

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**INFLUÊNCIA DO TIPO DE MEMBRANA DE
HEMODIÁLISE E DA SUA REUTILIZAÇÃO NOS
MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Iara Bertoncello

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**INFLUÊNCIA DO TIPO DE MEMBRANA DE HEMODIÁLISE E
DA SUA REUTILIZAÇÃO NOS MARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO**

Por

Iara Bertoncello

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Maria Rosa Chitolina Schetinger
Orientadora

João Batista Teixeira da Rocha
Co-Orientador

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
dissertação de Mestrado

**INFLUÊNCIA DO TIPO DE MEMBRANA DE HEMODIÁLISE E DA SUA
REUTILIZAÇÃO NOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

elaborada por

Iara Bertoncello

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Maria Rosa Chitolina Schetinger
(Presidente/Orientador)**

Profa. Dra. Tatiana Emanuelli (UFSM)

Profa. Dra. Marilise Escobar Bürger (UFSM)

Santa Maria, 11 de julho de 2007.

*Ao Leonardo,
que nasceu e cresceu durante a realização
deste trabalho,
e é a alegria de nossa vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao final desta caminhada, gostaria de manifestar minha gratidão a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço:

ao meu esposo Algir, pelo companheirismo, amor, pelo ombro amigo, pela força em todos os momentos;

à minha mãe, Lourdes, pela presença, pela ajuda, pelas horas com o Leonardo na minha ausência;

à Profa. Maria Rosa e ao Prof. João Batista, pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos e especialmente pela paciência;

à Andreza e à Rosane, pela amizade e pela ajuda a “reencontrar o caminho”;

aos pacientes da hemodiálise, pela disposição em colaborar com este estudo;

ao Departamento de Análises Clínicas desta Universidade, por ceder o laboratório e ao pessoal que me ajudou a realizar as análises deste trabalho, Andreza, Rosane, Elisangela, Daiana, Dievan e Sally.

ao pessoal do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM, pelo incentivo e pela torcida, ao Elehú, por permitir o afastamento e as colegas do setor de hematologia, Rejane, Marta, Fátima por assumir o meu trabalho durante o afastamento;

ao médico Luis Cláudio e a enfermeira Macilene, que colaboraram na parte experimental deste estudo;

à Deus, pela presença em minha vida e pela força.

Com todos quero compartilhar esta vitória e dizer, **MUITO OBRIGADA!!!**

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

INFLUÊNCIA DO TIPO DE MEMBRANA DE HEMODIÁLISE E DA SUA REUTILIZAÇÃO NOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

AUTOR: Iara Bertoncello

ORIENTADORA: Maria Rosa Chitolina Schetinger

CO-ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, julho de 2007.

Neste trabalho, foram investigados os efeitos do tipo de membrana de hemodiálise (HD) e da sua reutilização, bem como os efeitos da sessão de HD nos marcadores de estresse oxidativo. Pacientes com insuficiência renal crônica que realizavam HD três vezes por semana foram divididos em dois grupos, de acordo com o tipo de membrana usada (membrana de acetato de celulose (AC) X membrana de polisulfona (PS)). Todos os pacientes participaram dos dois grupos e usaram os dois tipos de membrana. Para análise dos parâmetros, amostras de sangue foram coletadas antes e após a sessão de HD, no 1º uso, 6º e 12º reuso das membranas. Os parâmetros indicadores de estresse oxidativo analisados foram: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espécies reativas a diclorofluoresceína (DRS), carbonilação de proteínas, antioxidantes enzimáticos (catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase (GSH-Px)) e antioxidantes não-enzimáticos (grupos tióis protéicos (PSH), grupos tióis não-protéicos (NPSH) e vitamina C). Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa nos marcadores do estresse oxidativo entre as duas membranas usadas. Entretanto, houve um aumento dos níveis de TBARS após a sessão de HD (no 1º uso e no 6º reuso), de DRS (6º e 12º reuso), de PSH (em todos os usos), de NPSH (1º uso e 6º reuso), da atividade da GSH-Px (no 12º reuso) e uma diminuição dos níveis de vitamina C após a sessão de HD (em todos os usos). A reutilização das membranas contribuiu para o aumento dos níveis de PSH, para a diminuição dos níveis de NPSH e diminuiu os efeitos da sessão de HD sobre os níveis de TBARS. Portanto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que HD com membrana de AC ou de PS não interfere de forma diferente nos marcadores de estresse oxidativo. Entretanto, a sessão de HD pode contribuir para o aumento da geração de estresse oxidativo e a reutilização dos dialisadores parece ser eficiente como forma de redução da peroxidação lipídica nos pacientes em HD.

Palavras-chave: hemodiálise; estresse oxidativo; membrana de acetato de celulose; membrana de polisulfona; reutilização de dialisadores.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

INFLUENCE OF DIALYZER MEMBRANE TYPE AND REUSE PRACTICE ON BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS

AUTHOR: Iara Bertoncello

ADVISOR: Maria Rosa Chitolina Schetinger

CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, 2007

The effects of the dialysis membranes, hemodialysis (HD) session, and dialyzer reuse on markers of oxidative stress were studied. Patients with end stage renal disease who have undergone regular HD treatment three times a week were randomized in two study groups according to the type of HD membrane (cellulose acetate membrane (CA) vs. polysulfone membrane (PS)). All the patients participated of the two study groups and used the two different membranes. To analyze the parameters, the blood samples were collected before and after HD sessions, in the first use, 6th, 12th reuse of the membranes. The indicator parameters of oxidative stress analyzed were thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and dichlorofluorescein reactive species (DRS) levels, carbonyl groups, antioxidant enzyme (catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px)), and non-enzymatic antioxidant (protein (PSH) and non-protein thiol groups (NPSH) and vitamin C). The results demonstrated that there was no significant difference in the markers of oxidative stress between the two membranes used. However, HD session contributed to the increase in TBARS (1st use and the 6th reuse), DRS (6th and 12th reuse), protein (all uses) and NPSH (1st use and 6th reuse) levels, GSH-Px activity (12th reuse) and to the decrease in vitamin C levels (all uses). The dialyzer reuse practice contributed to the increase in the PSH levels, to the decrease in the NPSH levels and to the reduction of the effects of the HD session on the TBARS levels. Therefore, the results obtained from this study revealed that regular HD with CA or PS membranes did not interfere with the oxidative status in the patients. However, HD session may contribute to the increase of oxidative stress and the dialyzer reuse practice appears to be efficient in the reduction of the peroxidation lipidic in these patients.

Key words: hemodialysis; oxidative stress; cellulose acetate membrane; polysulfone membrane; dialyzer reuse practice.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Esquema do processo de hemodiálise.....	18
Figura 2 - Vias de ativação do sistema do complemento.....	20
Figura 3 - Potenciais vias para a ativação de neutrófilos e monócitos durante a hemodiálise.....	27

Artigo

Figura 1 - Plasma TBARS levels in 1 st use, 6 th and 12 th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes.....	49
Figura 2 – Blood DRS levels in 1 st use, 6 th and 12 th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes.....	50
Figura 3 – Erythrocyte NPSH levels in 1 st use, 6 th and 12 th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes.....	51
Figura 4 – Plasma PSH levels in 1 st use, 6 th and 12 th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes	52
Figura 5 – Plasma GSH-Px activity in 1 st use, 6 th and 12 th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes	53
Figura 6 – Plasma vitamin C levels in 1 st use, 6 th and 12 th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes	54

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1 - Comparison of the parameters monitored during HD with different membranes.....	55
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – acetato de celulose

ANOVA – análise de variância

B1st – antes do primeiro uso

B6th – antes do sexto reuso

B12th – antes do décimo-segundo reuso

A1st – após o primeiro uso

A6th – após o sexto reuso

A12th – após o décimo-segundo reuso

CAT – catalase

CFU – unidades formadoras de colônia

DNA- ácido desoxirribonucléico

DNPH – dinitrofenilidrazina

DRS – espécies reativas a diclorofluoresceína

DTNB – ácido 5-5'-ditio-bis-(nitobenzóico), reagente de Ellman

EROs – espécies reativas de oxigênio

EU – unidade de endotoxina

GSH-Px – glutathione peroxidase

GSH – glutathione reduzida

HD - hemodiálise

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IRC - insuficiência renal crônica

MDA - malondialdeído

NPSH – tióis não-protéicos

O₂⁻ - radical superóxido

OH^{*} - radical hidroxila

PS - polisulfona

PSH – tióis protéicos

SOD – superóxido dismutase

SEM – erro médio padrão

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TSR – terapia de substituição renal

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
SUMÁRIO	11
APRESENTAÇÃO	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo Geral.....	16
1.1.2 Objetivos Específicos.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Hemodiálise	17
2.1.1 Aspectos Gerais.....	17
2.1.2 Membranas.....	18
2.1.2.1 Características básicas das membranas de celulose.....	18
2.1.2.2 Características básicas das membranas sintéticas.....	19
2.2 O Sistema do Complemento	20
2.3 Reutilização do dialisador	21
2.3.1 Técnica de reprocessamento.....	21
2.3.2 Vantagens.....	22
2.3.3 Desvantagens.....	23
2.4 Estresse Oxidativo	24
2.4.1 Espécies reativas de oxigênio.....	24
2.4.2 Sistema de defesa antioxidante.....	25

2.5 Estresse oxidativo e a hemodiálise.....	26
2.6 Estresse oxidativo e a reutilização de dialisadores.....	28
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	29
3.1. Influence of dialyzer membrane type, hemodialysis session, and dialyzer reuse practice on biomarkers of oxidative stress. Iara Bertoncello, Rosane M. S. dos Santos, Dievan B. da Silva, Luís C. Arantes, Daiana S. de Ávila, Andreza F. de Bem, João B. T. da Rocha, Maria R. C. Schetinger. (Submetido/Clinical Biochemistry).....	30
4. DISCUSSÃO.....	56
5. CONCLUSÕES.....	59
6. PERSPECTIVAS.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam à íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, DISCUSSÃO e CONCLUSÕES** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crônica (IRC) consiste em uma lesão renal com perda progressiva e irreversível da função dos rins (glomerular, tubular e endócrina). Em sua fase mais avançada, chamada de fase terminal da insuficiência renal crônica, os rins não conseguem mais manter a homeostase do meio interno do paciente, necessitando assim de uma terapia de substituição renal (TSR). As opções terapêuticas para os pacientes em fase terminal de IRC, com ritmo de filtração glomerular inferior a $15 \text{ ml/minuto}/1,73\text{m}^2$, são os métodos de depuração artificial do sangue (hemodiálise ou diálise peritoneal) ou o transplante renal (JUNIOR, 2004).

