir, as amostras de soro dos pacientes e dos controles são colocadas em seus respectivos poços. Alguns poços ficaram sem amostras para que seja determinado o pH do gel e para que o gradiente do pH seja traçado.

Uma segunda corrida com as amostras com duração de 240 minutos, em uma voltagem de aproximadamente 300V e 1,5mA. A parte do gel sem amostras de soro é cortada em 12 pedaços de 0,5cm, colocados em tubos de vidro, sendo acrescentado 2ml de água destilada e armazenados a 4ºC para posterior avaliação do pH.

Após a corrida, as amostras são coradas com o reativo verde de bromocresol[115]. O gel é mantido com o corante por aproximadamente 1 hora. A seguir, o gel fotografado é utilizado para análise de pH e para a avaliação da densidade das amostras pelo

programa *ImageJ* versão 1.36 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

3.11 **Dosagem de albumina**

Para a dosagem de albumina utilizamos o reativo verde de bromocresol, conforme o método descrito por Doumas et al.[115]. Para tanto são preparadas soluções estoque de tampão succinato 0,10M, pH 4,0 ajustado com NaOH, verde bromocresol 0,6mM com 10% do volume final em NaOH 0,1N e Brij-35 a 30%. A solução de trabalho é a mistura destas três soluções na proporção de 30: 10: 0,16 (v/v). São feitas soluções padrão de albumina bovina (Sigma) de 2,0; 2,5; 4,0; 5,0 e 6,0 g/dl. A dosagem é feita adicionando-se 1ml de solução de trabalho a 5µl de soro ou de solução padrão. Após 10 minutos em temperatura ambiente é feita a leitura a 268nm em espectrofotômetro.

3.12 **Albumina deslipidada**

Albumina humana (solução comercial 20%, Immuno®) foi deslipidada, conforme descrito por Chen[116]. A albumina deslipidada foi concentrada por centrifugação em ultrafiltros (Amicon® cutoff de 10 kDa; Centriprep 10). A concentração somada dos AGNE nesta albumina comercial foi determinada por HPLC, como descrito acima. A proporção molar calculada de AGNE/albumina da albumina humana original foi de 0,57; diminuiu para <0,1 após a deslipidação.

3.13 **Cálculo da relação molar ácido oleico/albumina**

O cálculo da relação molar ácido oleico albumina foi realizado através da razão entre as concentrações séricas de ácido oleico (em μM) e de albumina sérica (em μM) de uma mesma amostra.

3.14 **Análise estatística**

Os resultados foram apresentados sob a forma de média e erro ou desvio padrão para as variáveis quantitativas.. Quando comparados dois grupos, o teste aplicado foi o teste T Student. Para comparação entre variáveis quantitativas foram utilizados os testes Anova, Mann Whitney, Wilcoxon e regressão linear. O nível de rejeição da hipótese nula foi fixado em 5%. O programa utilizado para a análise estatística e a confecção dos gráficos foi o Graph Pad Prism 5.1 (Graph Pad Software Inc) e o Excel.

4 **RESULTADOS**

4.1 **Características dos grupos avaliados**

No quadro 3, descrevemos algumas características presentes nos 3 grupos: o grupo controle, o grupo com pacientes com sepse e injúria renal aguda e o grupo com insuficiência renal crônica, ambos em hemodiálise.

Quadro 3 - Características dos pacientes do estudo

	Controle (A)	IRA+Sepse (B)	DRC (C)	P
Número de pacientes	15	20	20	
Idade	60,4±20,3	56,6±16,9	56,6±18,1	NS
Sexo (m/f)	10/5	13/7	8/12	p<0,05 CxA,B
Brancos/ Não Brancos	6/9	10/10	9/11	
Albumina (µM)	647,6±126,5	319,3±113	442,8±137	p<0,05AxB,C
Creatinina (mg/dl)	0,68±0,36	3,46±0,35	7,03±0,73	p<0,01AxB,C
Triglicerídeos (mg/dl)	182±57	317±180	285±184	p<0,05 AxB,C
Colesterol (mg/dl)	172±38	184±34	188±39	NS
Hemoglobina (g/dl)	12,2±0,1	8,3±0,5	9,4±0,8	p<0,05 AxB,C

Nota: valores espressos em média±sd (valores de p – Anova).
Fonte: O autor, 2017.

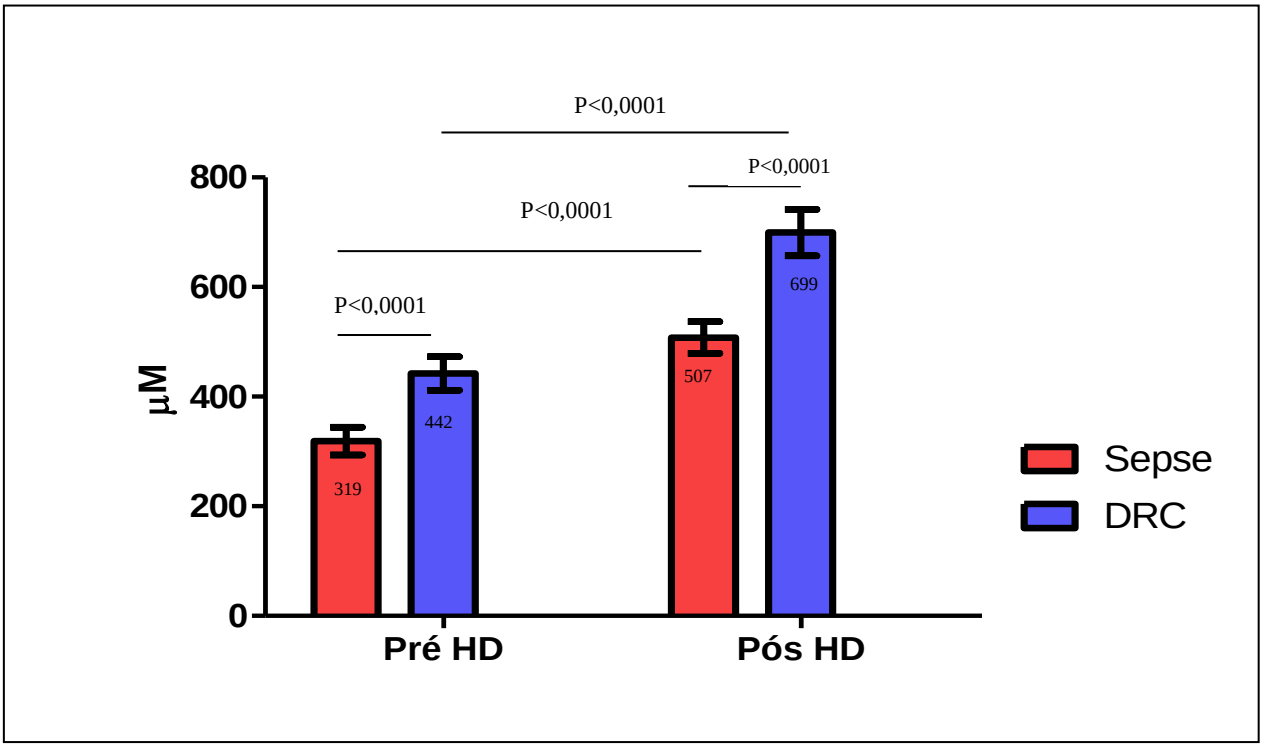
Os pacientes com sepse apresentaram como foco de infecção primária mais prevalente o pulmão (50%), abdominal (30%), leptospirose (15%), urinário, cutâneo e associado a cateter (5%).

Entre os pacientes estudados, 30 eram hipertensos sendo 14 no grupo DRC, 8 no grupo sepse e 8 no grupo controle. O maior número de diabéticos foi encontrado no grupo DRC (11) a seguir grupo controle (6) e sepse (4). No grupo DRC 4 pacientes

apresentavam cardiopatias, 3 no grupo sepse e 1 no grupo controle. No grupo sepse 5 pacientes tinham DPOC previamente diagnosticada. Por fim, no grupo DRC 4 pacientes tinham diagnóstico de glomerulopatias e 2 com doença renal policística.

Na terapia dialítica, o emprego de ultrafiltração pode acarretar variação do volume circulante efetivo durante e após a hemodiálise. No intuito de ajustar as concentrações bioquímicas para as diferenças no volume intravascular efetivo, utilizamos a albumina sérica como marcador intrínseco de cada amostra, considerando que a membrana dialítica não é permeável à proteína. A variação das concentrações de albumina sérica pré e pós HD nos pacientes dos grupos sepse (319±25 e 507±29µM) e DRC (442±30 e 699±42µM) estão representadas na Figura 10 (p<0,0001 – Anova).

Figura 10 - Variações da albumina sérica nos grupos sepse e DRC

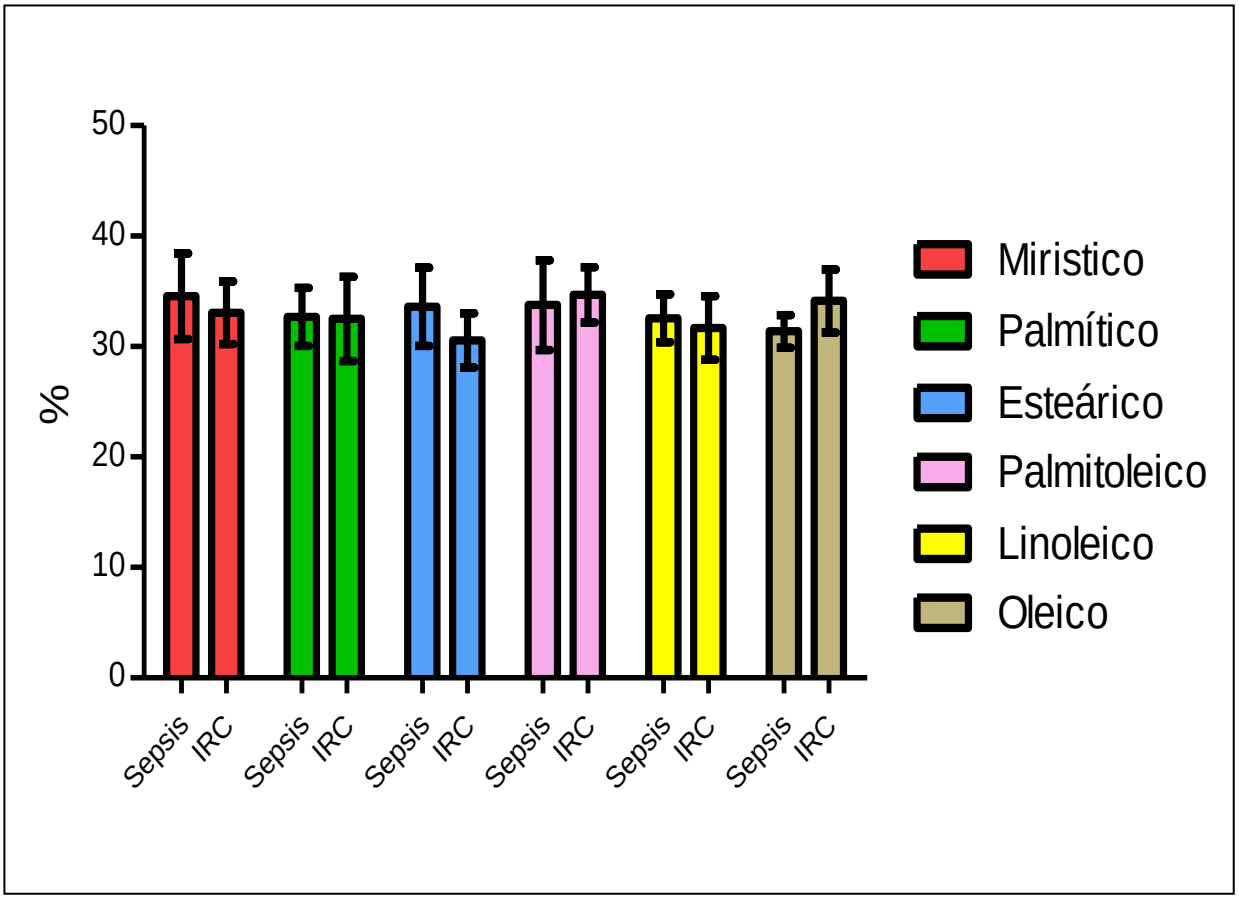


Nota: Valores espressos em média±SE.
Fonte: O autor, 2017.

4.2 **Avaliação dos AGNE pré e pós HD**

A avaliação do efeito da terapia dialítica nos grupos sepse e DRC mostrou uma queda expressiva dos AGNE totais nas amostras de soro coletadas após HD. As médias dos percentuais de variação dos diversos AG do grupo sepse e IRC respectivamente foram: mirístico 34,5±3,8 e 33±2,8; palmítico 32,6±2,6 e 32,5±3,8; esteárico 33,6,±3,7 e 32±2,8; palmitoleico 33,7±2 e 34,6±2,8; linoleico 32,5±2,5 e 31,6±3,5; oleico 31,3±2 e 34,1±2,8. (p>0,05). Portanto, não houve diferenças significativas entre a depuração das diferentes frações de AGNE, como mostra o perfil de redução os ac. graxos estudados em ambos os grupos na Figura 11.

Figura 11 – Redução das frações dos AGNE nos grupos sepse e DRC na hemodiálise

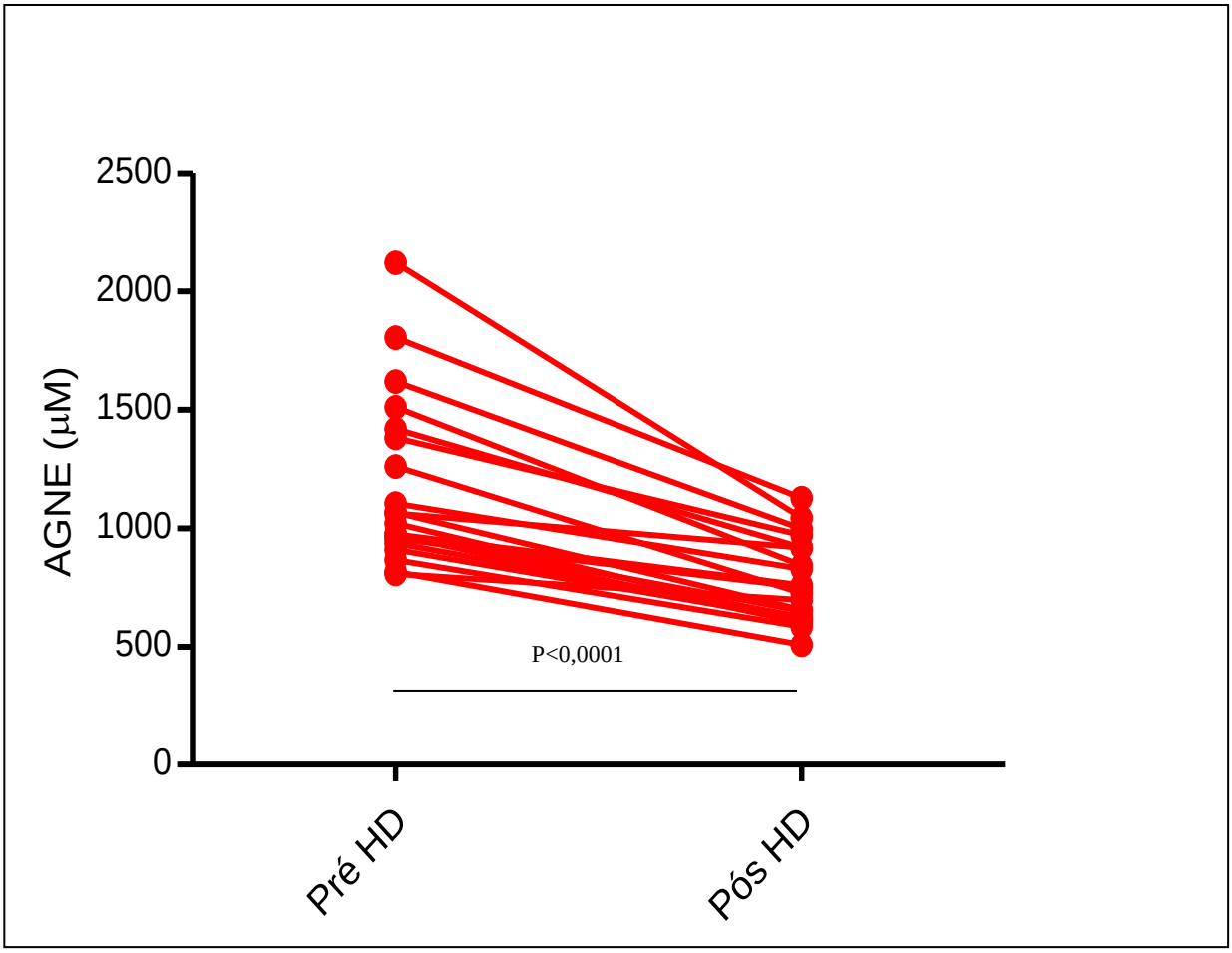


Nota: Valores em percentual com 40 pacientes e valores expressos em média±SE.
Fonte: O autor, 2017.

4.3 **Avaliação dos AGNE no grupo sepse com IRA**

Ao avaliarmos as concentrações séricas dos AGNE no grupo sepse com IRA, observamos a média dos valores absolutos de AGNE total muito elevada, com concentrações variadas entre os pacientes no momento pré-dialítico, média de 1179±79 (µM). Após a HD verificamos redução nas concentrações totais dos AGNE séricos de todos os pacientes, com uma média de 771±39 (µM), revelando uma expressiva significância estatística p<0,0001 (Wilcoxon test). Figura 12.

Figura 12 - Concentrações séricas dos AGNE pré e pós HD no grupo sepse com IRA

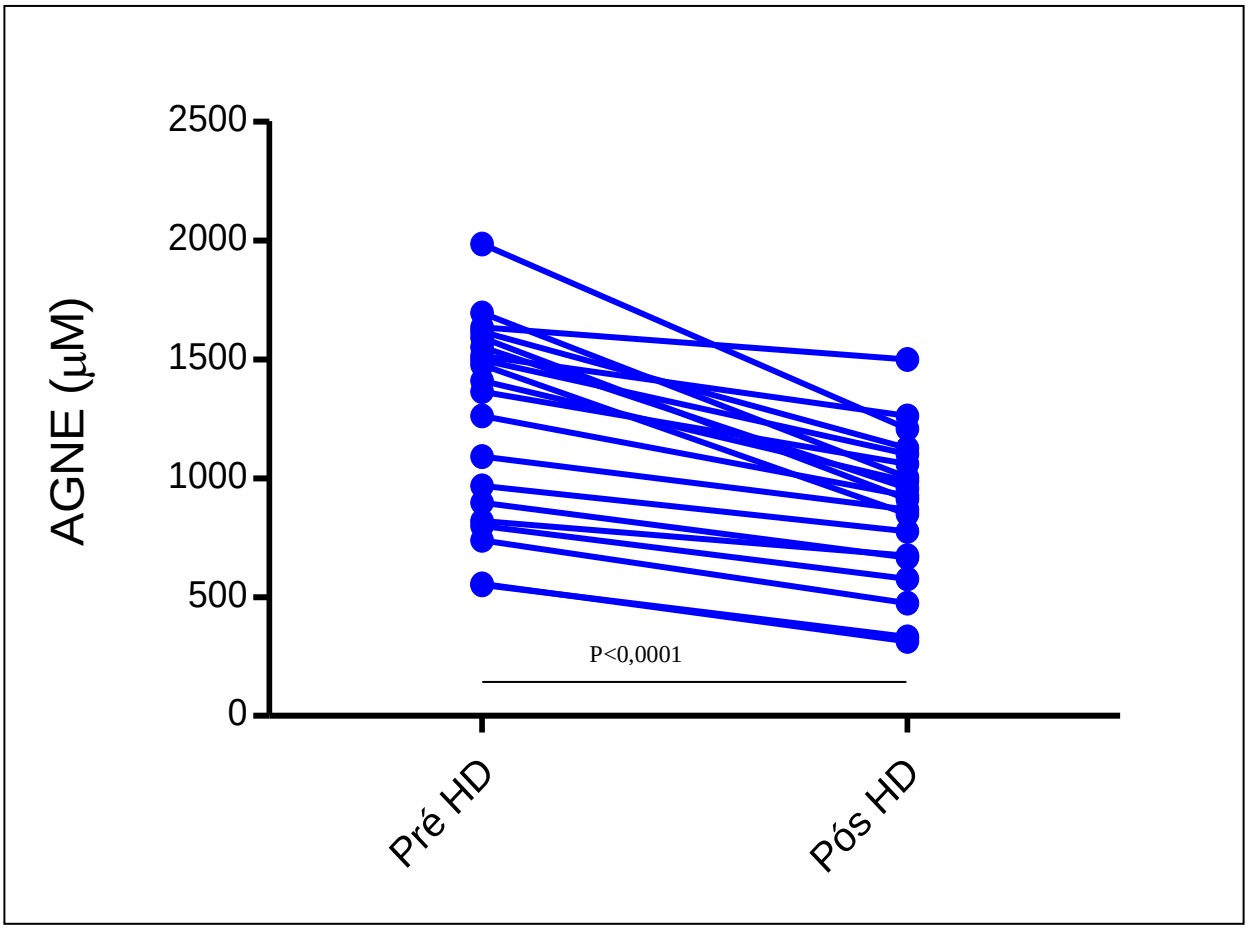


Nota: Valores séricos em µM, com 20 pacientes.
Fonte: O autor, 2017.

4.4 **Avaliação dos AGNE no grupo DRC**

Da mesma forma que os pacientes do grupo sepse com IRA, os pacientes do grupo DRC apresentaram valores elevados na concentração de AGNE séricos pré HD (1250±93 (µM)) e uma redução significativa após HD (878±68 (µM)) com p<0,0001 (Wilcoxon test). Figura 13.

Figura 13 - Concentrações séricas dos AGNE pré e pós HD no grupo DRC

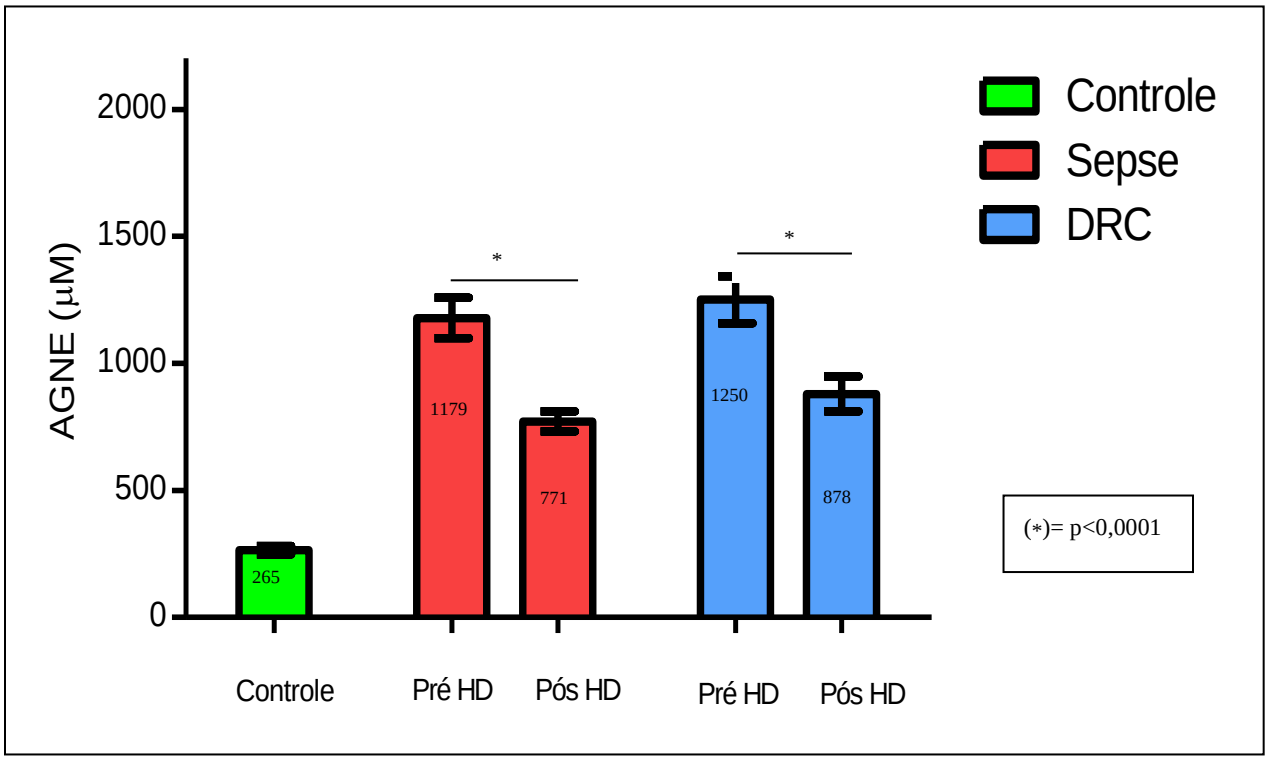


Nota: Valores expressos em µM, com 20 pacientes.
Fonte: O autor, 2017.

4.5 **Avaliação dos AGNE nos grupos sepse com IRA, DRC e controle**

Os pacientes dos grupos sepse com IRA e DRC apresentam valores de AGNE muito elevados pré HD com médias em µM de 1179±79 e 1250±93 respectivamente, quando comparados ao grupo controle (265±16). Após a realização de HD observamos queda significativa de AGNE (771±39 e 878±68 respectivamente), mas com valores ainda distantes dos verificados no grupo controle. Observamos diferenças significativas (p<0,0001) nos grupos sepse e DRC (pré e pós HD – Wilcoxon test) e em relação ao grupo controle (Anova). Não houve diferenças significativas quando comparamos a média dos AGNE séricos coletados pré HD entre os pacientes dos grupos sepse e DRC (p=0,57), bem como entre as amostras destes grupos coletadas após a HD (p=0,32). Figura 14.

Figura 14 - Concentrações séricas dos AGNE nos grupos sepse com IRA, DRC e controle

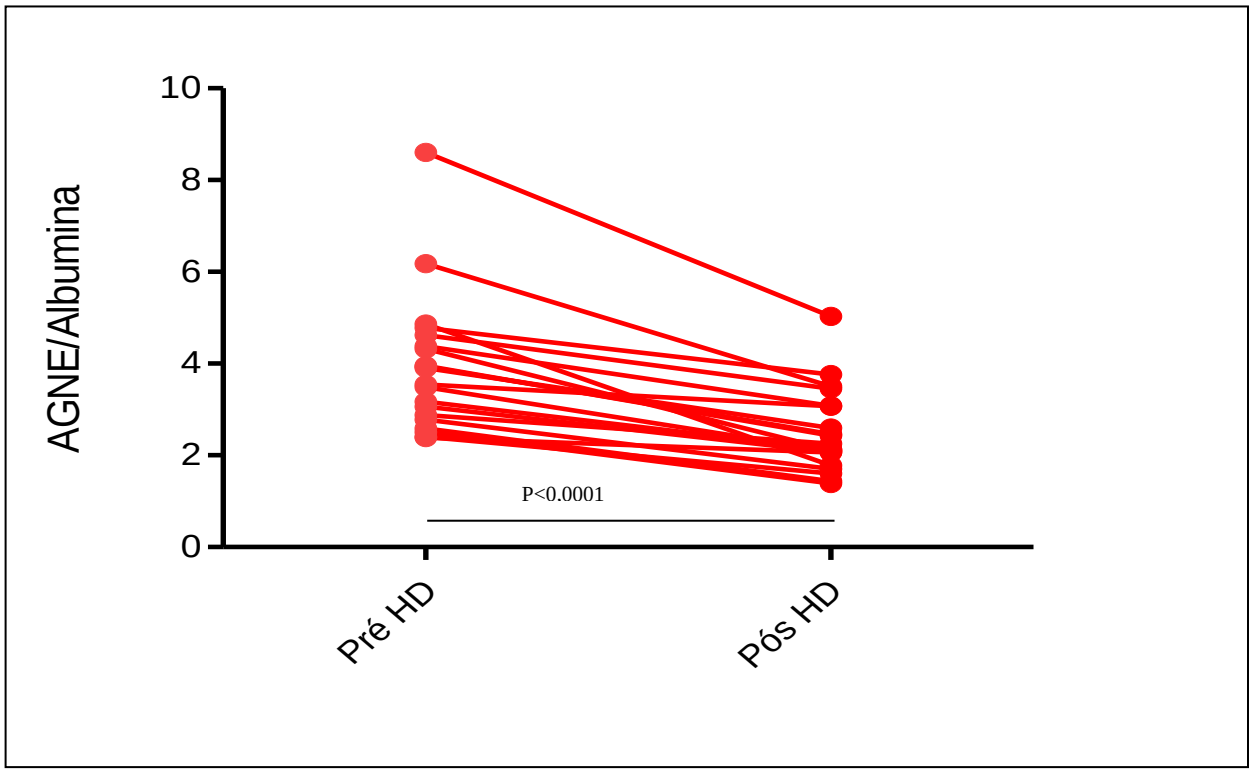


Nota: Valores séricos em µM, com valores expressos em média±SE. (*)=p<0,0001.
Fonte: O autor, 2017.

4.6 **Avaliação da relação AGNE/albumina no grupo sepse com IRA**

A elevada concentração de AGNE no sangue pode não exercer efeitos deletérios sistêmicos desde que os níveis séricos de albumina consigam adsorver os AGNE presentes na circulação sanguínea. No entanto, como demonstrado na tabela 3, os níveis séricos de albumina nos pacientes sépticos com IRA e DRC estão reduzidos, o que pode potencialmente contribuir ainda mais para os efeitos deletérios dos AGNE. Neste sentido avaliamos a relação AGNE/albumina nos paciente com sepse e constatamos uma média da relação AGNE/albumina elevada, nas amostras pré HD (3,9±0,3). Com o tratamento dialítico, observamos a redução significativa (2,5±0,2), com p<0,001 (Wilcoxon test), da relação AGNE/albumina em todos os pacientes sépticos com IRA. Figura 15.

Figura 15 - Relações séricas AGNE/albumina pré e pós HD em pacientes com sepse-IRA

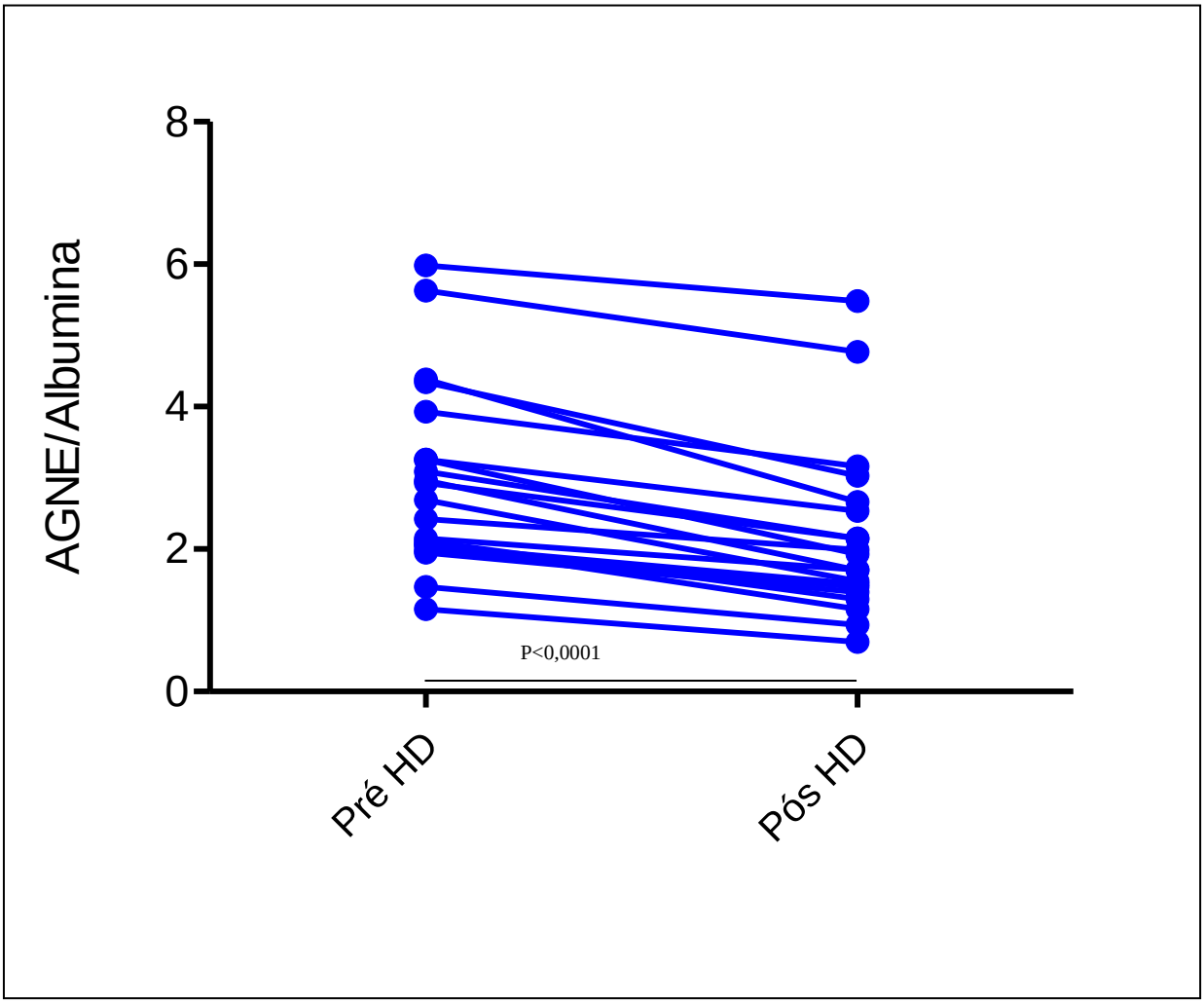


Nota: Valores expressos através da relação AGNE/albumina, número de pacientes igual a 20.
Fonte: O autor, 2017.

4.7 **Avaliação da relação AGNE/albumina no grupo DRC**

Assim como verificado nos pacientes do grupo sepse com IRA, os pacientes do grupo DRC apresentam valores médios elevados da relação AGNE/albumina pré HD (2,9±0,3) e uma redução significativa com p<0,001 (Wilcoxon test) dos valores AGNE/albumina pós HD (2,1±0,2). Figura 16.

Figura 16 - Relações séricas AGNE/albumina pré e pós HD em pacientes DRC

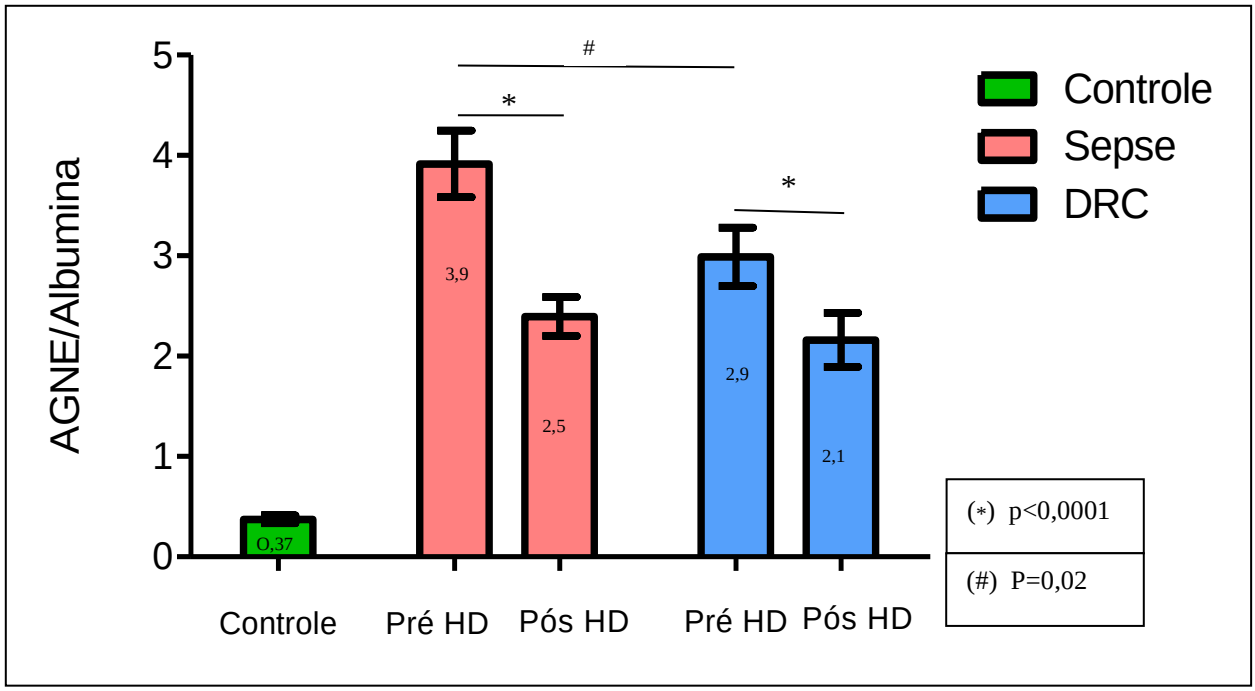


Nota: Valores expressos através da relação AGNE/albumina, número de pacientes igual a 20.
Fonte: O autor, 2017.