As TSR são extremamente honerosas e o número de pacientes que necessitam das mesmas cresce a cada ano. Segundo o Censo 2006 da Sociedade Brasileira de Nefrologia, o número de pacientes mantidos em um programa de TSR era de 70.872, apresentando crescimento de cerca de 8.8% ao ano. Neste Censo, a hemodiálise (HD) prevalecia como principal forma de terapia (90.7%) e somente em 2002, no Brasil, foram gastos 807 milhões de reais com tratamentos dialíticos (JUNIOR et al., 2003).

A HD consiste em um sistema extracorpóreo no qual existe uma membrana semipermeável (presente no dialisador) que é responsável pela depuração do sangue (DAUGIRDAS e STONE, 2001). O contato do sangue com a membrana pode desencadear a ativação do sistema complemento (através da via alternativa) e dos leucócitos (HÖRL, 2002), levando a geração de oxidantes.

O estresse oxidativo, caracterizado como um distúrbio no equilíbrio entre a geração de oxidantes (principalmente EROs – espécies reativas de oxigênio) e a atividade do sistema antioxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999) é comumente associado as complicações relacionadas a HD. Dentre as principais destaca-se a amiloidose (artropatia β_2 microglobulina) e a aterosclerose, as quais são responsáveis pelo alto índice de morbidade e mortalidade destes pacientes (DESCAMPS-LATSCHA et al., 2001). Todavia, alguns autores têm sugerido que a HD com membranas biocompatíveis não interfere na geração de estresse oxidativo desta população (TEPEL et al., 2000; PUPIM et al., 2004).

O processo de HD pode levar ao estresse oxidativo tanto pela geração de oxidantes como pela diminuição da atividade do sistema antioxidante (LOCATELLI et al., 2003). A geração de oxidantes está relacionada à ativação de leucócitos durante o contato do sangue com a membrana, e o grau de ativação dos mesmos depende das características da membrana usada (CLARK et al., 1999; WARD e McLEISH, 2003). No entanto, os dados da literatura são controversos a esse respeito (YAVUZ et al., 2004; RAO et al., 2004; WALKER et al., 2004; WU et al., 2005).

A reutilização dos dialisadores é uma prática comum em muitas unidades de diálise, embora controvérsias recentes tenham questionado as vantagens e desvantagens desta prática (VINHAS e SANTOS, 2000; ROBINSON e FELDMAN, 2005; TWARDOWSKI, 2006; LACSON e LAZARUS, 2006). As maiores vantagens incluem a redução do custo do tratamento, a redução das reações causadas pelo primeiro uso e o aumento da biocompatibilidade do dialisador (MAIDMENT e PETERSEN, 1996; MILES e FRIEDMAN, 1997; MURTHY e PEREIRA, 2000). As maiores desvantagens incluem exposição ambiental e intravenosa aos germicidas, o risco de reações pirogênicas e infecções, bem como a diminuição da eficácia dos dialisadores (MAIDMENT e PETERSEN, 1996; MILES e FRIEDMAN, 1997).

Há poucos estudos em relação aos efeitos da reutilização de dialisadores sobre a produção de EROs e sobre a atividade antioxidante dos pacientes em HD. Tem sido evidenciado que a reutilização dos dialisadores provoca a diminuição da produção de superóxido (TRZNADEL et al., 1990) e nos níveis de malondialdeído (MDA) (KÖSE et al., 1997), bem como um aumento na atividade antioxidante (GÜNDÜZ et al., 1996). Por outro lado, há relato de que a reutilização dos dialisadores pode provocar aumento na resposta oxidativa dos leucócitos (RAO et al., 2004).

Tendo em vista que os dados da literatura são controversos em relação ao tipo e reuso de membranas de HD com a geração de estresse oxidativo, os objetivos deste trabalho foram:

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis dos marcadores de estresse oxidativo em pacientes que estejam recebendo HD, antes e após as sessões de HD, no primeiro uso, 6ª e 12ª reutilização das membranas de acetato de celulose e polisulfona.

1.1.2 Objetivos específicos

- Comparar os efeitos de duas membranas de HD (acetato de celulose e polisulfona) sobre a geração de estresse oxidativo; através da dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espécies reativas a diclorofluoresceína (DRS), carbonilação de proteínas, bem como da determinação da atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase), e dos níveis dos antioxidantes não-enzimáticos (grupos tióis protéicos e não-protéicos e vitamina C);

- Avaliar os efeitos da sessão de HD sobre a geração de estresse oxidativo através das dosagens acima mencionadas, antes e após a sessão de HD;

- Avaliar os efeitos da reutilização dos dialisadores sobre a geração de estresse oxidativo através das dosagens mencionadas anteriormente, no 1º uso, 6ª e 12ª reutilização do dialisador.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hemodiálise

2.1.1 Aspectos gerais

A hemodiálise (HD) consiste em um sistema extracorpóreo no qual existe uma membrana semipermeável que permite a passagem de solutos de baixo peso molecular do sangue para o líquido dialisador, possibilitando assim, a depuração do sangue (DAUGIRDAS et al., 2001).

Data de 1914 os primeiros experimentos com uso de um sistema extracorpóreo como terapia dialítica. Os experimentos foram avançando e descobriu-se, em 1937, que o *celofane* tinha características de uma membrana semipermeável, adequada à diálise. Em 1940, a primeira máquina de HD foi construída, que a partir de 1948 poderia ser clinicamente utilizável e estaria comercialmente disponível (D'ÁVILA e FIGUEIREDO, 1996). A primeira HD realizada no Brasil ocorreu em 1949, mas foi na década de setenta que o programa de TSR foi introduzido como rotina para os pacientes portadores de IRC em fase terminal (JUNIOR et al., 2003).

Durante a HD, o sangue obtido de um acesso vascular (cateter venoso, fístulas arteriovenosas ou próteses) é impulsionado por uma bomba para um sistema de circulação extracorpórea onde se encontra um filtro (dialisador). No filtro, através de uma membrana semipermeável, ocorrem as trocas entre o sangue e o banho de diálise (dialisato). Atualmente os equipamentos de diálise possuem vários sensores (pressão, temperatura, pressão de ar, condutividade do dialisato, volume do ultrafiltrado) que tornam o procedimento seguro e eficaz (CANZIANI et al., 2005) (figura 1).

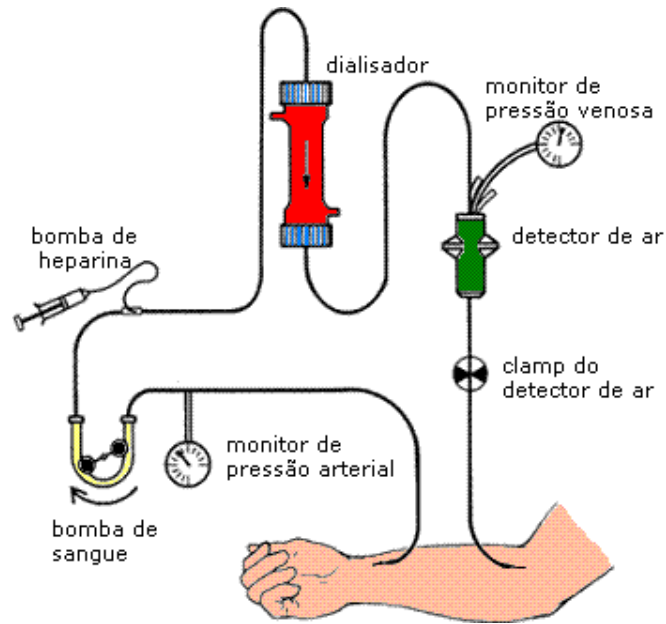


Figura 1- Esquema do processo de HD (Adaptado de DAUGIRDAS et al., 2001)

2.1.2 Membranas

As membranas, presentes no dialisador, são as responsáveis pelas trocas entre o sangue e o dialisato. Há quatro tipos de membranas usadas normalmente em HD: membranas de celulose, de celulose modificada, de celulose sintética e sintética (DAUGIRDAS et al., 2001).

2.1.2.1 Características básicas das membranas de celulose

A unidade básica das membranas de celulose é a celobiose. Quimicamente, a celobiose é uma estrutura rica em radicais hidroxil. A interação do sangue com estes radicais hidroxil durante a diálise pode levar a ativação do sistema complemento e dos leucócitos (CLARK et al., 1999; DAUGIRDAS et al., 2001). Com o passar dos anos desenvolveu-se membranas de celulose modificada, nas quais os radicais

hidroxil são substituídos por outros grupos químicos, com o intuito de diminuir a ativação do complemento.

Uma das formas de modificar as membranas de celulose é a substituição dos radicais hidroxil pelo grupo acetil. As membranas de acetato de celulose possuem pequena parcela dos radicais hidroxil substituídos por grupo acetil. Nas membranas de diacetato de cellulose, 70 a 80% dos radicais são substituídos e as membranas de triacetato de celulose possuem 100% de substituição (NETO e SANTOS, 1996; CLARK et al., 1999).

Um segundo mecanismo de substituição da celulose, é a substituição de uma pequena percentagem (menos que 5%) dos radicais hidroxil por um grupo químico volumoso, que diminui a ativação do complemento pela membrana. Estas membranas são classificadas como celulose sintética e os radicais hidroxil podem ser substituídos por um composto amino terciário ou por grupos benzil (CLARK et al., 1999; DAUGIRDAS et al., 2001).

2.1.2.2 Características básicas das membranas sintéticas

A subunidade monomérica das diferentes membranas sintéticas varia individualmente, e todas diferem significativamente da celobiose. A ausência dos radicais hidroxil na superfície das membranas sintéticas é um dos fatores responsáveis pela menor ativação do complemento em relação às membranas de celulose e as de celulose modificada (CLARK et al., 1999; DAUGIRDAS et al., 2001).

As membranas sintéticas, incluindo polisulfona, poliamida, poliacrilonitrila, polimetilmetacrilato e polivinil-álcool (NETO e SANTOS, 1996); além de apresentarem menor ativação do sistema complemento, possuem a habilidade de absorver em sua estrutura os componentes ativados do sistema complemento, diminuindo assim a resposta inflamatória e melhorando a biocompatibilidade da membrana (CLARK et al., 1999).

2.2 O Sistema do Complemento

O sistema do complemento é uma parte essencial e efetiva do sistema imune inato. É formado por uma grande quantidade de proteínas plasmáticas diferentes, que reagem entre elas para opsonizar os patógenos e induzir uma série de respostas inflamatórias que ajudam a combater a infecção (WALPORT, 2001). Este sistema pode ser ativado através de três vias distintas, porém converge para uma única etapa, a clivagem da proteína central do complemento (C3). As três diferentes vias de ativação do complemento são representadas pela via clássica, pela via da lectina e a pela via alternativa (GUASQUE, 2004) (figura 2).