4.8 **Avaliação das relações AGNE/albumina pré e pós HD dos grupos sepse com IRA e DRC em relação ao grupo controle**

Pacientes dos dois grupos, sepse com IRA e DRC, apresentam relações séricas AGNE/albumina muito elevadas pré HD (3,9±0,3 e 2,9±0,3 respectivamente), em decorrência tanto dos valores elevados de AGNE circulantes como das baixas concentrações de albumina. No momento pós HD ocorreu uma redução significativa das relações AGNE/albumina em ambos os grupos (médias 2,5±0,2 e 2,1±0,2 respectivamente- p<0,0001 pelo Wilcoxon test), mas com valores ainda distante das relações presentes no grupo controle (0,37±0,1) e também quando comparamos os grupos sepse e DRC em relação ao grupo controle (p<0,0001 - Anova). Nas amostras coletadas pré hemodiálise, as relações AGNE/albumina foram significativamente maiores no grupo de pacientes com sepse e IRA em relação ao grupo DRC (p<0,02 - Anova). Figura 17.

Figura 17 - Relações séricas AGNE/albumina pré e pós HD nos pacientes com sepse e IRA, DRC e grupo controle

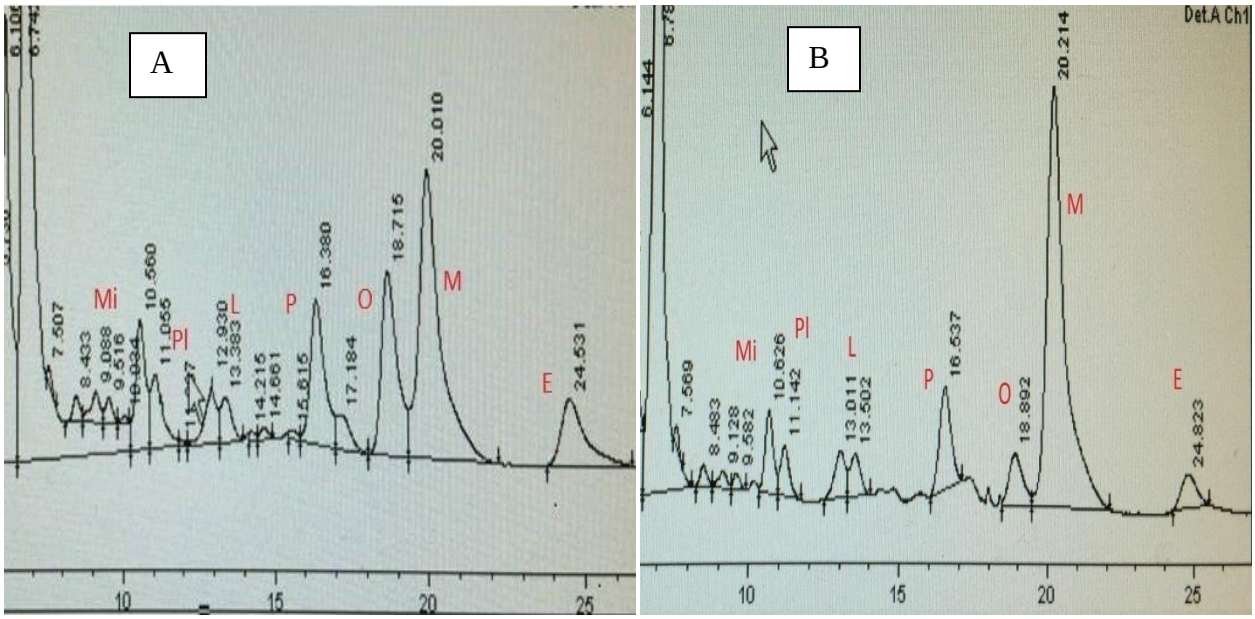


Nota: Valores da relação AGNE/albumina expressos em média±SE.
Fonte: O autor, 2017.

4.9 **Avaliação experimental da depuração de AGNE *in vitro***

Avaliamos a depuração dos AGNE *in vitro* utilizando capilares de alto fluxo FX60® (Fresenius) e Polyflux® 210H (Gambro). Através de uma solução padrão preparada contendo albumina humana comercial (Vialebex®) em concentração de 150μM e ácido oleico a 400μM, avaliamos a efetiva depuração dos AGNE pelos capilares. No efluente dialisado, ao final de 1 hora de experimento, observamos a presença de ácidos graxos em concentrações menores do que aquelas presentes na solução padrão. O ac. margárico foi introduzido posteriormente para ser usado como marcador. Figura 18.

Figura 18 - Esquema representativo das curvas dos ácidos graxos na HPLC

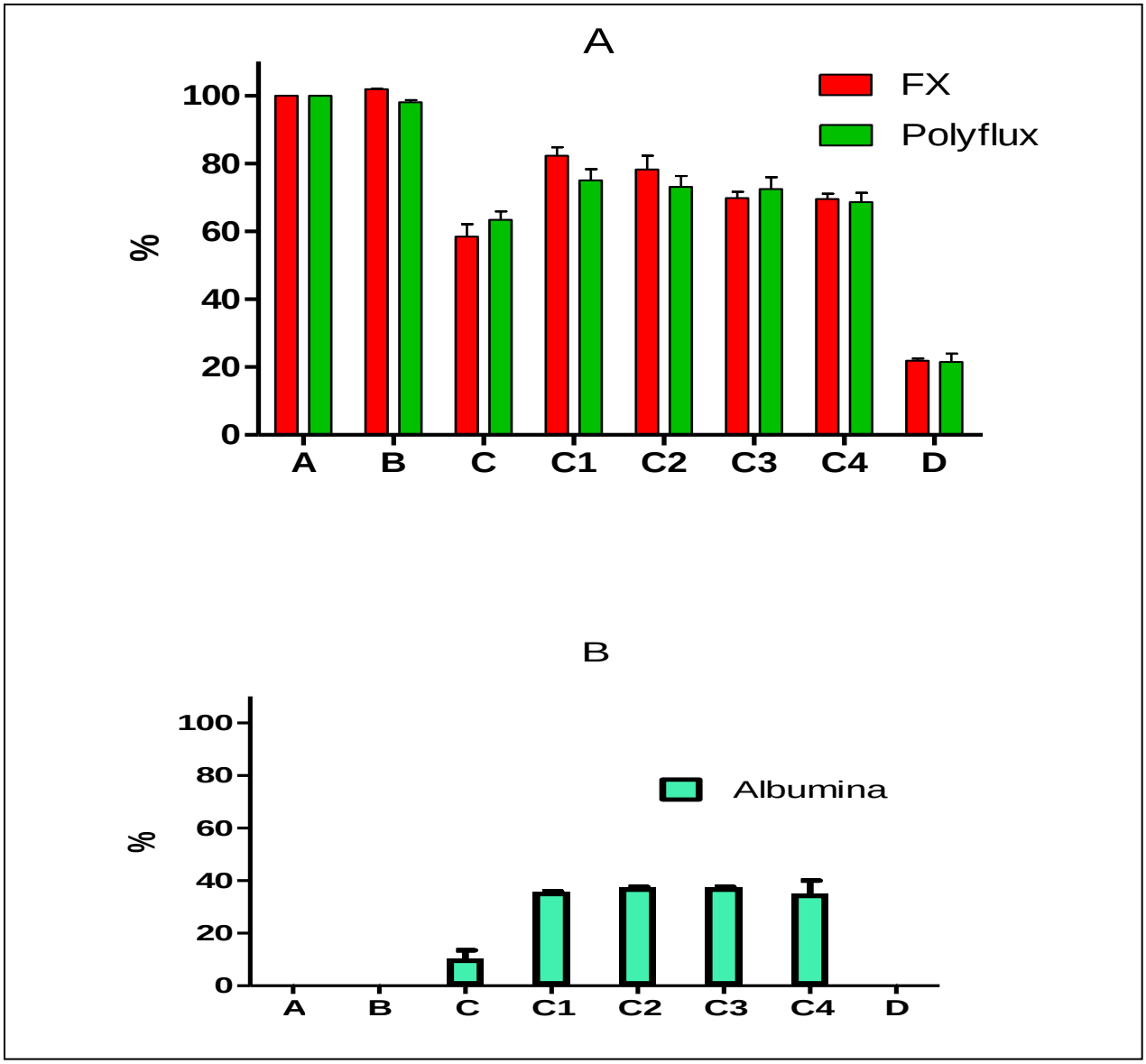


Nota: Ácidos graxos na solução padrão (A) e do efluente dialisado (B),
Legenda: E=ac.esteárico; M=ac.margárico; O=ac.oleico; P=ac.palmítico; L=ac.linoleico; Pl=ac.palmitoleico; Mi=ac.mirístico
Fonte: O autor, 2017.

No período de 1 hora, a passagem dos AGNE pela membrana dialítica promoveu a queda progressiva dos AGNE nas amostras sequenciais colhidas pós filtro, além da detecção da presença de AGNE no efluente dialisado. Observamos também o aumento da concentração da albumina na solução padrão, decorrente da perda do volume para o banho dialisado (Figura 19). Nos experimentos, não houve diferença significativa nas

taxas de depuração apresentadas entre os dois tipos de filtros estudados, bem como não encontramos diferenças entre os perfis de redução dos vários AGNE por ambas as membranas.

Figura 19 - Avaliação *in vitro* da depuração dos AGNE



Nota: As amostras do gráfico A tanto do capilar FX como Polyflux foram comparadas em relação a solução padrão (em percentual). O gráfico B mostra a elevação da concentração da albumina (em percentual) em relação à solução padrão.

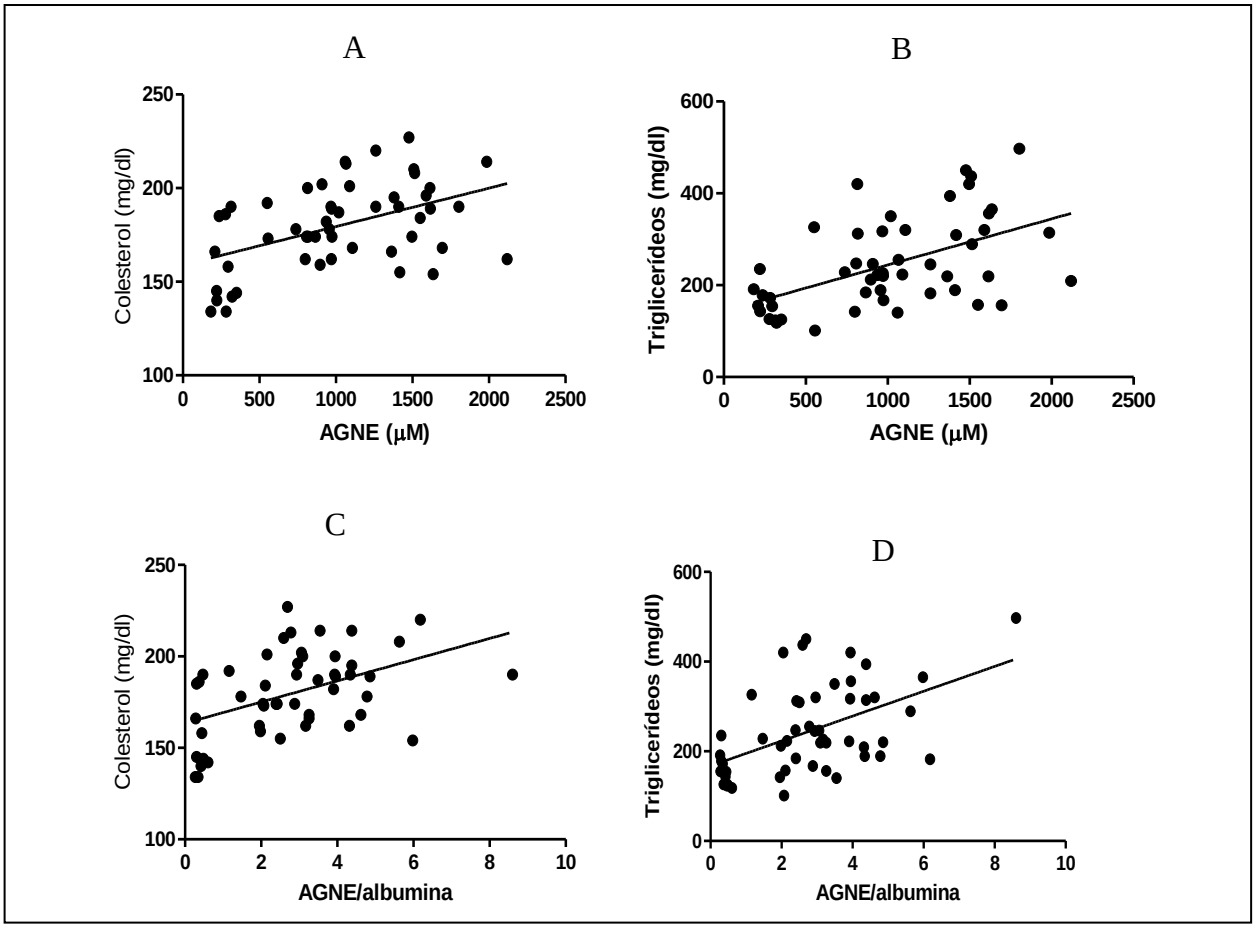
Legenda: (A) solução padrão; (B) amostras pré filtro no início da HD; (C a C4) amostras no tempo 0, 15, 30, 45 e 60 minutos pós filtro; (D) dialisado.

Fonte: O autor, 2017.

4.10 **Avaliação das correlações entre colesterol e triglicerídeos com os AGNE e AGNE/albumina**

Com base nos valores circulantes dos AGNE pré HD, avaliamos as curvas das correlações entre o colesterol e os AGNE e entre os triglicerídeos e os AGNE. Também, correlacionamos o colesterol e os triglicerídeos com as respectivas relações molares AGNE/albumina. Observamos uma fraca correlação pela regressão linear entre estes dois componentes lipídicos com r^2= 0,22, 0,28 (AGNE) e r^2=0,21 e 0,25 (AGNE/albumina) respectivamente, representadas nas Figura 20A, B, C e D.

Figura 20 – Correlação entre colesterol e triglicerídeos com as concentrações dos AGNE e a relação molar AGNE/albumina

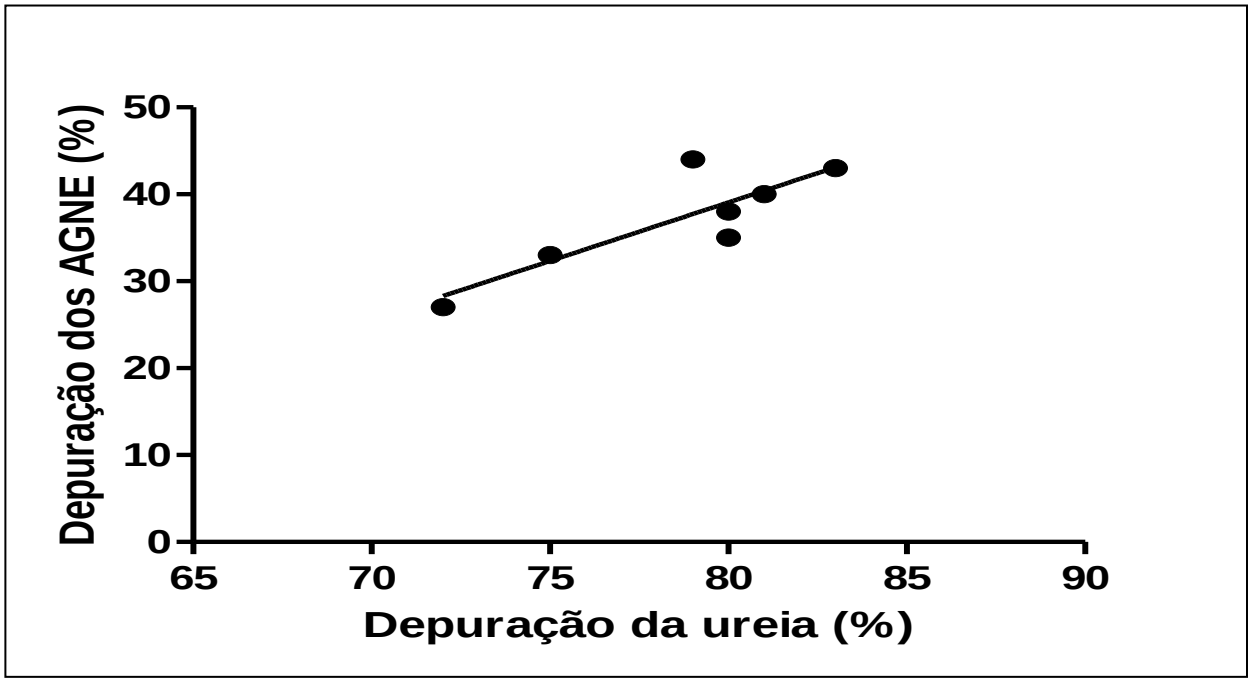


Nota: Valores de colesterol (gráficos A e C) e triglicerídeos (gráficos B e D) correlacionados com as respectivas concentrações circulantes dos AGNE e a relação molar AGNE/albumina.
Fonte: O autor, 2017.

4.11 **Avaliação das taxas de redução da ureia e dos AGNE pela hemodiálise**

Um dos métodos clássicos utilizados para quantificação e avaliação da adequação da hemodiálise é baseado no cálculo da taxa de redução da ureia (URR), proposta por Lowrie&Lew[117]. A eficiência da hemodiálise é considerada satisfatória quando a Taxa de Redução de Ureia fica acima de 65%. Para determinar a influência da qualidade da hemodiálise na depuração dos AGNE, utilizamos pacientes do grupo DRC no nosso estudo, comparando o percentual de redução da ureia pré/pós HD com os respectivos percentuais de redução dos AGNE. Com base nestes parâmetros constatamos que os pacientes receberam doses adequadas de hemodiálise e, através da regressão linear, encontramos uma boa correlação positiva com r^2=0,72 entre estas duas variáveis. Verificamos que a qualidade da hemodiálise influencia a taxa de redução dos AGNE, que correspondeu em média a 34,6±6% (média±SD) da taxa de redução de ureia. Figura 21.