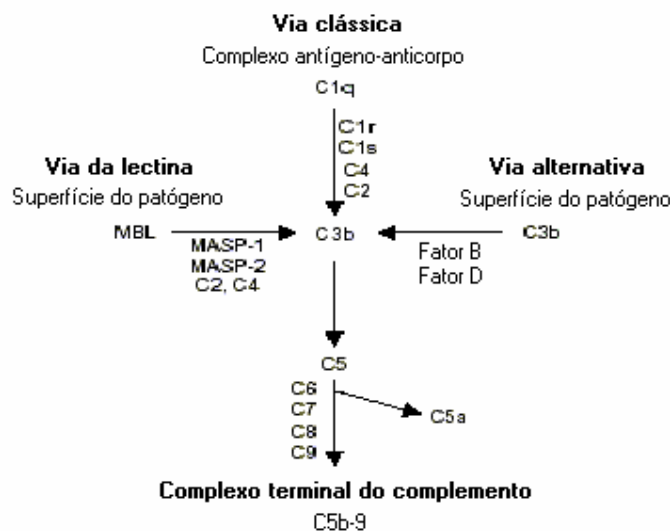


Figura 2 - Vias de ativação do sistema do complemento (Adaptado de HART et al., 2004). C= componente do sistema do complemento; MASP= serina-proteases associadas à lectinas ligadoras de manose; MBL= lectina ligadora de manose.

Este sistema age diretamente sobre os neutrófilos e monócitos, os quais uma vez ativados produzem uma variedade de produtos tóxicos. Dentre os mais importantes destaca-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido (O_2^-) e o óxido nítrico (NO) (JANEWAY et al., 2002).

2.3 Reutilização do dialisador

Em muitas unidades de diálise, a reutilização (também conhecida como reuso) de dialisadores é uma prática comum, embora controvérsias recentes tenham questionado as vantagens e desvantagens desta prática (VINHAS e SANTOS, 2000; ROBINSON e FELDMAN, 2005; TWARDOWSKI, 2006; LACSON e LAZARUS, 2006). Após o uso, o dialisador pode ser enxaguado para a retirada do sangue, limpo por meio de substâncias químicas, desinfectado e reutilizado (D'ÁVILA e FIGUEIREDO, 1996; KAUFMAN e LEVIN, 2001). Esta prática começou a ser aplicada na década de 60 (MILES e FRIEDMAN, 1997) e em 2002, essa prática era aplicada no tratamento de aproximadamente 63% dos pacientes em HD nos Estados Unidos (FINELLI et al., 2005). No Brasil, essa prática é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 154, de 15 de junho de 2004, possibilita que as membranas e as linhas arteriais e venosas possam ser utilizadas, para o mesmo paciente, até doze vezes quando for utilizado o reprocessamento manual.

2.3.1 Técnica de reprocessamento

Segundo KAUFMAN e LEVIN (2001), os principais passos para o reprocessamento do dialisador são a lavagem, a limpeza, a avaliação funcional, a desinfecção/esterilização, a remoção e a detecção do germicida. A seguir, descreveremos a técnica de reprocessamento relatada por KAUFMAN e LEVIN (2001).

A lavagem do dialisador deve ser iniciada tão logo o compartimento de sangue for esvaziado. Inicialmente é realizada com solução salina, enquanto o sangue é devolvido ao paciente. Após o dialisador é transferido a uma bancada e o processo, manual ou automático, iniciado. Usualmente, o compartimento de sangue é perfundido com água, até estar visualmente sem resíduo. A seguir, a água é ultrafiltrada a partir do compartimento externo, sob pressão.

A limpeza do dialisador é a próxima etapa. Consiste na aplicação de produto químico com a finalidade de promover a desobstrução de fibras e recuperar área do dialisador. Podem ser usados o hipoclorito de sódio, o peróxido de hidrogênio ou o ácido peracético. Alguns centros não usam esta etapa, a menos que o dialisador esteja com volume abaixo do desejado.

Em seguida é realizada a verificação da manutenção de sua capacidade funcional (avaliação funcional). O volume do compartimento sangüíneo (volume celular total, VCT) é medido, substituindo-se o compartimento totalmente preenchido de sangue por ar e medindo-se o volume de líquido obtido. Todos os dialisadores devem ser processados antes do primeiro uso para se obter um valor basal para o VCT. A mudança no VCT é então acompanhada a cada reutilização do dialisador e este só poderá ser reutilizado caso sua capacidade se mantenha maior que 80% do valor basal.

Uma vez limpo, o dialisador deve ser submetido a processos físicos ou químicos que inativem todos os organismos vivos. Germicidas são instilados geralmente nos dialisadores por 24 horas. As misturas (54.1%) de ácido peracético/peróxido de hidrogênio/ácido acético, formaldeído (37.2%) e glutaraldeído (8.8%) são os germicidas mais comuns.

Normalmente os germicidas permanecem nos dialisadores até a próxima HD. O processo de remoção do germicida envolve a retirada, por lavagem com solução fisiológica, da solução esterelizante dos tubos e do dialisador e, após, diálise em circuito fechado, contra o líquido de diálise fresco, a 37°C, durante 15 minutos.

Após este processo, é realizada a detecção da presença de resíduos de germicida no circuito sangüíneo, a qual deve ser realizada imediatamente antes do uso do dialisador. Os níveis residuais dos germicidas podem ser detectados por *Kits* de testes específicos recomendados pelos próprios fabricantes.

2.3.2. Vantagens

As maiores vantagens da reutilização de dialisadores incluem a redução do custo do tratamento, redução das reações causadas pelo primeiro uso e aumento da biocompatibilidade do dialisador (MAIDMENT, 1996; MILES e FRIEDMAN, 1997; MURTHY e PEREIRA, 2000).

A HD é um tratamento extremamente oneroso e a reutilização dos dialisadores é uma das possibilidades para a diminuição de custos deste tratamento, possibilitando assim a utilização de dialisadores mais caros (MILES e FRIEDMAN, 1997; KAUFMAN e LEVIN 2001). Além disso, a reutilização poderá diminuir as reações causadas pelo primeiro uso (dor no peito, febre, câimbras, náuseas e vômitos) e aumentar a biocompatibilidade dos dialisadores, devido à deposição de albumina, de complemento e de fibrina na membrana do dialisador. Os resíduos destas proteínas se ligam aos radicais hidroxil das membranas de celulose e efetivamente minimizam as interações entre a superfície da membrana e o sangue (MILES e FRIEDMAN, 1997; KAUFMAN e LEVIN 2001; HÖRL, 2002).

2.3.2. Desvantagens

As maiores desvantagens associadas à reutilização dos dialisadores incluem a exposição ambiental e intravenosa aos germicidas, o risco de reações pirogênicas e infecções, bem como a diminuição da eficácia dos dialisadores (MAIDMENT, 1996; MILES e FRIEDMAN, 1997).

A exposição ambiental aos germicidas, especialmente formaldeído e glutaraldeído, poderá irritar a conjuntiva e a mucosa das vias aéreas, podendo causar náuseas e vômitos. Entretanto, este efeito é minimizado quando o ácido peracético é usado. A exposição intravenosa poderá levar a formação de anticorpos “anti-N-like” e conseqüentemente hemólise, especialmente quando formaldeído é usado no reprocessamento do dialisador (TWARDOWSKI, 2006). As reações pirogênicas e infecções poderão ser desencadeadas pela contaminação do dialisador ou do dialisato com endotoxinas ou bactérias. Em geral, a fonte destes problemas é a água usada para a limpeza dos dialisadores e para o preparo dos germicidas, usados na esterilização dos dialisadores. A diminuição na filtração de uréia e da β_2 microglobulina, bem como o aumento da filtração de albumina, também poderá ser observada com o reuso dos dialisadores, porém isto está diretamente relacionado com o tipo de membrana e o método de reprocessamento usado (KAUFMAN e LEVIN, 2001).

2.4 Estresse oxidativo

2.4.1 Espécies reativas de oxigênio

Os radicais livres são definidos como átomos ou moléculas altamente reativos, que contêm um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Os radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante de radicais gerados nos sistemas vivos (VALKO et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser produzidas tanto por fontes endógenas como exógenas. As fontes endógenas incluem a mitocôndria, o citocromo P450, os peroxissomas e as células inflamatórias ativadas (INOUE et al., 2003). Diferentes fontes exógenas podem gerar, direta ou indiretamente, a formação de EROs nas células (KLAUNIG et al., 1997).

As EROs incluem o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^{\bullet}), o radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet}) e o oxigênio singlet (1O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O $O_2^{\bullet-}$ ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação de neutrófilos, de monócitos, de macrófagos e de eosinófilos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). É considerado pouco reativo, porém é rapidamente convertido a H_2O_2 e oxigênio (CONNER e GRISHAM, 1996). O H_2O_2 apesar de não ser considerado um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o OH^{\bullet} . Além disso, tem vida longa e é capaz de atravessar membranas lipídicas, sendo altamente tóxico para as células. O OH^{\bullet} é considerado a EROs mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do OH^{\bullet} com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido, confirma sua alta reatividade. Assim, o OH^{\bullet} pode causar danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA), inativar proteínas e causar lipoperoxidação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

As EROs são produtos do metabolismo normal das células e podem exercer efeitos benéficos bem como efeitos nocivos nos sistemas vivos. Os efeitos benéficos ocorrem em baixas e em moderadas concentrações, como por exemplo, o papel

fisiológico em diversas respostas celulares, tais como a resposta a agentes infecciosos e na sinalização celular. Em contraste, altas concentrações de EROs podem exercer efeitos deletérios sobre o organismo, mediando danos a estruturas celulares como os lipídios, as proteínas e o DNA (VALKO et al., 2006).

Os biomarcadores podem ser usados para indicar os danos às macromoléculas (lipídios, proteínas e DNA) causados pelo estresse oxidativo. Há uma variedade de biomarcadores, *in vivo* e *ex vivo*, que incluem medidas da oxidação ao DNA (como 8-OH-deoxiguanosina), aos lipídios (por exemplo, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e às proteínas (carbonilação de proteínas) (HWANG e KIMB, 2007).

2.4.2 Sistema de defesa antioxidante

Para combater a produção excessiva de EROs o organismo possui um mecanismo de defesa antioxidante (CADENAS, 1997), formado por componentes enzimáticos e não-enzimáticos, que normalmente mantêm um balanço de EROs dentro das células. Dentre os antioxidantes enzimáticos estão a superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), a catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) e a glutathione peroxidase (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9) e dentre os antioxidantes não-enzimáticos estão a glutathione (GSH), a vitamina C, E, os carotenóides e os flavonóides (VALKO et al., 2007).