Figura 21 - Depuração da ureia e AGNE em pacientes do grupo DRC

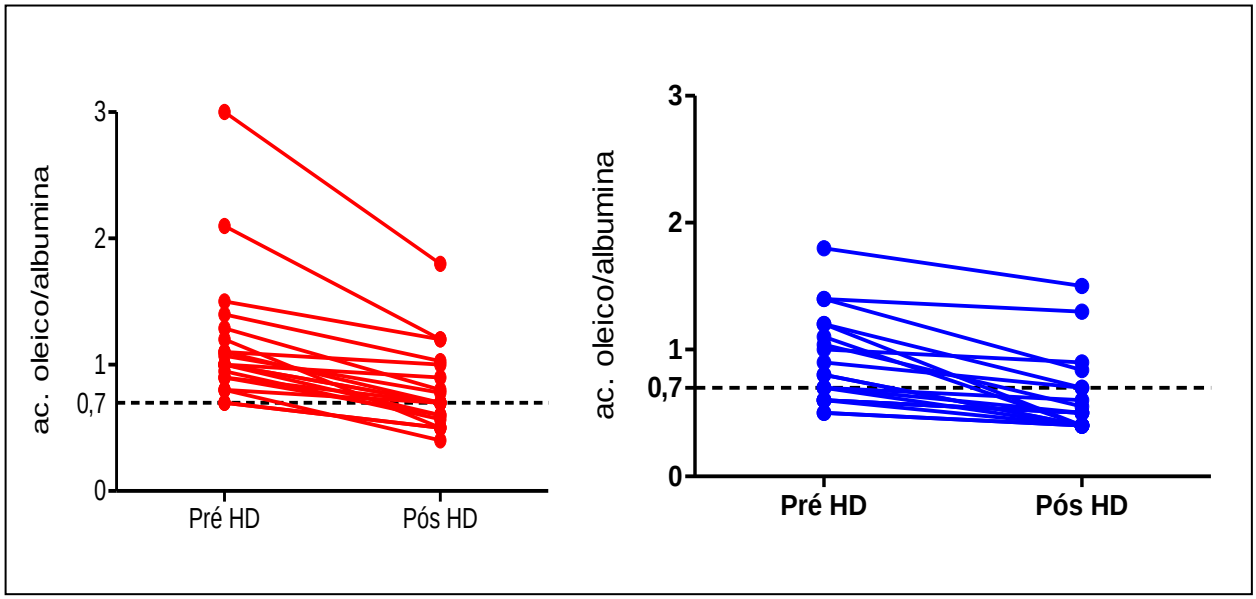


Nota: Valores de depuração dos AGNE e da ureia em percentual.
Fonte: O autor, 2017.

4.12 **Avaliação da relação molar ac. oleico/albumina nos grupos sepse com IRA e DRC**

A determinação de níveis séricos com potencial de lipotoxicidade é importante para execução de terapias que possam reduzir a relação molar AGNE/albumina. Dessa forma procuramos avaliar o potencial de lipotoxicidade dos pacientes dos grupos sepse com IRA e DRC do estudo determinando a relação molar ac. oléico/albumina de acordo com o estudo de Martins[97] que demonstrou aumento da mortalidade com relação molar ac. oléico/albumina >0,7 nos pacientes com leptospirose e síndrome de Weil. Encontramos valores elevados da relação molar ac. oléico/albumina em ambos os grupos pré HD com redução significativa no pós HD (p<0,0001 – Wilcoxon test) sendo que várias amostras apresentaram valores menores que 0,7 no pós HD principalmente no grupo DRC. Figura 22.

Figura 22 - Relação molar ac. oleico/albumina pré e pós HD nos pacientes sepse com IRA e DRC

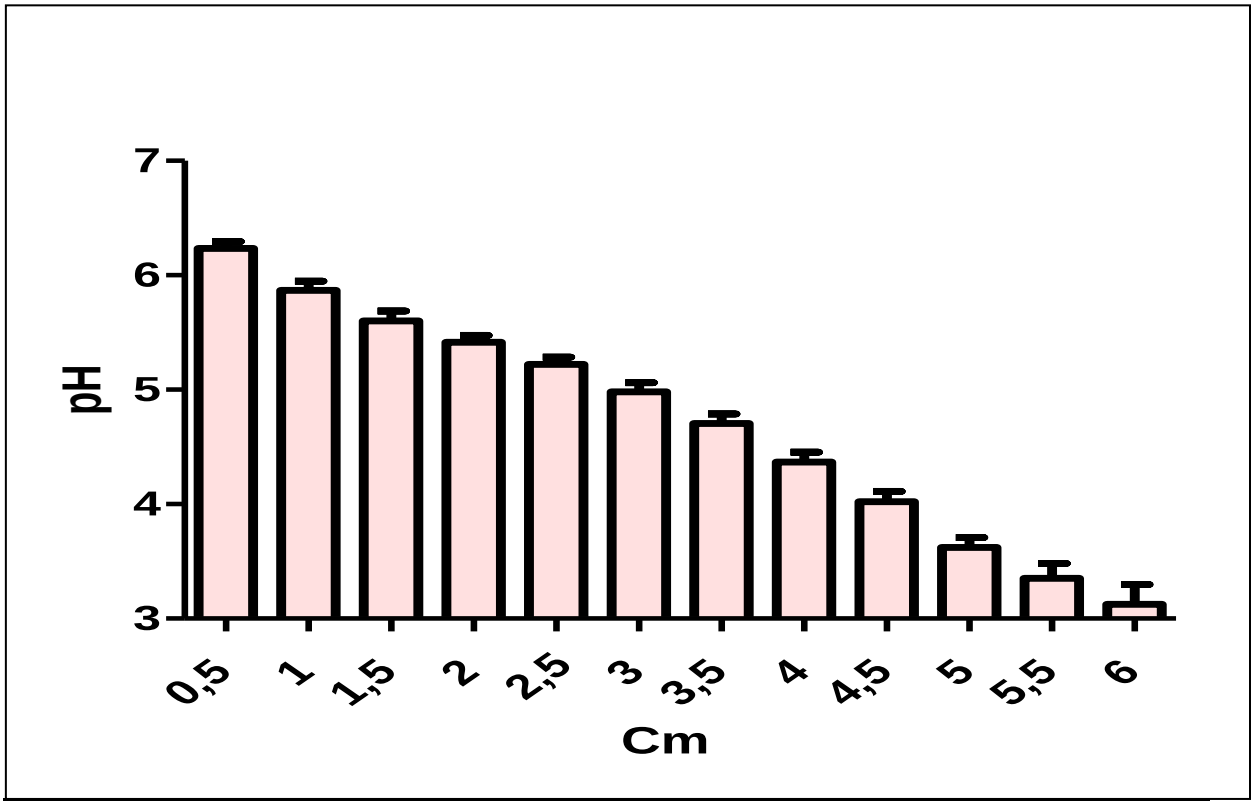


Nota: Valores expressos pela relação molar ac.oleico/albumina em 20 pacientes de cada grupo.
Legenda: A – pacientes do grupo sepse. B – pacientes do grupo DRC.
Fonte: O autor, 2017.

4.13 **Avaliação da saturação da albumina pelo método de isoeletrofocalização**

A albumina exerce papel essencial na proteção para os eventos de lipotoxicidade através da adsorção dos AGNE livres no sangue. Dependendo da quantidade de AG que se encontram ligados à proteína, ela adquire uma nova carga elétrica efetiva e também uma nova conformação molecular. Com base nestas características, utilizamos a isoeletrofocalização (FI) para avaliar essas mudanças através da migração da albumina pelo gradiente de pH fornecido pelo método. Inicialmente, determinamos o gradiente de pH formado no gel, etapa necessariamente delimitadora para a avaliação da migração da albumina, conforme representado na Figura 23.

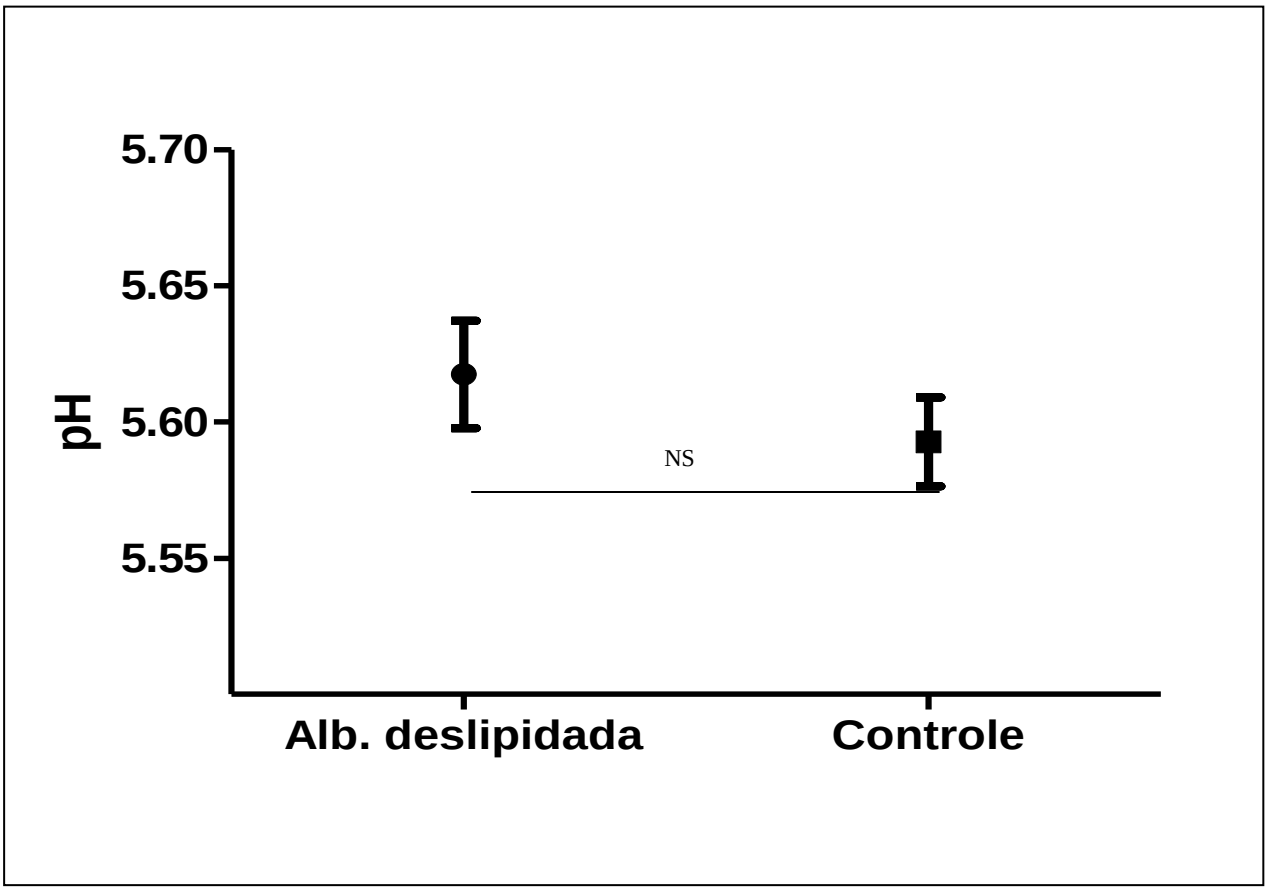
Figura 23 - Gradiente de pH no gel de eletroforese utilizado para a FI da albumina



Nota: Valores expressos em média±sd em 6 experimentos.
Legenda: Valores médios de pH a partir de 0,5cm: 6,23±0,06(0,5cm), 5,87±0,07(1cm), 5,6±0,08(1,5cm), 5,4±0,08(2cm), 5,22±0,06(2,5cm), 4,98±0,08(3cm), 4,7±0,08(3,5cm), 4,37±0,08(4cm), 4,02±0,08(4,5cm), 3,62±0,08(5cm), 3,35±0,1(5,5cm), 3,12±0,1(6cm).
Fonte: O autor, 2017.

Com este teste de calibração, comparamos o pH de migração de albumina provenientes das amostras de soro do grupo controle com as migrações de albuminas deslipidadas. Assim como descrito na literatura em 1978, por Basu et al.[114], que encontrou o pH de 5,6, verificamos as médias de pH de 5,61±0,02 para as albuminas deslipidadas e 5,59±0,01 para as albuminas coletadas no grupo controle, representado na Figura 24, com a média da relação AG/Albumina de 0,38.

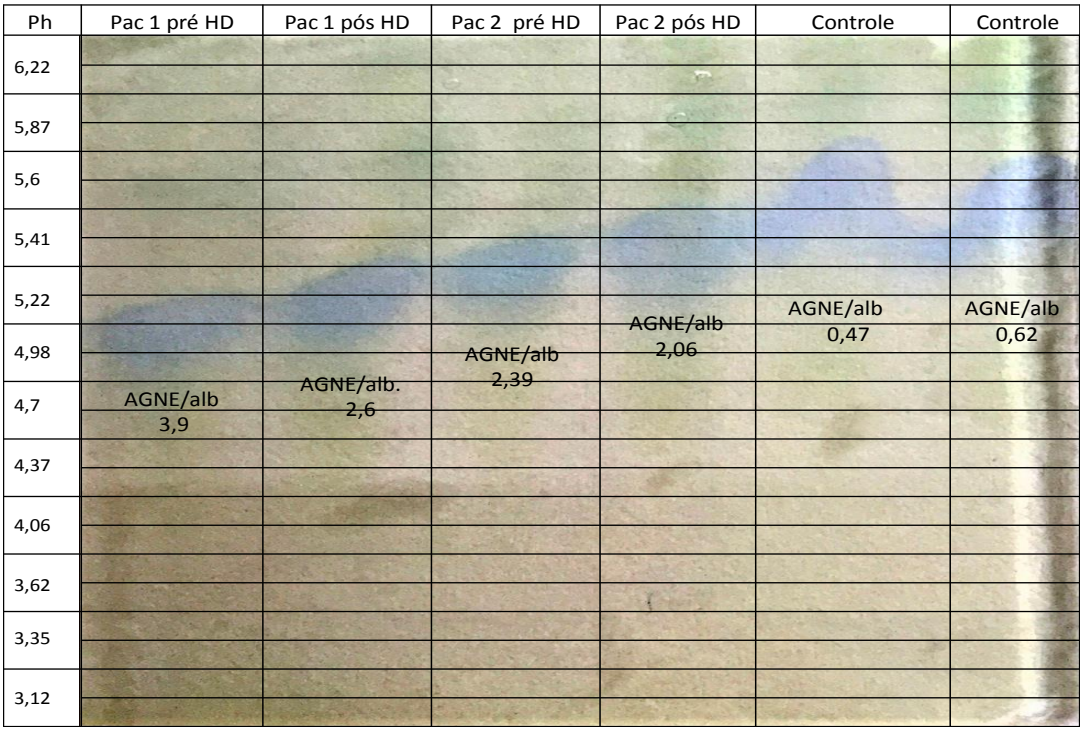
Figura 24 - Valores de pH na FI das albuminas do grupo controle e das albuminas deslipidadas



Nota: Grupo controle com 15 amostras e na albumina deslipidada 6 amostras expressos em média±sd.
Fonte: O autor, 2017.

Através da FI, comparamos o comportamento das albuminas obtidas dos pacientes do grupo sepse com IRA e DRC, pré e pós HD, com as migrações das proteínas do grupo controle. Verificamos uma diferença significante na migração da albumina, quando comparamos as amostras coletadas pré versus pós HD nos pacientes dos dois grupos com insuficiência renal, em relação ao comportamento das albuminas do grupo controle. Pacientes cujas relações AGNE/albumina eram mais elevadas migraram para faixas menores de pH após a HD. A título de ilustração, apresentamos na figura abaixo (Figura 25) as imagens das FI de albuminas de 2 amostras do grupo sepse com IRA pré e pós HD e de 2 indivíduos do grupo controle.

Figura 25 – Migração da albumina na FI em 2 pacientes dos grupo sepse pré e pós HD e do grupo controle

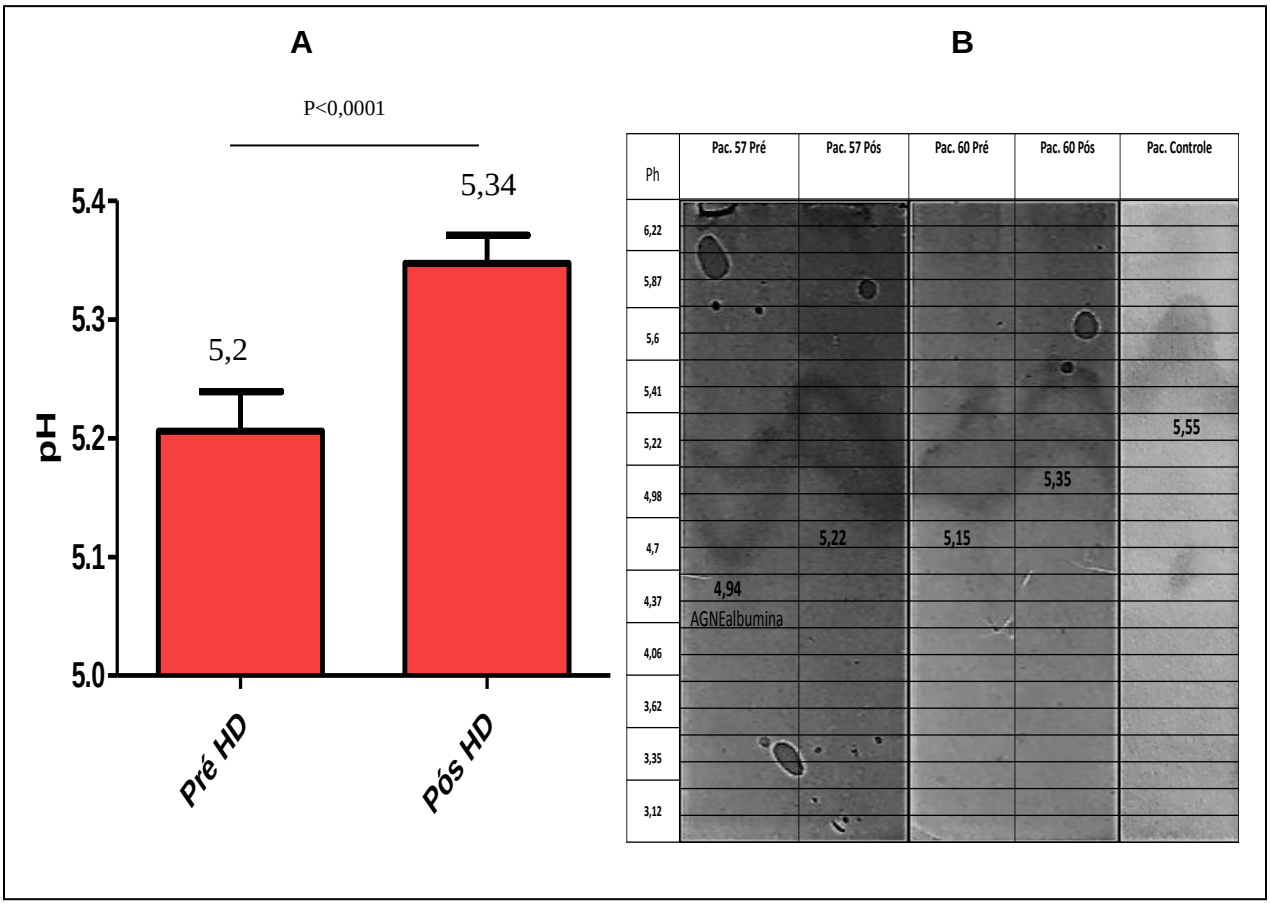


Nota: Valores da relação molar AGNE/albumina com sua respectiva corrida na FI nos pacientes com sepse e no grupo controle.
Fonte: O autor, 2017.