Um dos mais efetivos antioxidantes enzimáticos intracelulares é a SOD, por catalizar a dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular (O_2) e em uma espécie menos reativa, o H_2O_2 . Contudo, o H_2O_2 é também tóxico para o organismo e deve ser detoxificado pela catalase e/ou peroxidases. A CAT, presente nos peroxissomos, é muito eficiente na conversão do H_2O_2 em água e em oxigênio molecular. A GSH-Px catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis à custa da oxidação da GSH (VALKO et al., 2006).

Além do sistema de defesa antioxidante enzimático, as defesas antioxidantes não-enzimáticas são de fundamental importância para as células. A GSH está presente na maioria das células, podendo estar livre ou ligada a proteínas, sendo o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é

determinada pelo grupamento-SH, presente na cisteína. O papel protetor da GSH contra a geração do estresse oxidativo se deve à direta destoxificação de EROs, a participação como cofator para outras enzimas antioxidantes como a GSH-Px, bem como a redução de outros antioxidantes a sua forma ativa (ARTEEL e SIES, 2001). A vitamina C é hidrossolúvel e o principal antioxidante do plasma humano, bem como das membranas celulares. A mesma exerce um efeito redutor sobre a vitamina E, sobre os hidroperóxidos e sobre os EROs. Essa vitamina normalmente previne a formação de hidroperóxidos a partir dos lipídios das lipoproteínas e das células. Intracelularmente, no meio aquoso, a vitamina C e a GSH agem em conjunto para proteger a célula do dano oxidativo (NORDBERG e ARNER, 2001). A medida dos antioxidantes circulantes também tem sido usada para avaliar a geração do estresse oxidativo em humanos (POLIDORI et al., 2001).

Em condições normais, há um equilíbrio entre as reações que envolvem os oxidantes (EROs) e os antioxidantes, sendo mantidas as condições de vida; entretanto na ocorrência de um excesso de EROs e/ou uma deficiência de antioxidantes é estabelecido o processo de estresse oxidativo, podendo culminar com efeitos nocivos para o organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

2.5 Estresse oxidativo e a hemodiálise

A presença de estresse oxidativo em pacientes que realizam HD pode ser conseqüência tanto do aumento da produção de oxidantes (EROs), bem como da redução de agentes antioxidantes (LOCATELLI et al., 2003). As evidências têm sugerido que o estresse oxidativo pode estar envolvido em complicações relacionadas à HD, como amiloidose (artropatia β_2 microglobulina) e aterosclerose, as quais são responsáveis pelo alto índice de morbidade e mortalidade destes pacientes (DESCAMPS-LATSCHA et al., 2001). Entretando, alguns autores tem sugerido que o início da HD não modificaria a geração do estresse oxidativo (PUPIM et al., 2004) e que HD realizada com membranas biocompatíveis não causaria aumento da produção de EROs (TEPEL et al., 2000) nos pacientes em HD.

Há dois mecanismos pelos quais a HD pode aumentar a produção de EROs. Primeiro, a interação entre o sangue e a membrana pode levar à geração de

mediadores inflamatórios, como componentes do sistema do complemento (através da via alternativa) ou fator de ativação plaquetário, que podem então estimular os neutrófilos. Segundo, os produtos bacterianos do dialisado podem atravessar a membrana e direta ou indiretamente estimular a produção de EROs pelos neutrófilos (figura 3) (WARD e McLEISH, 2003).

A geração de oxidantes pelos neutrófilos é baseada na produção de EROs via redução do O_2 : exposição a estímulo apropriado, ambos, macrófagos e neutrófilos ativados aumentam o consumo de O_2 (também chamado de *burst* ou explosão respiratória). O sistema enzimático NADPH oxidase, que é ligado às membranas celulares, reduzem o O_2 a $O_2^{\bullet-}$, o qual é altamente instável e logo que é formado, é convertido H_2O_2 . Ambos $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 são precursores para a produção de mais oxidantes (LOCATELLI et al. 2003).

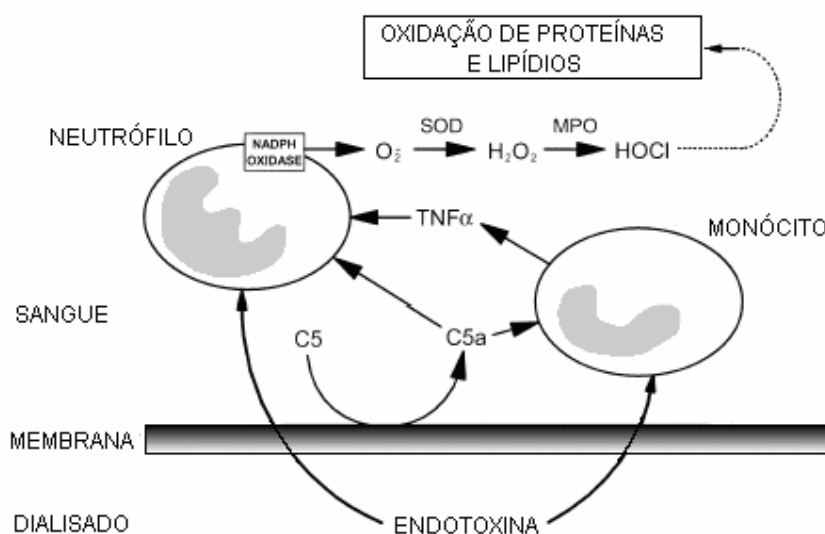


Figura 3 - Potenciais vias para a ativação de neutrófilos e monócitos durante a HD (Adaptado de WARD e McLEISH, 2003). C5= componente do sistema do complemento; TNF= fator de necrose tumoral; SOD= superóxido dismutase; MPO= mieloperoxidase.

De fato, o processo de HD tem sido associado ao aumento da produção de EROs pelos neutrófilos (KUWAHARA et al., 1988; GASTALDELLO et al., 2000) e a ativação dos mesmos pode estar relacionada ao tipo de membrana usada. As membranas de celulose estão associadas com um significativo aumento na produção de H_2O_2 (WARD e McLEISH, 1995; GASTALDELLO et al., 2000). Por

outro lado, uma menor produção de EROs é observada quando membranas de celulose modificada ou membranas sintéticas são usadas (WARD et al., 2003; HERNANDEZ et al., 2004). Além disso, a HD tem sido associada ao aumento na concentração de produtos da peroxidação lipídica (NGUYEN-KHOA et al., 2001; OZDEN et al., 2002; YAVUZ et al., 2004) e a um aumento na modificação de proteínas (HIMMELFARB, 2000; NGUYEN-KHOA et al., 2001; WU et al., 2005).

A HD também tem sido associada à diminuição do sistema antioxidante (CHAO et al., 2002;), incluindo a diminuição na atividade do sistema glutatona e da SOD (CEBALLOS-PICOT et al., 1996; WEINSTEIN et al., 2000), bem como a diminuição na concentração de vitamina C plasmática (BÖHM et al., 1997; CLERMONT et al., 2000; CHAO et al., 2002).

2.6 Estresse oxidativo e a reutilização de dialisadores

A reutilização dos dialisadores tem sido associada ao aumento da biocompatibilidade das membranas devido à deposição de albumina, de complemento e de fibrina na membrana do dialisador. Os resíduos destas proteínas se ligam aos radicais hidroxil das membranas de celulose e efetivamente minimizam as interações entre a superfície da membrana e o sangue (MILES e FRIEDMAN, 1997; KAUFMAN e LEVIN 2001; HÖRL, 2002;). Ocorre, então, uma menor ativação do sistema do complemento (MURTHY e PEREIRA, 2000) e conseqüentemente uma menor produção de EROs.

Há poucos estudos em relação aos efeitos da reutilização de dialisadores sobre a produção de EROs e sobre a atividade antioxidante dos pacientes em HD. Tem sido evidenciado que a reutilização provoca diminuição da produção de superóxido (TRZNADEL et al., 1990) e nos níveis de MDA (KÖSE et al., 1997), bem como um aumento na atividade antioxidante (GÜNDÜZ et al., 1996). Por outro lado, há relato de que a reutilização pode provocar aumento na resposta oxidativa dos leucócitos (RAO, et al. 2004).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que foi submetido para publicação na Revista *Clinical Biochemistry*.

3.1- Influence of dialyzer membrane type and dialyzer reuse practice on biomarkers of oxidative stress

Iara Bertoncello, Rosane Maria Souza dos Santos, Dievan Bisognin da Silva, Luís Claudio Arantes, Daiana Silva de Ávila, Andreza Fabro de Bem, João Batista Teixeira da Rocha, Maria Rosa Chitolina Schetinger

Artigo submetido para publicação na Revista *Clinical Biochemistry*

Title of the work:

Influence of dialyzer membrane type and dialyzer reuse practice on biomarkers of oxidative stress

Iara Bertoncetto^a, Rosane M. S. dos Santos^a, Dievan B. da Silva^a, Luís C. Arantes^b,
Daiana S. de Ávila^a, Andreza F. de Bem^a, João B. T. da Rocha^a, Maria R. C.
Schetinger^a

^aDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas

^bHospital Universitário de Santa Maria

Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS,
Brazil

Corresponding authors:

Maria Rosa Chitolina Schetinger and João Batista Teixeira da Rocha

Fax: + 55-5532208978

Departamento de Química, CCNE

Universidade Federal de Santa Maria,

Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

e-mail: mariaschetinger@gmail.com and jbtrocha@yahoo.com.br

Abstract

Objectives: To investigate the effects of the dialysis membrane, hemodialysis (HD) session and dialyzer reuse on markers of oxidative stress.

Design and methods: Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and dichlorofluorescein reactive species (DRS) levels; protein carbonyl, protein and non-protein thiol groups (NPSH); catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities, and vitamin C levels were measured in HD patients before and after HD session in the first use, 6th and 12th reuse, using cellulose acetate and polysulfone membranes.

Results: No differences in the markers of oxidative stress between the membranes were observed. HD session contributed to the increase in TBARS, DRS, protein, and NPSH levels, GSH-Px activity and to the decrease in vitamin C levels. The dialyzer reuse influenced TBARS, protein and NPSH levels.

Conclusions: Findings indicate that HD session may contribute to the increase of oxidative stress, and dialyzer reuse appears to be efficient in the reduction of lipid peroxidation.

Key Words: hemodialysis; oxidative stress; cellulose acetate membrane; polysulfone membrane; dialyzer reuse.

1. Introduction

The imbalance between the formation of reactive oxygen species (ROS) and the activity of antioxidative mechanisms is called oxidative stress [1], which may contribute to dialysis-related complications, such as β_2 microglobulin arthropathy and atherosclerosis that is responsible for the high rate of morbidity and mortality in hemodialized patients [2].