4.14 **Teste funcional da saturação da albumina nos pacientes do grupo sepse com IRA**

Como a relação molecular entre a albumina e os AG já foi definida com até 7 moléculas de ac. graxo para cada molécula de albumina, a molécula de albumina saturada de ácido graxo pode ser detectada pela FI. A avaliação pela FI da albumina sérica dos pacientes do grupo sepse com IRA mostrou média de pH pré HD 5,20±0,02 e pós HD 5,34±0,02, caracterizando as diferenças significativas p<0,0001 (Wicoxon test) no pH de migração das amostras. Figura 26.

Figura 26 - Valores de pH das albuminas na FI do grupo sepse com IRA pré e pós HD



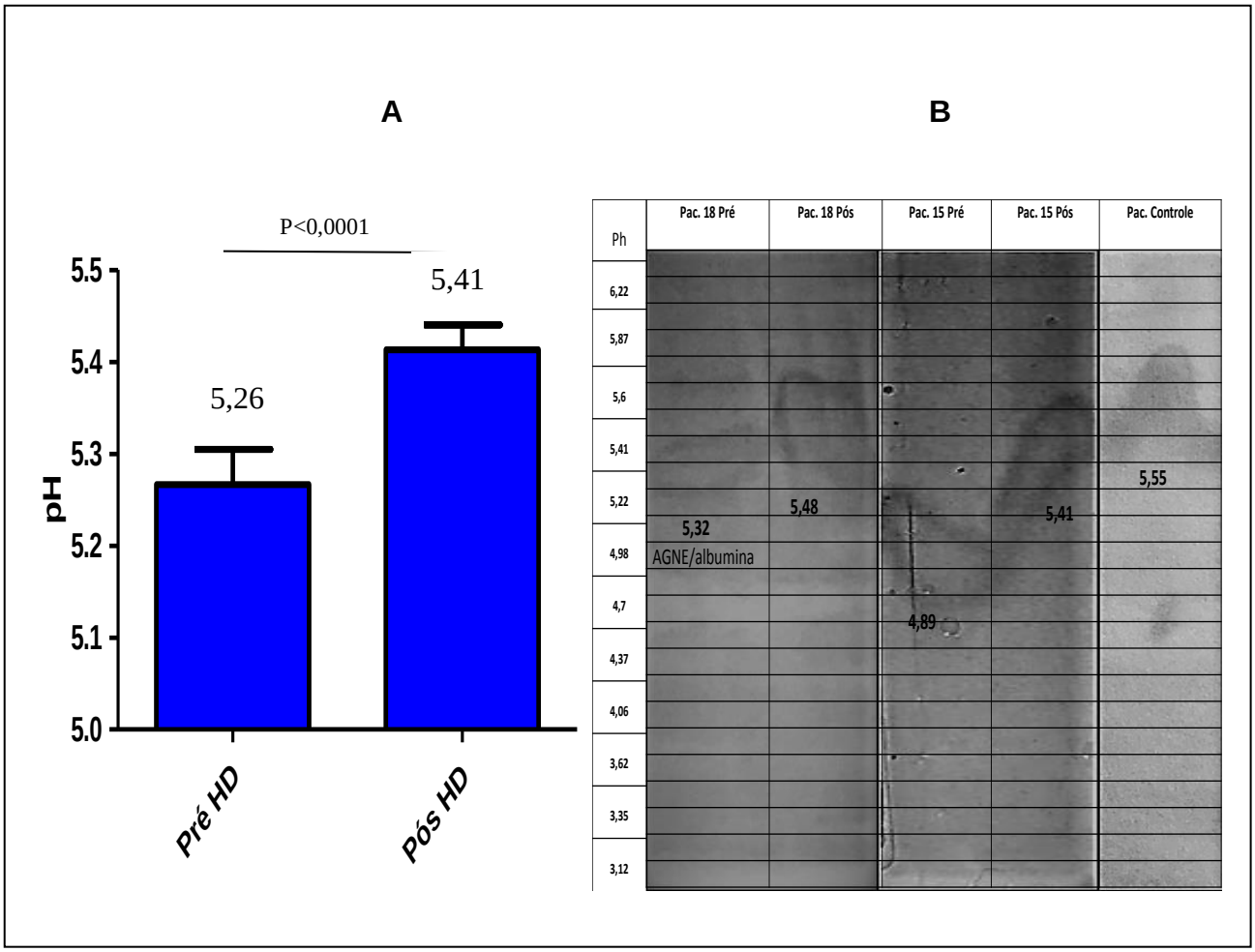
Nota: Valores expressos em média±SE do pH de migração das albuminas do grupo sepse com IRA em 20 pacientes (A) e FI com albuminas de 2 pacientes do grupo sepse com IRA, pré e pós HD, e do grupo controle (B).

Fonte: O autor, 2017.

4.15 **Teste funcional da saturação da albumina nos pacientes do grupo DRC**

A avaliação do pH de migração da albumina pela FI do grupo DRC, com amostras coletadas pré e pós HD, também mostrou diferenças significativas as proteínas nestes dois momentos, p<0,0001 (Wilcoxon test), com pH 5,26±0,03 pré HD e 5,41±0,02 pós HD, conforme mostra a Figura 27.

Figura 27 - Valores de pH das albuminas na FI do grupo DRC pré e pós HD

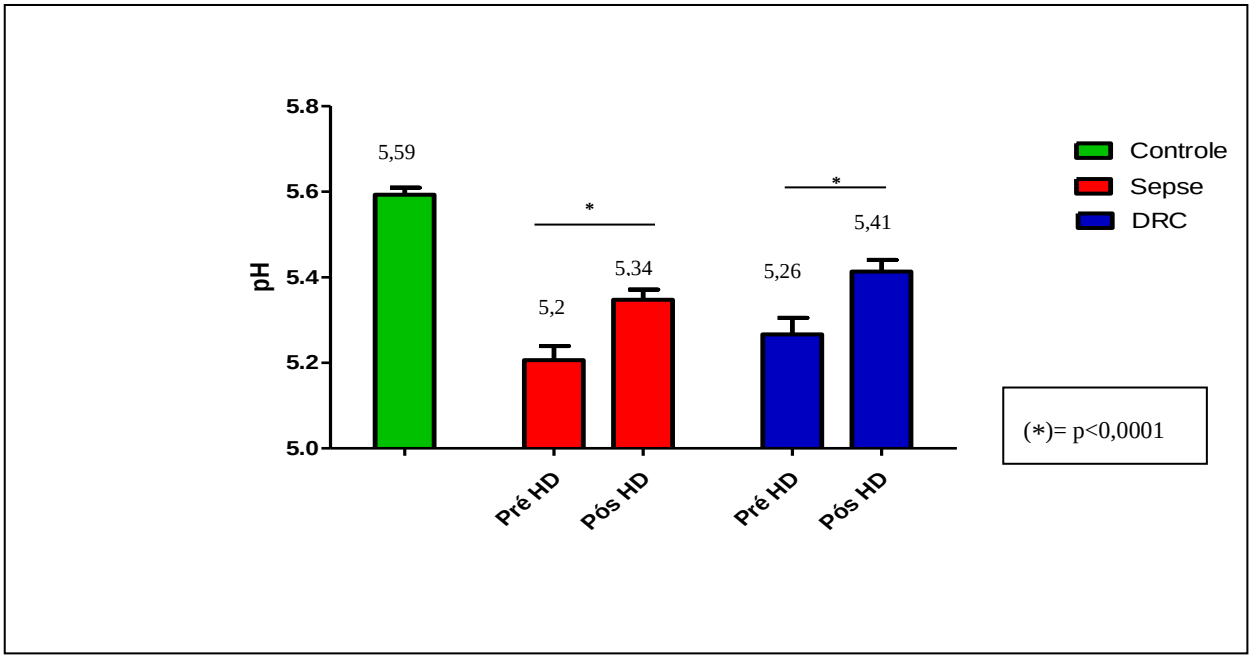


Nota: Valores expressos em média±SE do pH de migração das albuminas do grupo DRC em 20 pacientes (A) e FI com albuminas de 2 pacientes do grupo DRC, pré e pós HD, e do grupo controle (B).
Fonte: O autor, 2017.

4.16 **Análise do teste funcional da saturação da albumina entre os grupos sepse com IRA, DRC e controle**

Empregando a FI, verificamos que a migração da albumina das amostras coletadas dos grupos sepse com IRA e DRC, nos momentos pré e pós HD, apresentaram valores de pH significativamente diferentes (5,2±0,02 para 5,34±0,02 e 5,26±0,03 para 5,41±0,02 respectivamente), sendo que todas as médias também foram diferentes em relação ao grupo controle (5,59±0,01 (p<0,0001- Anova)). As amostras pré HD não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos (p=0,21). Nos pacientes de ambos os grupos ocorreu uma nítida variação no pH da migração proteica quando as amostras iniciais foram comparadas com as respectivas amostras pós HD com p<0,0001 (Wilcoxon test) e entre as amostras pós HD com p=0,027 (Anova). Figura 28.

Figura 28 - Valores de pH na FI das amostras pré e pós HD nos grupos sepse com IRA, DRC e controle

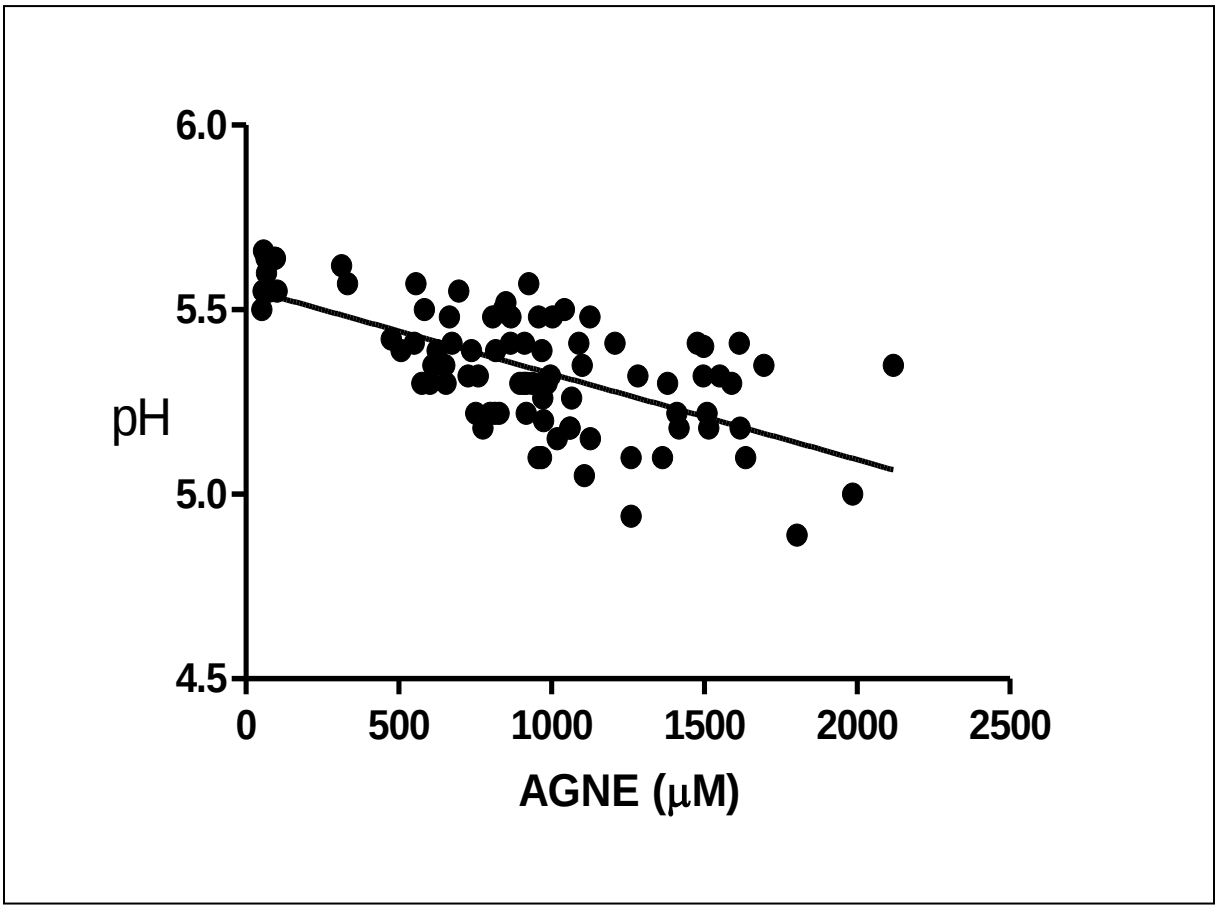


Nota: Valores do pH expressos em média±SE com médias de 5,2±0,02 e 5,34±0,02 nos grupos sepse com IRA, 5,26±0,03 e 5,41±0,02 (DRC) e 5,59±0,01 (grupo controle).
Fonte: O autor, 2017.

4.17 **Correlações entre a FI com os AGNE e as relações AGNE/albumina**

Com base nos resultados do pH de migração obtidos nos pacientes dos grupos sepse com IRA e DRC (pré e pós HD) avaliamos as curvas de correlação entre a FI com os AGNE e a FI com as relações AGNE/albumina. Quando comparamos os valores da concentração de AGNE com os valores obtidos de pH de migração na FI observamos uma fraca correlação pela regressão linear com r^2=0,42, representada na Figura 29.

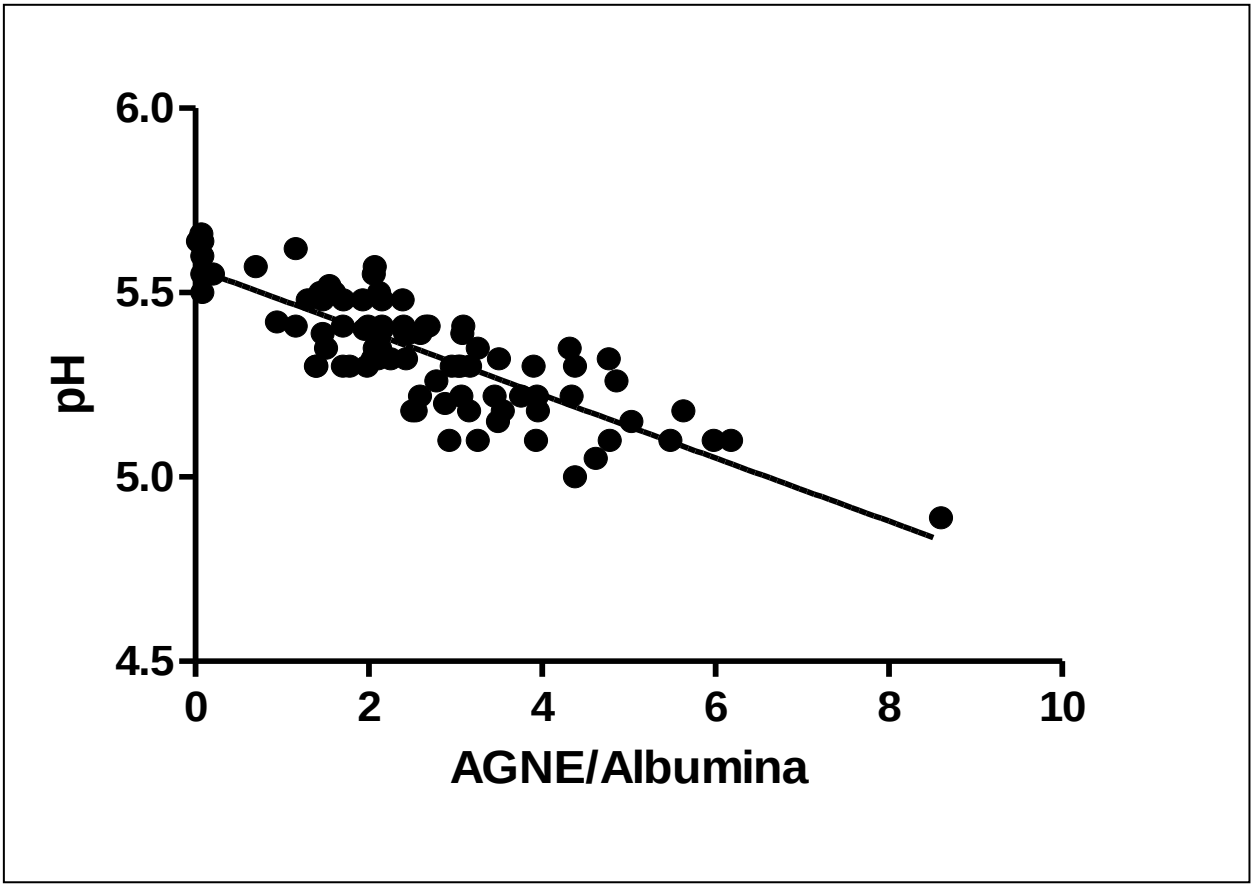
Figura 29 - Valores de pH de migração na FI em correlação com os AGNE



Nota: Valores referentes a 92 amostras dos grupos sepse, DRC e controle.
Fonte: O autor, 2017.