The hemodialysis (HD) procedure is associated with an increase in the production of ROS by neutrophil [3, 4]. Interactions between blood and the dialyzer membrane could lead to the generation of inflammatory mediators, such as the complement components or platelet activating factor, which may then stimulate neutrophil [5]. Important factors in this respect are the properties of the dialysis membranes and its chemical structure in particular [6]. In fact, a recent study has indicated that HD increased the production of oxidants [4, 7], the serum concentration of lipid peroxidation products [8-10] and the modification of proteins [7, 8, 11]. Furthermore, HD has been associated with the decrease in the total antioxidant status [12], decreased activity in the glutathione antioxidant system and the superoxide dismutase [13, 14] and the decrease of plasma concentrations of vitamin C [12, 15, 16,]. However, there are studies which report that the initiation of HD does not have significant influence on plasma protein carbonyl content [17] and that HD session using biocompatible membranes has no effect on the elevated intracellular ROS in HD patients [18].

Another important factor regarding the oxidative stress in HD patients is the dialyzer reuse practice, which has become common in many dialysis units, although a new controversy has recently questioned the advantages and disadvantages of this practice [19-21]. The major advantages of reprocessing include reduced cost, reduced first use syndrome and intradialytic symptoms that may be a result of increased biocompatibility with reuse [22]. There are a few studies related to the effects of dialyzer reuse on ROS production and antioxidant activity in HD patients. Some studies reported beneficial effects of dialyzer reuse on oxidative stress [23-25]. In contrast, there are studies reporting that the reuse process may increase the oxidative response of polymorphonuclear leukocyte [26].

The aim of our study was to evaluate the effects of the use of two dialysis membranes (cellulose acetate and polysulfone), as well as the effects of HD session and dialyzer reuse practice on biomarkers of oxidative stress in patients on regular HD treatment.

2. Patients and methods

2.1 Patients

Patient blood samples were obtained from the Department of Nephrology, University Hospital of Santa Maria. A study protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria, protocol number 025/05 and informed consent was obtained from all the patients.

The study was performed in fourteen patients (9 males, 5 females, range 24-66 years) with end stage of renal disease, who have undergone regular HD treatment three times a week for 51.1 months (range 3 – 110). Exclusion criteria were subjects with acute renal failure, age < 18 years, intercurrent infection and a medical problem in need of emergency intervention. Etiologies of the patient renal diseases were diabetic nephropathy (3), polycystic kidney disease (1), hypertension (1), nephrosclerosis (2) among others (7). Levels of calcium, phosphorus, potassium, and hematocrit were included in regular patients in monthly laboratory reports. All efforts were made to keep laboratory parameters within acceptable ranges through established protocols. Recombinant human erythropoietin and intravenous iron were prescribed to keep hematocrit within the range of 33% to 36%, and transferrin saturation greater than 20%.

For this study, the patients were randomized in two study groups according to the type of HD membrane (cellulose acetate membrane (CA) vs. polysulfone membrane (PS)). All patients participated of the two study groups and used the two different membranes to diminish the variability of the protocol study. Half of the patients were first subjected to HD with CA membrane, while the other half was first subjected to HD with PS membrane. Since the order of the use of the membranes did not modify the results (data not shown), all the patients were pooled. To analyze the HD sessions and dialyzer reuse practice, blood samples were collected from arterovenous fistulas before (B) HD sessions, in the first use (B1st), 6th (B6th) and 12th

(B12th) reuse, and after (A) the HD sessions, in the first use (A1st), 6th (A6th) and 12th (A12th) reuse.

The blood was collected using heparin as anticoagulant and centrifuged at 1500g for 15 min to separate plasma and erythrocytes. The erythrocyte pellet was washed three times with cold isotonic saline. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels, dichlorofluorescein reactive species (DRS) levels, protein carbonyl groups, protein (PSH), and non-protein thiol groups (NPSH) were determined immediately. Remaining packed cells and plasma were stored at – 70°C to posterior determination of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, and vitamin C levels.

2.2 Dialysis treatment

All patients were dialyzed with high-flux biocompatible membranes (CA and PS) three times a week. The dialysate used was identical for all treatments and consisted of sodium 140 mEq/L, potassium 1.5 mEq/L, calcium 3.5 mEq/L and bicarbonate 32 mEq/L. During the dialysis the blood flow rate was generally 300 mL/min. Anticoagulation was achieved by means of a loading dose and constant infusion of heparin.

Membranes were reused for a maximum of 12 times. The process of reuse involved an initial exposure to peracetic acid diluted to a concentration of 3%. Membranes were then stored with peracetic acid for a minimum of 24 hours before the subsequent patient blood contact. Dialysate quality was checked monthly, and the bacteria and endotoxin levels were below the maximum acceptable limits (less than 2000 CFU/mL and less than 2.0 EU/mL).

2.3 TBARS plasma determination

TBARS were determined in plasma by the method of Ohkawa et al. [27], in which malondialdehyde (MDA), an end-product of fatty acid peroxidation, reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a colored complex. In brief, samples were incubated at 100 °C for 60 min in acid medium containing 0.45% sodium dodecyl sulfate and 0.6% thiobarbituric acid. After centrifugation the reaction product was determined at 532 nm using MDA as standard and the results were expressed as nmol MDA/mL plasma.

2.4 Measurement of DRS levels

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) by the Tepel et al. [18] modified was used to detect DRS levels in blood samples. DCF-DA is hydrolyzed by cellular esterases to form DCF. DCF then reacts with DRS to form the fluorescent product, 2',7'-dichlorofluorescein. In brief, blood was diluted (1:10 v/v) with Tris-HCl 10 mM pH 7.4 and DCF-DA was added to a final concentration of 10 μ M. After 10 min, the fluorescence was measured using a Shimadzu spectrofluorophotometer at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 520 nm. A standard curve using dichlorodihydrofluorescein was constructed in order to calculate and the results were expressed as nmol DCF/mL of blood.

2.5 Protein carbonyl content

Plasma was diluted at 1:80 Tris-HCl buffer pH 7.4. The protein carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. [28], with some modifications. Briefly, 1 mL aliquot was mixed with 0.2 mL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (10 mM DNPH) or 0.2 mL HCl (2 M). After incubation at room temperature for 1 h in a dark ambient, 0.6 mL of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3 % SDS), 1.8 mL of heptane (99.5 %) and 1.8 mL of ethanol (99.8 %) were added sequentially, and mixed with vortex agitation for 40 s and centrifuged for 15 min. Next, the protein isolated from the interface was washed two times with 1 mL of ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 1 mL of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer against the corresponding HCl sample (blank), and total carbonylation calculated using a molar extinction coefficient of 22,000M⁻¹ cm⁻¹ according to Levine et al. [29]. Protein content was measured by the method of Lowry et al. [30] and bovine serum albumin was used as standard.

2.6 Non-protein thiol groups (NPSH) determination

Erythrocyte NPSH were determined as described by Ellman [31]. A red blood cell pellet (0.3 mL) was hemolized with 0.1 mL 10 % triton solution for 10 min. Then, the protein fraction was precipitated with 0.2 mL of 20 % trichloroacetic acid followed by centrifugation. The colorimetric assay was carried out in 0.85 mL of phosphate buffer 1M, pH 7.4, 0.05 mL of 5, 5' dithio (bis-nitrobenzoic) acid (DTNB). A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate the non-protein thiol

groups. The NPSH level was measured at 412 nm and expressed as nmol NPSH/mL of packed RBC.

2.7 Protein thiol groups (PSH) determination

PSH were determined as described by Ellman [31]. The plasma (0.2 mL) for the colorimetric assay was carried out in 0.85 mL of phosphate buffer 0.3 M, pH 7.0, 0.05 mL of 5, 5' dithio (bis-nitrobenzoic) acid (DTNB). A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate the protein thiol groups. The PSH level was measured at 412 nm and expressed as nmol PSH/mL of plasma.

2.8 Glutathione peroxidase (GSH-Px) assay

GSH-Px (E.C. 1.11.1.9) activity determination was assayed by the method of Paglia and Valentine [32]. In this method, GSH-Px catalyses the oxidation of glutathione in the presence of hydrogen hydroperoxide. Oxidized glutathione is converted to the reduced form in the presence of glutathione reductase and NADPH, while NADPH is oxidized to NADP⁺. In brief, plasma (0.01 mL) was added to the assay mixture (total volume = 0.5 mL) and the reaction started by the addition of H₂O₂ to give a final concentration of 0.4 mM. Conversion of NADPH to NADP⁺ was monitored continuously at 340 nm for 2 min. GSH-Px activity was expressed as nmol of NADPH oxidized per minute per mL of plasma, using an extinction coefficient 6.22×10^6 for NADPH.

2.9 Vitamin C determination

Vitamin C determination was performed as described by Jacques-Silva et al. [33]. Plasma was precipitated with 1 volume of a cold 5 % trichloroacetic acid solution followed by centrifugation. An aliquot of 0.3 mL of the supernatant was mixed with 2,4-dinitrophenylhydrazine (4.5 mg/mL), CuSO₄ (0.075 mg/mL) and trichloroacetic acid 13.3 % (final volume 0.575 mL) and incubated for 3 h at 37^o C. Then 0.5 mL of 65 % (v/v) H₂SO₄ was added to the medium. The content of vitamin C was calculated using a standard curve (1.5 – 4.5 ug/mL vitamin C freshly prepared in sulfuric acid) and expressed as ug vitamin C/mL of plasma.

2.10 Catalase (CAT) assay

CAT (E.C. 1.15.1.6) activity was measured by the method of Aebi [34]. Packed erythrocytes were diluted at 1:100 with distilled water then 0.02 mL of this hemolyzed sample was added to a cuvette and the reaction was started by the addition of 0.07 mL of freshly prepared 300 mM H₂O₂ in phosphate buffer (50 mM, pH 7.0; total volume of incubation: 1 mL). The rate of H₂O₂ decomposition was measured spectrophotometrically at 240 nm during 120s. The activity of catalase was expressed as mmol H₂O₂/mL erythrocytes/min.

2.11 Superoxide dismutase (SOD) assay

Erythrocyte SOD (E.C.1.15.1.1) activity in tests was assayed spectrophotometrically as described by Boveris and Cadenas [35]. This method is based on the capacity of SOD to inhibit autoxidation from adrenaline to adrenochrome. The color reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of adrenaline autoxidation by 50 % at 26 °C.

2.12 Statistical Analysis

All data were expressed as the mean value \pm SEM. To determine the effect of reuse, a two-way ANOVA of the three time (B1st, B6th and B12th reuse) vs. two membrane type (CA and PS) or the three time (A1st, A6th and A12th reuse) vs. two membrane type (CA and PS) was performed. To determine the immediate effect of HD, data were analyzed by a two-way ANOVA of the two times of the sampling (B1st/A1st or B6th/A6th or B12th/A12th) vs. two membranes: CA/PS. Differences were considered significant when the probability was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. TBARS determination

Two-way ANOVA of the three time (B1st use, B6th and B12th reuse) vs. membrane type and three time (A1st use, A6th and A12th reuse) vs. membrane type revealed no significant main effect of time ($p > 0.05$), membrane type ($p > 0.05$) and time vs. membrane interaction ($p > 0.05$).

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 1st use (B x A effects) vs. membrane type revealed a significant main effect of time ($p = 0.007$), while the main

effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant.

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 6th reuse (B x A effects) vs. membrane type revealed a significant main effect of time ($p=0.009$), while the main effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant. As can be observed in Fig. 1, the TBARS levels increased after HD.

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 12th reuse (B x A effects) vs. membrane type revealed no significant main effect of time ($p>0.05$), membrane type ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$).

3.2. Measurement of DRS levels

Two-way ANOVA of the three time (B1st use, B6th and B12th reuse) vs. membrane type and three time (A1st use, A6th and A12th reuse) vs. membrane type revealed no significant difference in main effect of time ($p>0.05$), membrane type ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$).

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 1st use (B x A effects) vs. membrane type revealed no significant main effect of time ($p>0.05$) or membrane, while the time vs. membrane interaction ($p=0.05$) was significant.

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 6th reuse (B x A effects) vs. membrane type, revealed a significant main effect of time ($p=0.008$), while the main effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant.

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 12th reuse (B x A effects) vs. membrane type revealed a significant main effect of time ($p=0.033$), while the main effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant. As can be observed in Fig. 2, the DRS levels increased after HD.

3.3 Non-protein thiol groups (NPSH) determination

Two-way ANOVA of the three time (B1st use, B6th and B12th reuse) vs. membrane type revealed a significant main effect of time ($p=0.0006$), while the main effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant.

Two-way ANOVA of the three time (A1st use, A6th and A12th reuse) vs. membrane type revealed a significant main effect of time ($p=0.001$), while the main

effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant. This result demonstrates that before and after HD the content of NPSH group decreased as a function of reuse (Fig. 3).

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 1st use (B x A effects) vs. membrane type revealed a significant main effect of time ($p=0.011$), while the main effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant.

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 6th reuse (B x A effects) vs. membrane type revealed a significant main effect of time ($p=0.046$), while the main effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant. As can be observed in Fig. 3, the content of NPSH increased after HD.

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 12th reuse (B x A effects) vs. membrane type revealed no significant main effect of time ($p>0.05$), membrane ($p>0.05$) or time vs. membrane interaction ($p>0.05$).

3.4 Protein thiol groups (PSH) determination

Two-way ANOVA of the three time (B1st use, B6th and B12th reuse) vs. membrane type revealed a significant main effect of time ($p=0.04$), while the main effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant. This result demonstrates that before HD the content of PSH group increased as a function of time (Fig.4).

Two-way ANOVA of the three time (A1st use, A6th and A12th reuse) vs. membrane type revealed no significant main effect of time ($p>0.05$), membrane type ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$).

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 1st use, 6th and 12th reuse (B x A effects) vs. membrane type revealed a significant main effect of time ($p<0.005$), while the main effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant. As can be observed in Fig. 4, the content of PSH increased after HD.

3.5 Glutathione peroxidase (GSH-Px) assay

Two-way ANOVA of the three time (B1st use, B6th and B12th reuse) vs. membrane type and three time (A1st use, A6th and A12th reuse) vs. membrane type

revealed no significant main effect of time ($p>0.05$), membrane type ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$).

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 1st use and 6th reuse (B x A effects) vs. membrane type revealed no significant main effect of time ($p>0.05$), membrane type ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$).

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 12th reuse (B x A effects) vs. membrane type revealed a significant main effect of time ($p=0.004$), while the main effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant. As can be observed in Fig. 5, the GSH-Px increased after HD in the 12th reuse.

3.6 Vitamin C determination

Two-way ANOVA of the three time (B1st use, B6th and B12th reuse) vs. membrane type and three time (A1st use, A6th and A12th reuse) vs. membrane type revealed no significant main effect of time ($p>0.05$), membrane type ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$).

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 1st use, 6th and 12th reuse (B x A effects) vs. membrane type revealed a significant main effect of time ($p<0.005$), while the main effect of membrane ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) were not significant. As can be observed in Fig. 6, the vitamin C concentration decreased after HD.

3.7 Protein carbonyl content, catalase and superoxide dismutase activity

Two-way ANOVA of the three time (B1st use, B6th and B12th reuse) vs. membrane type and three time (A1st use, A6th and A12th reuse) vs. membrane type revealed no significant main effect of time ($p>0.05$), membrane type ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) in the protein carbonyl content, CAT and SOD activities.

Statistical analysis of the immediate effect of HD at 1st use, 6th and 12th reuse (B x A effects) vs. membrane type revealed no significant main effect of time ($p>0.05$), membrane type ($p>0.05$) and time vs. membrane interaction ($p>0.05$) in the protein carbonyl content, CAT and SOD activities (Table 1).

4. Discussion

Therapeutic applications, such as HD that depends on extracorporeal circuits composed of artificial surfaces in dialyzer membranes have been suggested to cause oxidative stress [36, 37]. HD is associated with the activation of neutrophil [3, 4], which is a source of ROS. The degree of neutrophil activation depends on the characteristics of the dialysis membrane [5, 6]. In the present study, the effects of the use of cellulose acetate membrane (CA) and synthetic polysulfone membrane (PS), as well as the effects of HD session and dialyzer reuse practice were evaluated in relation to the biomarkers of the oxidative stress.

Literature demonstrates conflicting results in relation to oxidative stress in HD with different membranes [7, 10, 26, 38]. No significant differences in HD with CA and PS membranes in relation to the markers of oxidative stress were observed. In line with this, Wu et al. [7] found no difference in TBARS levels, SOD and GSH-Px activities between regenerated cellulose and PS membranes. These results suggest that regular HD with CA or PS membranes did not interfere with the oxidative status in the patients.

In relation to HD session, our data showed that carbonyl groups, CAT and SOD activities were not modified in HD session. On the other hand, TBARS levels increased in 1st use and 6th reuse, whereas in the last use this effect was completely abolished. Corroborating with our results, Ozden et al. [9] observed an increase in plasma TBARS levels after HD and Kose et al. [24] observed a decrease in MDA levels after reuse, what could demonstrate an increase in biocompatibility of membranes with reuse. Improved biocompatibility of reprocessed dialyzers is thought to be related to the deposition of albumin, complement and fibrin on the blood compartment surfaces of the dialyzer [39, 40]. Besides, DRS levels increased in 6th and 12th reuse. In 1st use, no significant differences were observed in HD session, however, there was membrane interaction, demonstrating increase in DRS levels after HD session with CA membrane. This way, Hernandez et al. [41] demonstrated that cellulose membrane induces greater leukocyte activation than synthetic membrane during HD.

Furthermore, HD session increased protein SH levels in all uses of membrane, increased NPSH levels in 1st use and 6th reuse and increased GSH-Px activity in 12th reuse. Whereas glutathione is the main non-protein thiol involved in the antioxidant defense [42] and GSH-Px is an antioxidant enzyme that can detoxify

hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides in the presence of reduced glutathione [43], we can consider that an increase in protein and NPSH levels and GSH-Px activity after HD session was in response to the oxidative process generated by HD session. In line with this, other authors also observed an increase in protein SH levels [11, 18, 44], NPSH levels and erythrocyte GSH-Px [9] after HD session. Considering reuse, NPSH levels decreased, which may have occurred due to the consumption of GSH. In contrast, plasma PSH levels increased significantly with reuse practice. In fact, Gündüz et al. [23] observed an increase in plasmatic SH levels after reuse and suggest that loss of SH groups from the dialyzer may be diminished during reuse practice.

In this study, vitamin C levels were significantly reduced after HD session in all uses. Vitamin C is water-soluble and has been shown to be a major antioxidant in human plasma, as well as in cell membranes, exerting beneficial effects by an inhibition of lipid peroxidation and in the prevention of atherosclerosis [45]. Other authors have also demonstrated that during HD treatment, plasma vitamin C concentrations could drop to approximately 50% of the basal value [17, 18]. This effect could be attributed to the consumption, or more likely to the filtration of this low-molecular-weight compound through the membrane [18].

In conclusion, the results presented in this study revealed that regular HD with CA or PS membranes did not interfere with oxidative status in the patients. However, HD session may contribute to the increase of oxidative stress, due to the increase in TBARS and DRS levels and the decrease in the vitamin C levels. Furthermore, dialyzer reuse practice appears to be efficient in the reduction of oxidative stress in this population.

Acknowledgements:

The financial supports by UFSM (FIPE), FAPERGS, CAPES and CNPq are gratefully acknowledged. J.B.T.R. and M.R.C.S. are recipients of CNPq fellowships.

References

- [1] Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: ____ Free Radicals in Biology and Medicine. 3 ed. Oxford: Oxford University Press 1999; cap.4: 246-350
- [2] Descamps-Latscha B, Drüeke T, Witko-Sarsat V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial* 2001; 14 (3): 193-199
- [3] Kuwahara T, Markert M, Wauters JP. Neutrophil oxygen radical production by dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant* 1988; 3 (5): 661-665
- [4] Gastaldello K, Husson C, Wens R, Vanherweghem JL, Tielemans C. Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1638-1646
- [5] Ward RA, McLeish KR. Oxidative stress in Hemodialysis Patients: What are the Determining Factors? *Artif Organs* 2003; 27(3): 230-236
- [6] Clark WR, Hamburger RJ, Lysaght MJ. Effect of membrane composition and structure on solute removal and biocompatibility in hemodialysis. *Kidney Int* 1999; 56: 2005-2015
- [7] Wu CC, Chen JS, Wu WM, et al. Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1134-1139
- [8] Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 335-340
- [9] Ozden M, Maral H, Akaydin, D, Cetinalp P, Kalender B. Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. *Clin Biochem* 2002; 35:269-273
- [10] Yavuz O, Bicik Z, Cinar Y, Guney Y, Guler S. The effect of different dialysis membranes on oxidative stress and selenium status. *Clin Chim Acta* 2004; 346:153-160
- [11] Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58:2571-2578