No entanto, quando compararmos os valores do pH de migração obtidos na FI com as relações AGNE/albumina das respectivas amostras, encontramos uma correlação linear significante com r^2=0,694, conforme apresentado na Figura 30.

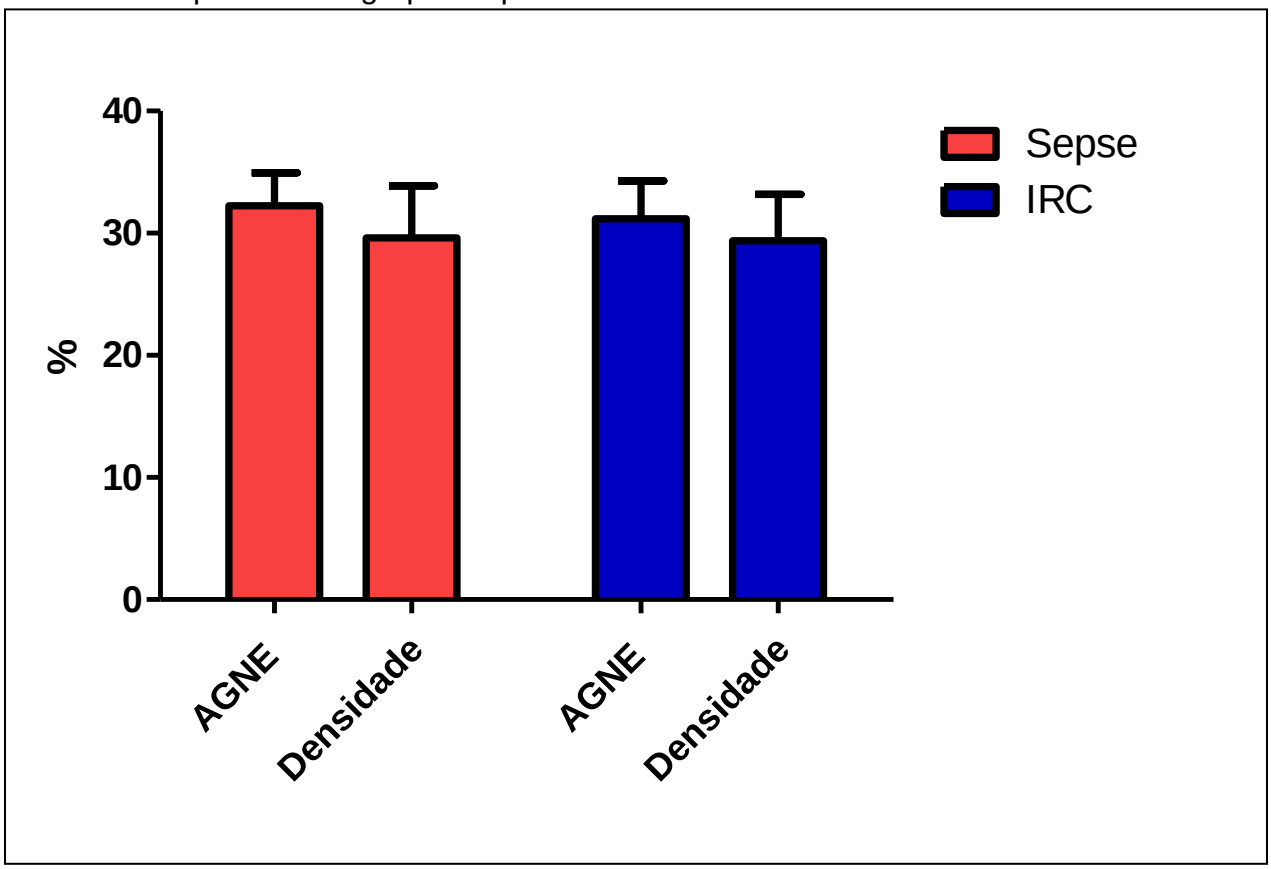
Figura 30 - Valores de pH na FI correlacionados com as relações AGNE/albumina



Nota: Valores referentes a 92 amostras dos grupos sepse, DRC e controle.
Fonte: O autor, 2017.

Através da FI podemos também quantificar a densidade das bandas proteicas presente nas amostras. Desta forma comparamos as densidades das bandas das amostras pré e pós HD e assim determinar o percentual de variação entre as densidades das duas amostras de um mesmo indivíduo. Utilizando o programa *Image J,* avaliamos as amostras do grupo sepse com IRA e DRC pré e pós HD e comparamos com o respectivo percentual de redução nas concentrações dos AGNE obtidos pela HPLC. Os percentuais de variação foram semelhantes quando avaliados por ambos os métodos, nos dois grupos e estão representados na Figura 31.

Figura 31 – Correlação entre médias obtidas por HPLC e das densidades das bandas pela FI nos grupos sepse com IRA e DRC

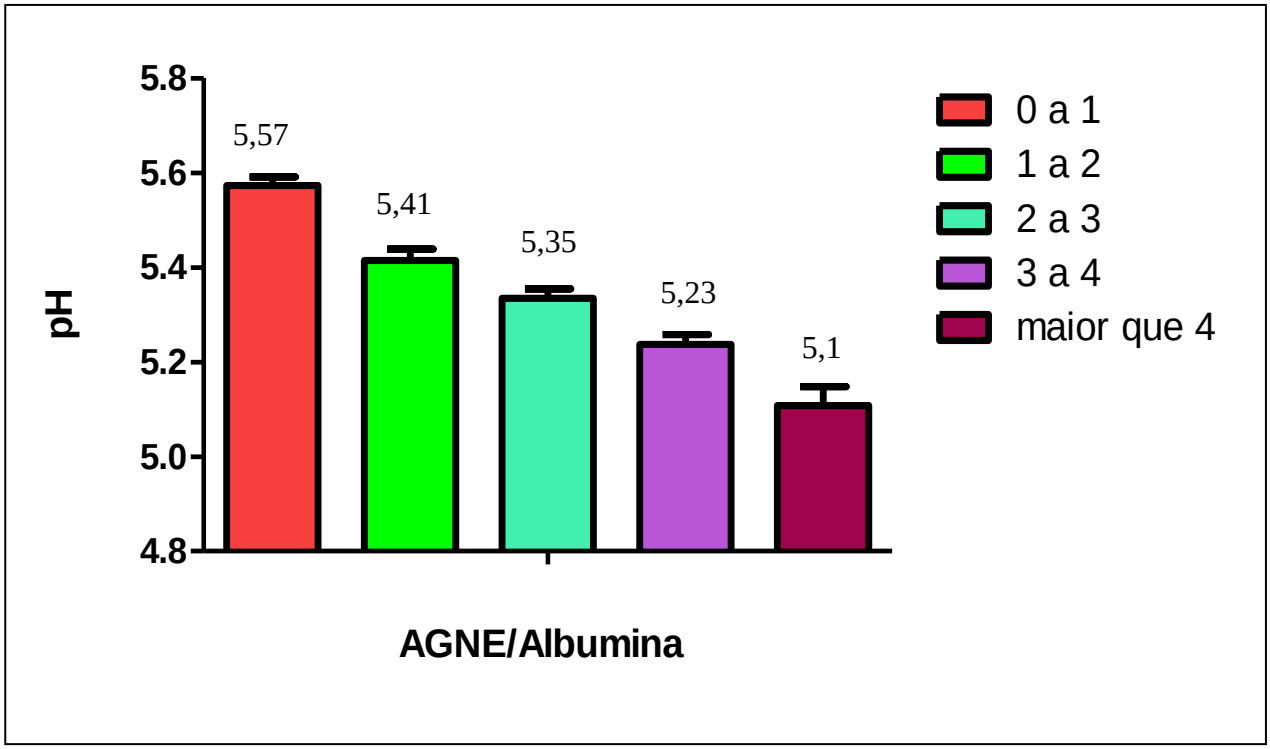


Nota: Valores em percentual expressos pela média±SE
Fonte: O autor, 2017.

4.18 **Determinação de faixas de pH conforme a relação molar AGNE/albumina**

Através dos valores obtidos de pH na isoeletrofocalização quando comparadas com relação molar AGNE/albumina, selecionamos quatro faixas distintas de pH de acordo com os valores da relação AGNE/albumina. Valores da relação molar AGNE/albumina entre 0 a 1, o pH médio encontrado foi 5,57±0,01; entre 1 e 2, pH= 5,41±0,24; entre 2 e 3, pH= 5,35±0,02; entre 3 e 4, pH= 5,23±0,02 e acima de 4, pH= 5,10±0,03. Utilizando o Mann Whitney test os valores de p entre as sucessivas faixas de AGNE/albumina foram: ($p<0,0001$, $p=0,02$, $p=0,001$, $p=0,01$ respectivamente). Figura 32.

Figura 32 - Valores de pH em relação a faixas de AGNE/albumina



Nota: Valores de pH expressos em média±SE.
Fonte: O autor, 2017.

5 DISCUSSÃO

O termo lipidoma tem sido recentemente utilizado para descrever o perfil lipídico de uma célula, tecido, organismo ou ecossistema e constitui parte de um conceito mais amplo denominado metaboloma.

Através da investigação do lipidoma podemos descrever alterações da composição das diferentes espécies moleculares de lipídios presentes em estados fisiopatológicos estudados em nível molecular, celular ou de um organismo. Desta forma, a avaliação do lipidoma é importante para o mapeamento de processos bioquímicos e de patologias que se associam ao metabolismo lipídico. O crescente interesse na investigação do lipidoma pode ser evidenciada através de iniciativas como LIPID Metabolites And Pathways Strategy *(LIPID MAPS Consortium),* um banco de dados que engloba estruturas e anotações de lipídios biologicamente relevantes, que inclui exemplos representativos de cada categoria do sistema de classificação lipídica, contendo mais de 40.000 estruturas lipídicas únicas[118,119].

O aumento da obesidade na população mundial e da prevalência das doenças a ela relacionada, como hipertensão e diabetes, tem sido responsável em parte pelo aumento de interesse pela investigação dos lipídeos e definição de seus lipidomas em diversas condições patológicas.

A obesidade, além da associação com dislipidemias e elevados níveis plasmáticos de AGNE, também está associada ao aumento da incidência de distúrbios patológicos como a síndrome metabólica, o diabetes tipo 2, as doenças cardiovasculares, as hepatopatias, a insuficiência renal, a pancreatite e as neoplasias[25-29,47]. Dentre os mecanismos propostos no desencadeamento desses distúrbios patológicos está a lipotoxicidade, considerada como um dos principais gatilhos no desenvolvimento de tais patologias. Por sua vez, a lipotoxicidade também está associada a situações clínicas como o trauma, a sepse, o tromboembolismo, as vasculopatias e a doença renal crônica[25-30,48,120]. A Figura 5 sintetiza os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lipotoxicidade.

O ambiente metabólico modificado pela insuficiência renal aguda ou crônica causa alterações significativas na composição lipídica circulante, favorecendo o aparecimento de eventos de lipotoxicidade sistêmica.

Dentre as condições clínicas associadas ao aumento de AGNE circulante, nos propusemos neste estudo avaliar o perfil dos AGNE livres em pacientes com insuficiência renal aguda causada por sepse e em pacientes com insuficiência renal crônica no estágio 5, todos submetidos a hemodiálise como método de substituição da função renal. Nosso interesse especial foi conhecer algumas particularidades sobre o lipidoma dos pacientes com insuficiência renal e o eventual papel da modalidade de terapia dialítica (hemodiálise) sobre o perfil lipídico, considerando a possibilidade de remoção dos AGNE pelo método de circulação extracorpórea.

Além de nossas observações, outro estudo prévio sugeriu que a hemodiálise pudesse ser responsável pela remoção dos AGNE do sangue[121]. No nosso grupo, Ferreira (2003)[106], verificou a elevação dos AGNE séricos se correlacionou inversamente com a função renal, conforme demonstrado em pacientes com doença renal crônica em diferentes faixas de filtração glomerular, submetidos a tratamento conservador. Curiosamente naquela série, os pacientes submetidos à hemodiálise (clearance <10ml/min) apresentaram níveis séricos de AGNE menores em comparação aos pacientes nos estágios pré-dialíticos (Figura 8).

Com base naquele estudo, em que a concentração de AGNE circulante no grupo de pacientes com taxa de filtração glomerular mais baixa, no estágio 5, foi menor do que a encontrada para os estágios anteriores da DRC, consideramos que a diálise pudesse estar diretamente implicada na remoção dos AGNE.

Para investigar esta possibilidade, desenhamos este estudo com dois grupos de pacientes envolvendo potencialmente os mecanismos de lipotoxicidade aguda, como ocorre na sepse, e os mecanismos de lipotoxicidade crônica, supostamente envolvidos na insuficiência renal crônica. Em ambos os grupos avaliamos os efeitos da hemodiálise nos níveis séricos dos AGNE.

Os indivíduos foram distribuídos em 3 grupos: sepse + IRA (n=20), DRC em HD (n=20) e grupo controle (n=15). Não houve diferença significativa na idade nos 3 grupos, houve leve predominância do sexo masculino no grupo controle e sepse e do sexo

feminino no grupo DRC. Dentre os pacientes com DRC, diabetes (40%) e hipertensão (54%) foram as doenças pré-existentes mais prevalentes, seguidas de DPOC (9%), cardiopatias (7%), glomerulopatias (7%) e doença renal policística (3,6%). Os valores de albumina sérica, creatinina, hemoglobina e triglicerídeos foram comparadas entre os diferentes grupos. Menores valores de albumina foram encontrados nos grupos sepse com IRA e DRC em relação ao controle (319±113, 443±137 e 647±127μM respectivamente). Níveis mais elevados de triglicerídeos foram encontrados nos pacientes sépticos com IRA, seguidos dos DRC em comparação ao grupo controle (317±180, 285±184 e 182±57mg/dl respectivamente). Os níveis de colesterol não apresentaram diferenças significativas entre os grupos avaliados (172±38, 184±34, 188±39mg/dl). Ao compararmos, através da regressão linear, os valores séricos de AGNE pré HD dos grupos sepse com IRA, DRC e controle com os respectivos valores de triglicerídeos e de colesterol, não observamos correlações significantes, com r^2=0,28 e 0,22. Como esperado, os valores de creatinina sérica foram maiores nos grupos DRC, seguido pelo grupo sepse com IRA e pelos controles (7±0,7, 3,4±0,3 e 0,7±0,3 mg/dl respectivamente). Da mesma forma, os valores de hemoglobina foram significativamente menores nos grupos sepse com IRA e DRC (8,3±0,5 e 9,4±0,8g/dl) em comparação ao grupo controle (12,2±0,04).

Pacientes com sepse frequentemente apresentam alterações imunológicas e metabólicas. Dentre as disfunções metabólicas na sepse com IRA se incluem alterações do metabolismo lipídico e diminuição da taxa de oxidação dos AG[99]. Portanto, a elevação dos AG livres de plasma pode advir destas alterações, como também resultar do aumento da lipólise tecidual em órgãos como fígado, rim, coração e músculo esquelético[99,102,120,122].

Nos tecidos, os AGNE se ligam à proteína de ligação aos AG (FABP) e à Acil-CoA, que os transporta para as mitocôndrias e os peroxissomos, onde serão oxidados, ou para os núcleos, onde ativarão a transcrição genética[123]. Esses processos são rigorosamente controlados por enzimas[24,124-126]. Diminuição da expressão hepática de enzimas metabolizadoras de AG ocorre durante a sepse e a endotoxemia também pode contribuir para o aumento das concentrações plasmáticas de AGNE em pacientes sépticos[127].

Sob condições fisiológicas, aproximadamente 0,1 a 2 mol de AG estão ligados à albumina[128]. Em situações como cirrose e sepse, em que ocorre redução dos níveis séricos da albumina, a concentração sérica de AGNE livres se encontra aumentada[31]. Por vezes nos pacientes com DRC, a elevação dos AGNE está associada à doença de base que contribuiu para o desenvolvimento da insuficiência renal (DM, obesidade ou síndrome metabólica), Outras vezes, se deve às alterações funcionais intrínsecas renais do metabolismo dos lipídios. Além da diminuição do consumo de ac. graxos pelas células renais, a uremia está associada à dislipidemia aterogênica. Ainda, mesmo na ausência de diabetes, pacientes que evoluem para DRC terminal apresentam resistência à insulina e hipertrigliceridemia[44,129,130].

Nosso estudo mostrou um aumento significativo dos AGNE séricos nas amostras colhidas dos pacientes com sepse com IRA e DRC antes da realização do tratamento hemodialítico, respectivamente comparados ao controle (1178±79, 1250±93 vs 264±16μM respectivamente). Considerando ainda que a albumina sérica está reduzida em ambos os grupos de pacientes, as relações molares AGNE/albumina são muito mais elevadas nas amostras pré dialíticas nos grupos sepse com IRA e DRC, quando comparadas aos controles (3,91±0,33, 2,98±0,29 e 0,37±0,04 respectivamente).

Apesar dos valores absolutos dos AGNE pré HD terem sido semelhantes em ambos os grupos, ao avaliarmos a relação AGNE/albumina encontramos diferenças significativas (Figura 18). Com elevados níveis de AGNE circulantes, influenciado pelo fato dos pacientes com sepse com IRA apresentarem valores médios de albumina menores do que os do grupo DRC, as relações AGNE/albumina do grupo sepse com IRA foram significativamente mais elevadas.

Estudos prévios em pacientes com leptospirose e síndrome de Weil revelaram a presença de níveis séricos elevados de AGNE bem como a elevada relação AGNE/albumina, dados bioquímicos estes que foram relacionados à inibição da enzima Na,K-ATPase testada *in vitro*. A adição de albumina aos experimentos promoveu a proteção do efeito citotóxico dos AGNE desempenhado sobre a enzima[67]. A adição experimental de albumina reduziu a relação AGNE/albumina, num mecanismo supostamente encontrado *in vivo* para a proteção do organismo contra a lipotoxicidade. Uma outra forma de atenuar os efeitos deletérios dos AGNE no organismo e alterar a

relação AGNE/Albumina seria a redução do nível de AGNE pela remoção dos mesmos. Nesse sentido, avaliamos o potencial efeito de remoção dos AGNE pela hemodiálise. Por se tratar de um estudo transversal, visando inicialmente verificar a presença ou não deste fenômeno, procuramos não interferir na modalidade de diálise nem padronizar as prescrições da terapia dialítica. Por isto, incluímos pacientes com tempos, acessos vasculares, fluxos de sangue e fluxos de banho de diálise diferentes, com consequentes taxas de depuração variáveis.