- [12] Chao JCJ, Yuan MD, Chen PY, Chien SW. Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hemodialysis patients. *J Nutr Biochem* 2002; 13(11): 653-663
- [13] Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudiaa M et al. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996; 21(6):845-853
- [14] Weinstein T, Chagnac A, Korzets A et al. Haemolysis in hemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 883-887
- [15] Böhm V, Tiroke K, Schneider S et al. Vitamin C status of patients with chronic renal failure, dialysis patients and patients after renal transplantation. *Int J Vitam Nutr Res* 1997; 67(4): 262-266
- [16] Clermont G, Lecour S, Lahet J et al. Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. *Cardiovasc Res* 2000; 47:618-623
- [17] Pupim LB, Himmelfarb J, McMonagle E, Shyr Y, Ikizler TA. Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. *Kidney Int* 2004, 65: 2371-2379
- [18] Tepel M, Echenmeyer M, Orié NN, Zidek W. Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis. *Kidney Int* 2000; 58: 867-872
- [19] Robinson BM, Feldman H. Dialyzer reuse and patient outcomes: what do we know now? *Semin Dial* 2005; 18 (3): 175-179
- [20] Twardowski JZ. Dialyzer reuse-part II: advantages and disadvantages. *Semin Dial* 2006; 19 (3): 217-226
- [21] Lacson EJr, Lazarus JM. Dialyzer best practice: single use or reuse? *Semin Dial* 2006; 19 (2): 120-128
- [22] Maidment HJ, Petersen JE. The dialysis prescription: Reuse. *Am J Nephrol* 1996; 16(1): 52-59
- [23] Gündüz A, Düsünsel R, Köse K, Utaş C, Dpgan P. The effects of dialyzer reuse on plasma antioxidant mechanisms in patients on regular hemodialysis treatment. *Free Radic Biol Med* 1996; 21 (2): 225-231

- [24] Köse K, Dogan P, Gündüz Z, Düsünsel R, Utas C. Oxidative stress in hemodialyzed patients and the long-term effects of dialyzer reuse practice. *Clin Biochem* 1997; 30 (8): 601-606
- [25] Rao PVLNS, Dakshinamurty KV, Saibaba KSS et al. Oxidative stress in haemodialysis: immediate changes caused by passage of blood through the dialyzer. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 401-405
- [26] Rao M, Guo DQ, Jaber BL et al. Dialyzer membrane type and reuse practice influence polymorphonuclear leukocyte function in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004; 65(2): 682-691
- [27] Ohkawa H, Ohishi H, Yagi K. Assay for lipid peroxyde in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358
- [28] Yan LJ, Traber MG, Packer L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 1995;228: 349–351
- [29] Levine RL., Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186: 464-478
- [30] Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275
- [31] Ellman GL. Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 70-82
- [32] Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69
- [33] Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC Rocha JBT. Diphenyl diselenide and vitamin C changes deposition of selenium and vitamin C in brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001; 88:119-125
- [34] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-126
- [35] Boveris A, Cadenas E. Cellular source and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerch L, Massaro. *Oxygen, gene expression and cellular function. Marcel Decker*, New York: 1997; 105:1-25
- [36] Cristol JP, Canaud B, Rabesandratana H, Gaillard I, Serre A, Mion C. Enhancement of reactive oxygen species production and cell surface markers expression due to haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:389-94

- [37] Nourooz-Zadeh J. Effect of dialysis on oxidative stress in uraemia. *Redox rep* 1999, 4(1-2): 17-22
- [38] Walker RJ, Sutherland WHF, De Jong SA. Effect of changing from a cellulose acetate to a polysulphone dialysis membrane on protein oxidation and inflammation markers. *Clin Nephrol* 2004; 61 (3): 198-206
- [39] Hörl WH. Hemodialysis membranes: interleukins, biocompatibility, and middle molecules. *J Am Soc of Nephrol* 2002; 13: s62-s71
- [40] Miles AMV, Friedman EA. A review of hemodialyzer reuse. *Semin Dial* 1997; 10 (1): 32-37
- [41] Hernandez MR, Galan AM, Cases A et al. Biocompatibility of cellulosic and synthetic membranes assessed by leukocyte activation. *Am J Nephrol* 2004; 24(2): 235-341
- [42] Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333: 19-39
- [43] Arteel GE, Sies HB. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001; 10: 153–158
- [44] Wlodek PJ, Smolenski OB, Chwatko G, et al. Disruption of thiol homeostasis in plasma of terminal renal failure patients. *Clin Chim Acta* 2006; 366:137-145
- [45] Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31 (11): 1287–1312

Captions of the figures

Fig. 1. Plasma TBARS levels in 1st use, 6th and 12th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes. Results are expressed as means \pm SEM. n: between 10 and 14 patients.

Fig. 2. Blood DRS levels in 1st use, 6th and 12th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes. Results are expressed as means \pm SEM. n: between 10 and 14 patients.

Fig. 3. Erythrocyte NPSH levels in 1st use, 6th and 12th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes. Results are expressed as means \pm SEM. n: between 10 and 14 patients.

Fig. 4. Plasma PSH levels in 1st use, 6th and 12th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes. Results are expressed as means \pm SEM. n: between 10 and 14 patients.

Fig. 5. Plasma GSH-Px activity in 1st use, 6th and 12th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes. Results are expressed as means \pm SEM. n: between 10 and 14 patients.

Fig. 6. Plasma vitamin C levels in 1st use, 6th and 12th reuse of cellulose acetate and polysulfone membranes. Results are expressed as means \pm SEM. n: between 10 and 14 patients.