Apesar do conceito de hemodiálise estar diretamente ligado à depuração por hidrofilia, verificamos que a hemodiálise promoveu a redução dos níveis séricos de AGNE, dos pacientes dos grupos sepse e DRC. Estudos bioquímicos sugerem que no pH sérico habitual (acima de 7) os AGNE adquirem uma conformação anfipática alterando sua solubilidade[131]. Desta forma durante a diálise, a reposição de tampão alcalino pode contribuir ainda mais para uma conformação dos AGNE menos hidrofóbica, facilitando sua retirada através da membrana capilar empregada na hemodiálise.

Independentemente do tipo das prescrições de hemodiálise e das duas membranas utilizadas no tratamento, houve uma importante redução (em torno de 30 a 35%) nas concentrações de AGNE nos grupos sepsis e DRC (1179±79μM para 771±39μM e 1250±93μM para 879±68μM). A influência da hemodiálise não mostrou característica de seletividade nem para tamanho nem para o número de insaturação dos AG com cadeias entre 14 e 18 carbonos, já que não houve diferença significativa nos percentuais de redução apresentados pelos diferentes AG avaliados.

A partir da queda nos níveis séricos de AGNE relacionadas à HD nos pacientes do grupo sepse com IRA e DRC, investigamos o papel do filtro de hemodiálise na remoção dos AGNE *in vitro*. Empregando uma solução albuminada de ac. graxo, avaliamos o potencial de remoção do ac. oleico através de filtros capilares com membrana de alto fluxo (FX 60® e Polyflux 210H®); verificamos, ao final de 1 hora de recirculação, que ocorreu uma queda em torno de 30% na concentração do AGNE, em relação à solução padrão original; verificamos também a presença do AG no efluente dialisado, atingindo, após 1h, cerca de 20% da concentração utilizada na solução padrão. Confirmada a remoção de AG pela hemodiálise, comparamos a depuração entre os dois tipos de membrana de hemodiálise utilizadas e constatamos que não houve diferença

significativa de remoção entre os filtros avaliados. Na composição final da quantidade de ac. oleico utilizada no experimento *in vitro*, supomos que uma fração menor dos AGNE (10%) possa ter sido adsorvida na superfície do filtro e nas linhas do circuito extracorpóreo utilizado para a hemodiálise. Para melhor entender estes fenômenos, observamos que o aumento da concentração de albumina na solução circulante no circuito girou em torno de 35% ao final do experimento. Esta concentração foi compatível com a perda de líquido da solução inicial que efluiu para o compartimento do dialisado. A ausência da albumina no dialisado já era esperada, dado o seu tamanho molecular ser superior aos dos poros das membranas. Pelas suas propriedades difusivas, a albumina é utilizada como marcador interno para correção do volume intravascular diante da ultrafiltração, um exercício muito comum na prática hemodialítica.

Em recente estudo de 2016, Wang et al.[121], avaliou o perfil de alguns AGNE (esteárico, oleico e palmitoleico) e o papel da hemodiálise em pacientes com insuficiência renal crônica. Quantificando os AGNE através da espectrometria de massa, os autores encontraram níveis séricos aumentados nas amostras pré HD em relação aos controles saudáveis e uma redução dos AGNE após HD atingindo valores próximos ou mesmo inferiores aos do grupo controle estudado. No entanto o estudo não considerou a possibilidade de variação do volume efetivo durante a diálise além de não considerar a relação molar AG/albumina que parece ser um critério muito mais refinado para a avaliação da lipotoxicidade do que a elevação isolada dos AGNE.

No nosso estudo, encontramos valores elevados pré HD para os AGNE totais e suas respectivas frações, com uma redução significativa das mesmas concentrações após HD, embora os AGNE totais ainda permanecessem elevados em relação aos controles. Nossas observações apontam para o mesmo fenômeno descrito por Wang et al.[121], ainda que diferentes metodologias analíticas tenham sido empregadas.

Como as prescrições de diálises não foram padronizadas, seria natural termos dificuldade para a avaliação de todos os parâmetros, especialmente nos pacientes com sepse com IRA internados em unidade de terapia intensiva. No entanto, em uma amostra dos pacientes com DRC comparamos a taxa de remoção de ureia com a taxa de remoção de AGNE e encontramos uma forte e significativa correlação linear com r^2=0,72, sendo a

taxa de depuração dos AGNE em torno de 34,6% da taxa de depuração da ureia (Figura 21).

Há poucos dados na literatura sobre quais seriam os valores das concentrações séricas dos AGNE livres a partir dos quais eles promoveriam efeitos citotóxicos, ou seja, a lipotoxicidade. Martins[95] avaliou pacientes com leptospirose e síndrome de Weil e, com auxílio da análise estatística feita pela curva ROC, concluiu que a relação molar ácido oleico/albumina é um forte marcador de prognóstico de mortalidade bastante sensível e a persistência de uma relação acima de 0,7 representa o valor de corte relacionado à mortalidade. Considerando esses resultados, avaliamos o perfil da relação ac. oleico/albumina no pré e pós HD dos grupos estudados. Verificamos que a quase totalidade dos pacientes do grupo sepse com IRA pré HD apresentavam valores maiores que 0,7 da relação ac. oleico/albumina. Após a realização de hemodiálise, um percentual importante dos pacientes (60%), apresentou relação molar ac. oleico/albumina menor ou igual a 0,7.

Já no grupo de pacientes com DRC, a maioria dos pacientes apresentava relação ac. oleico/albumina menor que 0,7 pré HD. Vale ressaltar que a albumina sérica neste grupo era maior que a albumina no grupo sepse. Após a HD, 80% dos pacientes ficaram com a relação molar ac. oleico/albumina menor ou igual a 0,7 (Figura 22).

Nosso estudo tem a originalidade da observação controlada da redução da relação AGNE/albumina através da hemodiálise em pacientes dos grupos sepse com IRA e DRC (3,9±0,3 para 2,5±0,2 e 2,9±0,3 para 2,1±0,2 respectivamente). Esta relação ainda que esteja elevada após HD é mais próxima aos valores encontrados no grupo controle e provavelmente próximos a valores mais seguros para os efeitos lipotóxicos dos AGNE. Portanto, em situações nas quais ocorrem elevações significativas dos AGNE livres e consequente elevação na relação AGNE/albumina (como nos pacientes sépticos com IRA e renais crônicos em HD), a manutenção de valores adequados de albumina sérica e a hemodiálise podem contribuir sinergicamente para minimizar os efeitos de lipotoxicidade dos AGNE.

Alguns estudos sugerem que o aumento dos AGNE nos pacientes renais crônicos está relacionado a cardiopatias e transtornos lipídicos, da mesma forma que a queda da albumina sérica está correlacionada à mortalidade elevada, sendo inclusive considerada

um fator de risco independente. Assim, a mortalidade poderia estar também vinculada a uma relação AGNE/albumina sérica elevada e seus consequentes efeitos deletérios de lipotoxicidade crônica[105,132].

Considerando o potencial impacto das nossas observações na pratica clínica, a determinação dos valores de AGNE e, sobretudo, da relação AGNE/albumina, teria uma nova importância para emprego clínico, não somente para orientar decisões mas também para avaliar as condutas terapêuticas. No entanto, as técnicas metodológicas para determinar o perfil dos AGNE não são regularmente disponibilizadas para a prática clínica diária. Em parte, isto ocorre pelas dificuldades naturais de preparo das amostras sorológicas e pela demora na execução dos processos analíticos habituais.

Com o propósito de desenvolver um método prático e rápido de avaliação da lipotoxicidade potencial dos AGNE, empregamos o método de focalização isoelétrica baseado na eletroforese de albumina. A quantidade de AGNE ligada à albumina influencia no pH de migração da amostra e determina em qual faixa de pH a banda proteica vai se posicionar. Além da variação do pH também podemos avaliar a qualidade da amostra através da densidade da sua banda proteica. Considerando ambos os aspectos, comparamos as amostras pré e pós HD dos pacientes dos grupos sepse e DRC, além do grupo controle.

Em um estudo realizado em 1978 por Basu et al.,[114] mostrou que na focagem isoelétrica da albumina de plasma humano, observa-se dois picos principais de pI 4.8 e 5.6. À medida que os ácidos são removidos da albumina o pI 4,8 pico diminui e o pI 5,6 pico aumenta (albumina sérica humana deslipidada). Em nosso estudo feito com albumina humana comercial deslipidada encontramos um pI similar de 5,61.

Através do método da FI obtivemos uma faixa de pH ampla para estudar as migrações, que variaram de pH 3,12 a 6,23. Como os extremos de pH encontrados nos experimentos com os soros de pacientes variaram entre 4,89 e 5,64, este método se mostrou adequado, permitindo uma faixa de variação de pH suficiente para abranger todas as amostras.

Ao compararmos as amostras pré HD e pós HD obtidas dos pacientes dos grupos sepse com IRA e DRC, considerando os respectivos valores de pH das amostras, também encontramos diferenças significativas. Nas amostras pré HD dos pacientes com

sepse com IRA, o pH médio foi 5,20±0,03 enquanto que nas amostras pós HD foi 5,34±0,02. Nos pacientes com DRC encontramos um pH médio das amostras pré HD de 5,25±0,03 e nas amostras pós HD 5,41±0,02. O grupo controle apresentou valor médio de pH 5,59±0,01.

A partir dos dados obtidos pela FI, comparamos os valores de pH obtidos com os resultados das concentrações dos AGNE e com as relações AGNE/albumina através de curvas de regressão linear (Figuras 29 e 30). Não houve correlação satisfatória entre os valores de pH e as concentrações séricas de AGNE (r^2=0,42). No entanto, quando ajustamos a correlação dos mesmos valores de pH com as relações séricas AGNE/albumina encontramos uma correlação significante (r^2=0,694).

Na literatura, o relato de condições clínicas em que ocorrem aumento dos AGNE e da relação AGNE/albumina não é uma novidade. Porém, a exceção do que já foi descrito na leptospirose, tanto para pacientes com sepse como para os portadores de DRC não há definição quanto aos limites de valores fisiológicos aceitáveis para os AGNE livres e/ou para a relação molar AGNE/albumina. No entanto, a literatura sugere que valores elevados de AGNE livres e da relação molar AGNE/albumina contribuíram para os fenômenos de lipotoxicidade. Com esta premissa, os respectivos valores séricos elevados justificariam medidas para redução dos AGNE livres.

Através da FI, ainda que de forma indireta, poderemos obter valores de pH que estariam relacionados aos valores elevados da relação molar AGNE/albumina, definindo pontos de corte para eventuais interferências terapêuticas. Este procedimento pode se constituir num teste funcional para a albumina, orientando o emprego da reposição plasmática de albumina naqueles pacientes com elevado potencial de lipotoxicidade.

A relação AGNE/albumina do nosso grupo controle foi de aproximadamente 0,4. Desta forma através da FI, pudemos definir faixas de pH para diferentes valores da relação molar AGNE/albumina (Figura 32).

Observamos nesta série uma elevada relação molar AGNE/albumina com extremo de 8,6. Considerando o critério de lipotoxicidade sugerido por Martins[95], com a relação molar ac.oleico/albumina >0,7, e que o ácido oleico corresponde a cerca 31% do total dos AGNE, a FI com valores de pH ≤ 5,35 revelariam relações

molares AGNE/albumina com potencial lipotoxicidade a serem estudados em futuros ensaios clínicos.

FI permite também avaliação através da densidade das amostras, possibilitando a determinação da diferença, em percentual, entre as densidades das amostras pré e pós HD, que corresponderam à taxa de remoção dos AGNE pela hemodiálise. Na Figura 32 observamos o percentual de remoção dos AGNE nos pacientes com sepse pós HD (32,2%) e nos pacientes DRC (31,17%). Com avaliação através da densidade pelo programa *ImageJ*, observamos redução da densidade das amostras pós HD do grupo sepse e DRC em proporção semelhante a encontrada no HPLC (29,6% e 29,4% respectivamente). Este método oferece a ordem de grandeza aproximada da variação nas concentrações de AGNE em amostras comparadas, no entanto este tipo de abordagem não nos informa sobre a relação AGNE/albumina da amostra.

Com os dados obtidos neste estudo consideramos que o lipidoma dos pacientes que necessitam de hemodiálise, seja devido a insuficiência renal aguda secundária a sepse seja por DRC, apresentam valores de AGNE séricos significativamente elevados. Estas características lipídicas são potencialmente associadas a morbidade e mortalidade inerentes a essas doenças. Intervenções direcionadas para a redução sérica dos valores absolutos de AGNE, como foi constatada através de hemodiálise e sobretudo a diminuição da relação AGNE/albumina, seja pela remoção (diálise) ou pela oferta de albumina, devem ser avaliadas e sugeridas na prática clínica. A FI é um método de utilidade na prática clínica que permite avaliar de modo indireto a relação dos AGNE/albumina, oferecendo novos parâmetros para avaliação diagnóstica e decisão terapêutica desses pacientes.

CONCLUSÃO

Diante do exposto na Tese, podemos concluir que:

a) Pacientes com insuficiência renal aguda por sepse e/ou DRC apresentaram níveis séricos de AGNE e das relações molares circulante de AGNE/albumina elevadas nos seus lipidomas;

b) Apesar do conceito clássico de depuração hidrofílica, a hemodiálise depura AGNE e restabelece o balanço AGNE/Albumina circulante;

c) A hemodiálise é capaz de reduzir a concentração sérica dos AGNE nos pacientes com sepse com IRA e DRC, como também de aumentar a concentração de albumina, melhorando a relação molar circulante AGNE/albumina;

d) A FI, através do pH de migração da banda proteica, mostrou uma boa correlação com a relação AGNE**/**albumina e pode ser um método útil para avaliar a saturação de albumina nos pacientes com alterações patológicas relacionadas ao aumento dos AGNE;

e) A FI também se mostrou um método capaz de oferecer uma boa correlação entre a saturação de AGNE e as densidades das amostras, permitindo novas abordagens laboratoriais para o estudo da lipotoxicidade;

f) A FI é um teste funcional para a propriedade de ligação da albumina aos AGNE com potencial emprego na prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. Ogdin CL, Carroll MD, Fryar CD. Prevalence of obesity among adults and youth: United States, 2011-2014. JAMA 2014;311:806-14

2. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (Vigitel). Brasília: Ministério da Saúde; 2017

3. Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. J Lipid Res 2003;44(6):1071–9

4. Burley SK. Structural genomics: Beyond the human genome project. Nat Genet 1999;23(2):151–7

5. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. Nature 2009;458:97–101

6. Villas-Boas SG, Gombert AK. Análise do metaboloma. Biotecnologia; Ciência & desenvolvimento 2006;36:58-69

7. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabolomics. Nature 2008;455(7216):1054–6

8. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. ‘Metabolomics’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica 1999;29:1181-9

9. Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Homes E. Metabolomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. Nat Rev Drug Discov 2009;21:153-6

10. Wenk MR. The emerging field of lipidomics. Nat Rev Drug Discov 2005;4(7):594–610

11. Watson AD. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. J Lipid Res 2006;47(10):2101–11

12. Han X. Neurolipidomics: challenges and developments. Front Biosci 2007;12:2601–15

13. Nelson DL, Cox MM. Lehninger: Principes of biochemistry. 6th ed. New York. Worth Publishers, 2013. p. 357-83.

14. Nelson DL, Cox MM. Lehninger: Principes of biochemistry. 6th ed. New York. Worth Publishers, 2013. p. 833-880

15. Nelson DL, Cox MM. Lehninger: Principes of biochemistry. 6th ed. New York. Worth Publishers, 2013. p. 668-93.

16. Botham KM, Mayes AP. Lipis of physiologic significance. In: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. Harper's Illustrated Biochemistry. 30th ed, Cenveo Publishers service, 2015. 211-65

17. Dowhan W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? Annu Rev Biochem 1997;66:199–232

18. Sherratt H.S. Introduction: the regulation of fatty acid oxidation in cells. Biochem Soc Trans 1994; 22:421–2

19. Harwood JL. Fatty acid metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol 1988;39:101–38

20. Wanders RJA, van Grunsven EG, Jansen GA. Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid and oxidation systems in humans Biochem Soc Trans 2000; 28:141–8

21. Kennedy EP. The metabolism and function of complex lipids. Harvey Lect 1962;57:143-71

22. Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. Biochem Soc Trans 2002;30:1059–64

23. Kunau WH, Dommes V, Schulz H. Oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. Prog Lipid Res 1995;34:267–342

24. Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. Biochim Biophys Acta 2000;1486:1–17

25. Kolpeman PG. Obesity as a medical problem. Nature 2000;404:20-2

26. Herman-Edelstein M, Scherzer P, Tobar A, Levi M, Gafter U. Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy. J Lipid Res 2014;55(3):561-72

27. Lopez S, Bernudez B, Pacheco YM. Distinctive postprandial modulation of β cell function and insulin sensitivity by dietary fats: monounsaturated compared with saturated fatty acids Am J Clin Nutr 2008;88:638-44

28. Yao F, Li Z, Ehara T, Yang L, Wang D, Feng L et al. Fatty acid-binding protein 4 mediates apoptosis via endoplasmic reticulum stress in mesangial cells of diabetic nephropathy. Mol Cell Endocrin 2015;1411:232-42

29. de Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, Cozma AI, Ha V, Kishibe T et al. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. BMJ 2015;351:h3978

30. Vander Vusse GJ. Albumin as fatty acid transport. Drug Met and Pharm 2008;88:638-44

31. Roy D, Kumar V, James J, Shihabudeen MS, Kulshrestha S, Goel V et al. Evidence that chemical chaperone 4-phenylbutyric acid binds to human serum albumin at fatty acid binding sites. PLoS One 2015 Jul 16;10(7):e0133012

32. Høstmark AT. Serum fatty acid/albumin molar and the risk of diseases. Medical Hypotheses 1995; 44:539-41

33. Gong R, Dworkin LD, Brenner BM, Maddox DA. The renal circulations and glomerular ultrafiltration. In: Skvorecki K, Chestow GM, Marsden PA.. Brenner & Rector's The Kidney. 10th ed. Philadelphia. Elsevier, 2016. p. 91-120.

34. Kone BC. Energy production to fuel solute transporte. In: Skvorecki K, Chestow GM, Marsden PA. Brenner & Rector's The Kidney. 10th ed. Philadelphia. Elsevier, 2016. p. 130-52.

35. Rutkowoki B, Szolkiewicz M, Korczynska J, Sucajtys E, Stelmanska E, Nieweglowski T et al. The role of lipogenesis in the development of uremic hyperlipidemia. Am J Kidney Dis 2003;41(suppl 1):584–8

36. Nishizawa Y, Shoji T, Nishitani H, Yamakawa M, Konishi T, Kawasaki K et al. Hypertriglyceridemia and lowered apolipoprotein C-II/C-III ratio in uremia: effect of a fibric acid, clinofibrate. Kidney Int 1993;44:1352–9

37. Barton CH, Vaziri ND. Dyslipoproteinemia associated with chronic renal failure. In: Lancire N, Metha R. Complications of Dialysis. New York: Marcel Bekker.2000;29:517–57

38. Bianchi S, Bigazzi R, Caiazza A, Campese VM. A controlled, prospective study of the effects of atorvastatin on proteinuria and progression of Kidney disease. Am J Kidney Dis 2004;341(3): 565-70

39. Oda H, Keane WF. Lipids in progression of renal disease. Kidney Int 1997;52 (suppl 62): 536–8

40. Goral S. Levocarnitine's role in the treatment of patients with end stage renal disease. Dialysis &Transplantation 2001;30(8):530-9

41. Guarniere G, Situlin R, Biolo G. Carnitine Metabolism in uremia. Am J Kidney Dis 2001;38(suppl 1):S63-7

42. Ahmad S, Dasgupta AE, Kenny MA. Fatty acid abnormalities in hemodialysis patients: effect of L- carnitine administration. Kidney Int 1989;36(suppl 27):S243-6

43. Ahmad S. L-carnitine in dialysis patients. Seminars in Dialysis. 2001;14(3):209-17

44. Wang ZW, Jiang T, Li JP, Proctor G, McManaman JL, Lucia S et al. Regulation of renal lipid metabolism, lipid accumulation, and glomerulosclerosis in FVBdb/db mice with type 2 diabetes. Diabetes 2005;54:2328–35.

45. Gordon GB. Saturated free fatty acid toxicity II lipid accumulation, ultrastructural alterations, and toxicity in mammalian cells in culture. Exp Mol Pathol 1997;27:262-27

46. Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA McMillin JB, Dowhan W. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitateinduced cardiomyocyte apoptosis. J Biol Chem 2001;276(41):38061-7

47. Lee Y, Hirose H, Ohmeda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH. Beta-Cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte beta-cell relationships. Proc Acad Sci 1994;91:1078-82

48. Weimberg MM. Lipotoxicity. Kid Int 2006;70:300-7

49. Ruggiero C, Elks CM, Kruger C, Cleland E, Addison K, Noland RC et al. Albumin-bound fatty acids but not albumin itself alter redox balance in tubular epithelial cells and induce a peroxide-mediated redox-sensitive apoptosis. Am J Nephrol 2014;306(8):F896-906.

50. Sieber J, Jehle AW. Free fatty acids and their metabolism affect function and survival of podocytes. Front Endocrinol 2014;27(5):186

51. Unger RH, Clark GO, Scherer PE. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. Biochim Biophys Acta 2010;1801:209–14

52. Unger RH, Orci L. Lipoapoptosis: Its mechanism and its diseases. Biochem Biophys Acta 2002;1585:202–12

53. Kusminki CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. Apoptosis 2009:14(12):1484-95

54. Mcphail LC, Clayton CC and Snyderman R. A potencial second messenger role for unsaturated fatty acids: activation of Ca2+ -dependent protein kinase. Science 1984;224: 622-5

55. Messineo FC, Rathier M, Favreau C, Watras J, Takenaka H. Mechanisms of fatty acid effects on sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem 1984;259:1336-43

56. Stojilkovic MP, Lopes HF, Zhang D, Morrow JD, Goodfriend TL, Egan BM. Increasing plasma fatty acids elevates F2-isoprostanes in humans: implications for the cardiovascular risk factor cluster. J Hypertens 2002:20(6):1215-21

57. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Meigs JB, Manson JE, Rifai N, Stampfer MJ et al. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. J Nutr 2005 Mar;135(3):562-6.

58. Wang Y , Qian Y, Fng Q, hong P, Li W, Wang L et al. Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. Nat Commun 2017;8:13997

59. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenage-2 mediated through Toll-like receptor 4. J Biol Chem 2001;276:16683-9

60. Coll T, Eyre E, Rodríguez-Calvo R, Palomer X, Sánchez RM, Merlos M et al. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. J Biol Chem 2008;283(17):11107-16

61. Tumova J, Andel M, Trnka J. Excess of free fatty acids as a cause of metabolic dysfunction in skeletal muscle. Physiol Res 2016;65(2):193-207

62. Artwohl M, Roden M, Waldhausl W, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. The Faseb Journal 2004;18:146-8

63. Ronckefeller P, Ring J, Muschett V, Beranek A, Buettner S, Carmona-Gutierrez D et al. Fatty acids trigger mitochondrion-dependent necrosis. Cell Cycle 2010;9(14):2836-42

64. Zhou YT. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97(4):1784-9

65. Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leucocyte lipid bodies – biogenesis and function in inflammation. Biochimica et Biophysica Acta2009;1791:540-51

66. Burth P, Younes-Ibrahin M, Gonzales FH. Purification and characterization of Na,K-ATPase inhibitor found in a endotoxin of leptospira interrogans. Infec Immun 1997;65:1557-60

67. Burth P, Younes-Ibrahin M, Santos MC, Castro-Faria Neto HC, de Castro Faria MV.. Role nonesterified unsaturated fatty acids in the pathophysiological processes of leptospiral infection. J Inf Dis 2005;191:51-7

68. Albuquerque CTG, Burth P, Silva AR, Younes-Ibrahim M, Castro-Faria-Neto HC, Castro-Faria MV. Leptospira and inflammation. Mediators Inflamm 2012; 2012:317950

69. Matthay MA, Zimmeman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. Am J of Respir Celular Mol Biol 2005;33:319-27

70. Wymann MP, Schneiter R. Lipid signaling in disease. Nat rev mol cell boil 2008;9:162-76

71. Younes-Ibrahim M. Na,K-ATPase: a molecular target for Leptospira interrogans endotoxin. Braz J Med Biol Res 1997;30(2):213-23

72. Younes-Ibrahin M, Burth P, Castro Faria M V, Buffin-Meyer B, Marsy S, Barlet-Bas C et al. Inhibition of Na,K-ATPase by a endotoxin extrated from leptospira interrogans: a possible mechanism for the physiophatology of leptospirosis. C R Acad Sci III 1995;318(5):619-25

73. Ahmed K, Thomas BS. The effects of long chain fatty acids on sodium plus potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase of rat brain. J Biol Chem 1971;246:103-9

74. Macgregor SE, Walker JM. Inhibitors of the Na+,K+-ATPase. Comp Biochem Physiol 1993; 105(1):1-9

75. De Pablo MA, De Cienfuegos GA. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. Immunology e Cell Biology 2000;78(1):31-39

76. Albuquerque CFG, Burth P, Younes-Ibrahin M, Garcia DG, Bozza PT, Castro Faria Neto HC, Castro Faria MV. Reduced plasma nonesterified fatty acid levels and the advent of an acute lung injury im mice after intravenous or enteral oleic acid administration. Mediators inflamm 2012;2012:601032

77. Stulnig TM. Elevated serum free fatty acid concentrations inhibit T lymphocyte signaling. FASEB J 2000;14(7):939-47

78. Buttke TM, Cuchens MA. Inhibition of lymphocyte proliferation by free fatty acids II Toxicity of stearic acid towards phytohaemagglutinin- activated T cells. Immunology 1984;53:507-14

79. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J Clin Invest 2006;116:3015–25

80. Eguchi k, Manabe I. Toll-like receptor, lipotoxicity and chronic inflammation: the pathological link between obesity and cardiometabolic disease. J Atheroscler Thromb 2014;21(7):629-39

81. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. Nat Med 2005;11:183–190

82. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. J Clin Invest 2006;116:1793–1801

83. Yang CW, Wu MS, Pan MJ. Leptospira outer membrane protein activates NF-kappaB and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. J Am Soc Nephrol 2000;11:17–26

84. Hwang D, Jang BC, Yu G. Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages. Biochem Pharmacol 1997;54:87-96

85. Rhee SH, Hwang D. Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. J BiolChem 2000;275(44):34035-40

86. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. Circ Res 2007;100(11):1589-96

87. Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Christian B, Demeure O. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. J Nutr 2005;135(11):2503-6

88. Kume S, Uzu T, Araki S, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M et al. Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. J Am Soc Nephrol 2007; 18:2715–23

89. Arany I, Clark JS, Reed DK, Juncos LA, Dixit M. Role of p66shc in renal toxicity of oleic acid. Am J Nephrol 2013;38(3):226-32

90. Lieberthal W, Sheridan AM, Schwartz JH. Fatty acid-induced cytotoxicity: differences in susceptibility between MDCK cells and primary cultures of proximal tubular cells. J Lab Clin Med 1997;129(2):260-5

91. Schonefeld M. Hypoxia-induced amphiphiles inhibit renal renal Na^+, K^+- ATPase. Kidney Int1996;49:1289-96

92. Schimitz PG ,Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF. Lipids and progressive renal injury. Seminars in Nephrol 1989;9(4):354-69

93. Bobulescu I A. Renal lipid metabolism and lipotoxicity. Curr Opin Nephrol Hypertens 2010;19:393–402

94. Vinetz JM, Mueller P, Kaslow DC. Sporadic urban leptospirosis. Ann Intern Med 1996;125:794–98

95. Martins CA. Lipotoxicidade na leptospirose humana: aspectos prognósticos e potencial efeito benéfico da administração de albumina. Rio de Janeiro. Tese [doutorado em Medicina] - Universidade Estadual do Rio de Janeiro: 2011.

96. Prabha PS, Das UN, Ramesh G, Kumar KV, Kamalakar V. Free radical generation, lipid peroxidation and essential fatty acids in patients with septicemia. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1991;42(1):61-5

97. Cardwell RJ, Birkhahn RH, Crist KA, Lee EM, Thomford NR. Palmitate and stearate kinetics in the rat during sepse and trauma. J Surg Res 1991;50(1):51-6

98. Rosen HR, Tuchler H. Pulmonary injury in acute experimental pancreatitis correlates with elevated levels of free fatty acids in rats. HPB Surgery 1992;6:79–90

99. Sztefko K, Panek J. Serum free fatty acid concentration in patients with acute pancreatitis. Pancreatology 2001;1:230–6

100. Nogueira AC, Kawabata V, Biselli P, Lins MH, Valeri C, Seckler M et al. Changes in plasma free fatty acid levels in septic patients are associated with cardiac damage and reduction in heart rate variability. Shock 2008;29:342–3

101. Munford RS. Severe sepse and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. Annu Rev Pathol 2006;1:467–96

102. Maitra U, Chang S, Singh N, Li l. Molecular mechanism underlying the suppression of lipid oxidation during endotoxemia. Mol Immunol 2009;47(2–3):420–5

103. Abel JJ, Rowntree LG, Turner BB. On the removal of difusable substances from the circulating blood by means of dialysis. Transactions of Association of American Physicians 1913. Transfus sci 1990;11:164-6

104. Skvorecki K, Chestow GM, Marsden PA. Brenner & Rector's The Kidney. 10th ed. Philadelphia. Elsevier, 2016;65:2058-2109

105. Lowrie EG, Lew NL. Death risk in hemodialysis patients: the predictive value of commonly measured variables and evaluation of death rate differences between facilities. Am J Kidney Dis 1990;15(5):458-82

106. Ferreira TCA. Análise do perfil de AG não esterificados (C14 a C18) no sangue de pacientes portadores de disfunção renal crônica submetidos a tratamento conservador, hemodiálise e transplante renal. Tese [Mestrado em Nefrologia] -- Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2003.

107. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW**,** Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M et al. The third international consensus definitions for sepse and septic shock (sepse-3). JAMA 2016;315:801-10

108. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR. V diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. São Paulo: Sociedade Brasileira de Cardiologia; 2013. Vol.101 no.4, supl.1.

109. Yu L, Santos BFC, Burdmann EA. Insuficiência renal aguda. Diretrizes da AMB e Sociedade Brasileira de Nefrologia. São Paulo; Comitê de Insuficiência Renal Aguda da Sociedade Brasileira de Nefrologia; 2007. Relatório 1.

110. Romao JE. Doença renal crônica: Definição, epidemiologia e classificação. J Bras Nefrol 2004;3:1-3

111. Dole VP, Meinertz H. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. J Biol Chem 1960;235:2595-99

112. Püttman M, Krug H, von Ochsenstein E, Kattermann R. Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range. Clin Chem 1993;39(5):825-32

113. Guimarães LFL, Collins CH. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Introdução a métodos cromatográficos. 4 ed. Campinas: Editora Unicamp; 1990. p.183-206.

114. Basu SP, Rao SN, Hatsuck JA. Influence of fatty acid and time focusing on the isoeletric focusing of human plasma albumin. Biophys acta 1978;533:66-73

115. Doumas BT, Watson WA, Biggs G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin Chim Acta 1971;31:87-96

116. Chen RF. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. J Biol Chem 1967; 242:173–81

117. Owen WF Jr, Lew NL, Liu Y, Lowrie EG, Lazarus JM. The urea reduction ratio and serum albumin concentration as predictors of mortality in patients undergoing hemodialysis. N Engl J Med 1993 Sep 30;329(14):1001-6

118. Nguyen A, Rudge SA, Zhang Q, Wakelam MJ. Using lipidomics analysis to determine signalling and metabolic changs in cells. Curr Opin Biotechnol 2017;43:96-103

119. Fahy E, Sud M, Cotter D, Subramaniam S. LIPID MAPS online tools for lipid research. Nucleic Acids Research 2007;35:w606-12

120. Wood LG, Scott HA, Garg ML, Gibson PG. Innate immune mechanisms linking non-esterified fatty acids and respiratory disease. Prog Lipid Res 2009;48(1):27–43

121. Wang L, Hu C, Liu S. Plasma lipidomics investigation of Hemodialysis effects by using Liquid Chromatography-MassSpectrometry. J Proteome Res 2016;15:1986-9

122. Djousse L, Benkeser D, Arnold A, Kizer JR, Zieman SJ, Lemaitre RN et al. Plasma free fatty acids and risk of heart failure: the cardiovascular health study. CDRC Heart Fail 2013; 6(5):964–9

123. Krishan S, Richardson DR, Sahni S. Gene of the month. AMP kinase (PRKAA1). J Clin Pathol 2014; 67(9):758–63

124. Canbay A, Bechmann L, Gerken G. Lipid metabolism in the liver. Z Gastroenterol 2007;45(1):35–41

125. Mattiasson G, Sullivan PG. The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. Antioxid Redox Signal 2006;8(1–2):1–38

126. Mailloux RJ, Harper ME. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. Free Radic Biol Med 2011;51(6):1106–15

127. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. J Lipid Res 2004;45(7):1169–96

128. Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. Nat Struct Biol 1998;5(9):827–35

129. Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T et al. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. J Biol Chem 2005;280:32317–25

130. Jiang T, Liebman SE, Lucia MS, Phillips CL, Levi M. Calorie restriction modulates renal expression of sterol regulatory element binding proteins, lipid accumulation, and age-related renal disease. J Am Soc Nephrol 2005;16:2385–94

131. Hamilton J A. Fatty acid transport: difficult or easy? J Lipid Res 1998;39:467–481

132. Varga Z, Kárpáti I, Paragh G, Buris L, Kakuk G. Relative abundance of some free fatty acids in plasma of uremic patients: relationship between fatty acids, lipid parameters, and diseases. Nephron. 1997;77(4):417-21

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e esclarecido

Termo de Consentimento Livre e esclarecido

Nome:_____ Prontuário: _____

Projeto: "Biodisponibilidade dos Ácidos Graxos de Cadeia Longa em Pacientes com doença Renal",

Pesquisador responsável: Marcos Roberto Colombo Barnese tel celular (21) 91561932

Eu, _____, abaixo assinado, declaro ter pleno conhecimento do que se segue:

1) Objetivos da pesquisa: avaliar o perfil doas ácidos graxos de cadeia longa em pacientes com doença renal.

2) Procedimentos: Serão coletados dados de identificação, avaliação clinica e laboratorial, mantendo-me em acompanhamento hospitalar e ambulatorial do HUPE (Hospital Pedro Ernesto), submetendo-me a exame clínico, coleta de sangue venoso periférico para análise laboratorial.

3) Desconfortos ou riscos esperados: Não existe.

4) Benefícios: Receberei o resultado da avaliação após o término da pesquisa e contribuirei para o beneficio do diagnóstico e tratamento dos pacientes com doença renal.

Estou ciente da possibilidade de retirar o meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu tratamento; mesmo que os dados venham a ser publicados ou divulgados, será mantido o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade; que obterei informações atualizadas durante o estudo.

Aceito voluntariamente participar desta pesquisa, considerando claras e satisfatórias as informações acima expostas.

Rio de Janeiro , _____ de _____ de 20___.

_____ _____

Assinatura do paciente Dr. Marcos R. C. Barnese CRM 5260689-1

_____

Testemunha

Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato ao Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE elaborado em 2013, versão 1

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030

TEL: 21 2868-8253 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br

ANEXO B - Aceite para publicação da Revista Journal Critical Care

ASSOCIAÇÃO DE MEDICINA INTENSIVA BRASILEIRA

Prezado(a) Dr(a). MARCOS ROBERTO COLOMBO BARNESE

Em nome da Comissão do XIII Congresso Mundial de Medicina Intensiva e XXII Congresso Brasileiro de Medicina Intensiva - CBMI, temos a honra em lhe Informar que seu trabalho **EFFECT OF HEMODIALYSIS ON SERUM FREE FATTY ACIDS LEVELS IN SEPTIC PATIENTS WITH ACUTE RENAL FAILURE**, da categoria **SUPORTE NUTRICIONAL, METABÓLICO E RENAL**, foi um dos 136 trabalhos selecionados para ser publicado na revista internacional **JCC - Journal Critical Care.**

Desde já parabenizamos por mais essa conquista.

Comissão Científica do XIII Congresso Mundial de Medicina Intensiva e XXII Congresso Brasileiro de Medicina Intensiva - CBMI