Figure 1

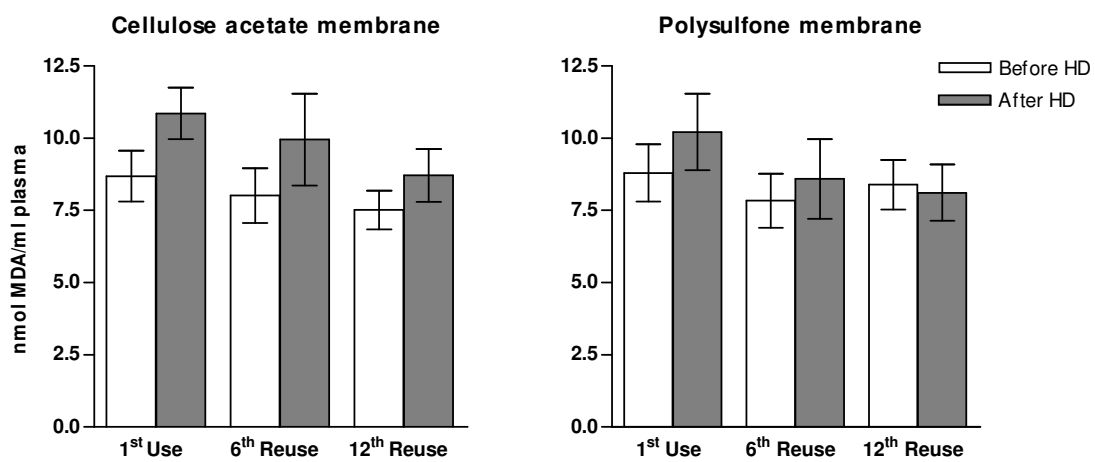


Figure 2

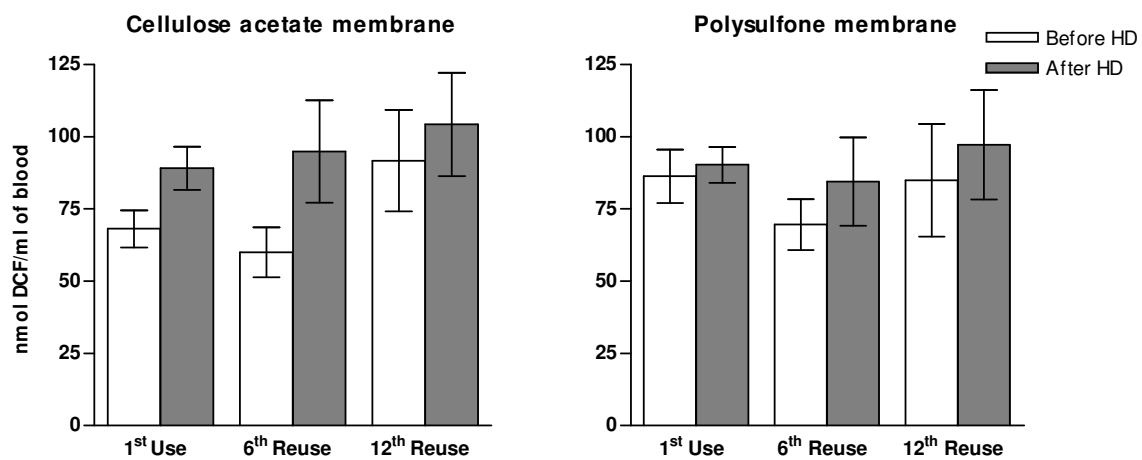


Figure 3

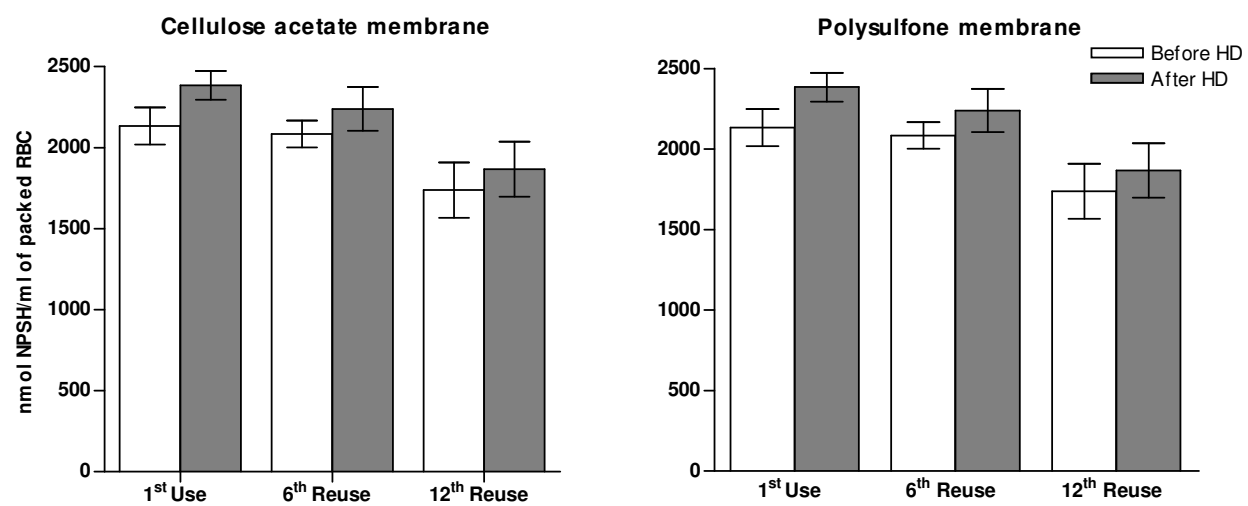


Figure 4

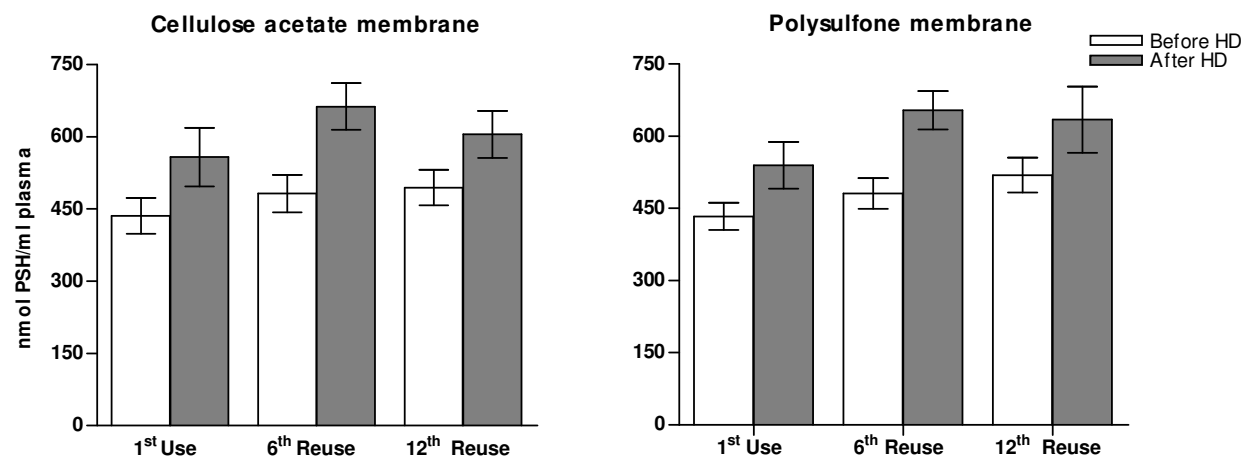


Figure 5

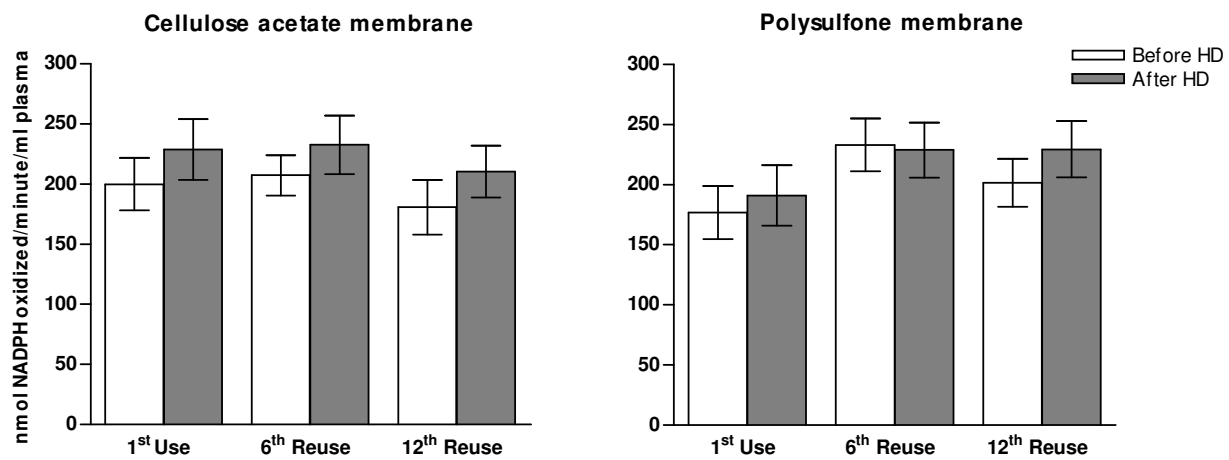


Figure 6

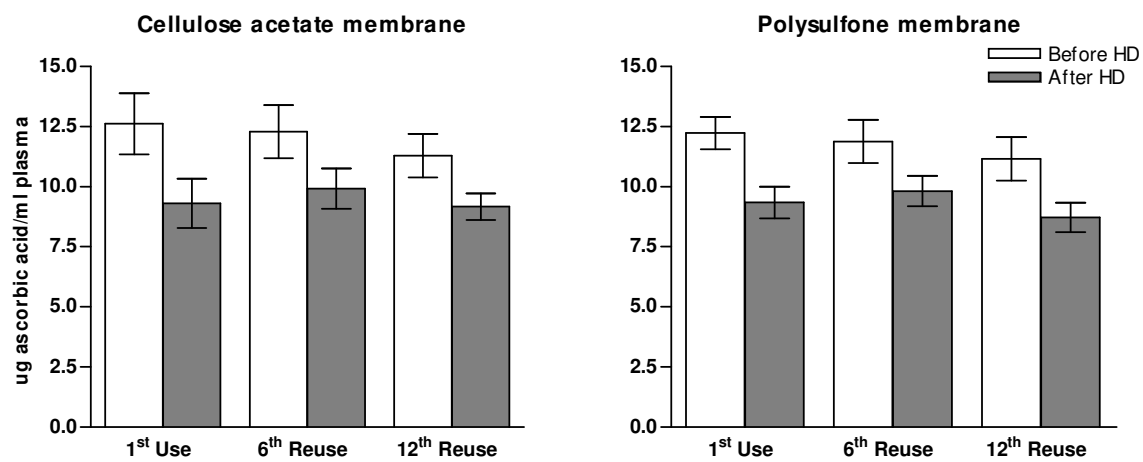


Table 1

Comparison of the parameters monitored during HD with different membranes

	first use				sixth reuse				twelveth reuse			
	CA membrane		PS membrane		CA membrane		PS membrane		CA membrane		PS membrane	
	Before HD	After HD	Before HD	After HD	Before HD	After HD	Before HD	After HD	Before HD	After HD	Before HD	Ater HD
Erythrocyte CAT (mmol/ml)	32.0±2.0	32.5±1.9	28.7±1.7	29.0±1.5	31.1±1.9	32.7±2.5	30.1±1.6	31.6±1.4	32.1±2.1	32.9±1.7	32.5±2.1	33.3±2.1
Erythrocyte SOD (U/mg protein)	32.8±1.7	30.3±3.1	24.1±4.0	27.9±3.1	22.8±3.3	24.2±2.0	22.6±2.8	22.3±2.1	30.3±2.8	31.6±3.0	24.1±2.1	24.3±1.7
Plasma protein carbonyl (nmol/mg protein)	13.4±1.0	15.5±1.3	17.3±2.1	17.3±1.5	13.0±1.2	15.2±1.2	12.0±1.0	13.3±0.9	16.1±1.8	16.5±2.3	13.3±1.7	13.8±1.3

n: between 10 and 14 patients. CA: cellulose acetate; PS: polysulfone; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase.

Data are expressed as means ± SEM

4 DISCUSSÃO

As aplicações terapêuticas como a HD, que dependem de circuitos extracorpóreos, onde o sangue entra em contato com membranas artificiais, tem sido sugerida como causa de geração de estresse oxidativo (CRISTOL et al., 1994; NOUROOZ-ZADEH, 1999). Entretanto, alguns autores relatam que a HD com membranas biocompatíveis não interfere na geração de estresse oxidativo destes pacientes (TEPEL et al., 2000; PUPIM et al., 2004).

A HD está associada com o aumento da ativação de neutrófilos (KUWAHARA et al., 1988; GASTALDELLO et al., 2000), que são fonte de EROs, e o grau de ativação dos mesmos depende das características da membrana de diálise (CLARK et al., 1999; WARD e McLEISH, 2003). Neste estudo, foram avaliados os efeitos do uso da membrana de acetato de celulose (AC) e da membrana de polisulfona (PS), da sua reutilização, bem como os efeitos da sessão de HD sobre os marcadores de estresse oxidativo.

Os resultados deste estudo demonstraram que não houve diferença significativa nos marcadores de estresse oxidativo entre as membranas de AC e PS. Na mesma linha do nosso trabalho, WU et al. (2005) não encontraram diferença significativa nos níveis de TBARS, na atividade da SOD e da GSH-Px entre as membranas de celulose regenerada e PS. Desse modo, pode-se sugerir que HD com membrana de AC ou de PS não interfere de forma diferente na geração de estresse oxidativo dos pacientes.

A literatura tem demonstrado resultados conflitantes em relação à geração de estresse oxidativo pelas diferentes membranas de HD. No trabalho de WALKER e colaboradores (2004), onde compararam as membranas de AC e PS, houve uma diminuição no nível de oxidação das proteínas dos pacientes que realizaram HD com a membrana de PS. Em outro estudo, WU et al. (2005) compararam as membranas de celulose regenerada e PS e relataram que os pacientes que realizaram HD com membrana de PS tiveram um menor aumento da mieloperoxidase. Estes trabalhos demonstram que a membrana de PS pode provocar uma menor geração de estresse oxidativo nos pacientes em HD.

Por outro lado, no trabalho de YAVUZ et al. (2004), os quais compararam as membranas de hemofan (celulose substituída) e PS, houve um aumento nos níveis de MDA e uma diminuição na atividade da GSH-Px e nos níveis de selênio nos pacientes que realizaram HD com a membrana de PS. Além disso, RAO et al. (2004) quando compararam diferentes tipos de membranas (celulose, acetato e triacetato de celulose e polisulfona), observaram um aumento no *burst* respiratório de leucócitos dos pacientes que realizaram HD com membrana de PS, quando comparada com as membranas de acetato e triacetato de celulose. Neste sentido, estes trabalhos indicam que a membrana de PS pode provocar maior geração de estresse oxidativo nos pacientes em HD com este tipo de membrana.

Em relação à sessão de HD, nossos dados mostraram que a carbonilação de proteínas, a atividade da CAT e da SOD não modificaram durante a sessão de HD (Artigo tabela 1). Os níveis de TBARS aumentaram após a HD no 1º uso e no 6º reuso, entretanto, no 12º reuso não foi observado aumento significativo (Artigo Fig.1). Corroborando com isso, OZDEN et al. (2002) observaram um aumento nos níveis de TBARS plasmático após a sessão de HD e KÖSE et al. (1996) relataram uma diminuição nos níveis de MDA após a reutilização, que poderá demonstrar o aumento da biocompatibilidade das membranas com a reutilização. Este aumento da biocompatibilidade pode ser devido à deposição de albumina, de complemento e de fibrina na superfície da membrana (HÖRL, 2002; MILES e FRIEDMAN, 1997; KAUFMANN e LEVIN, 2001).

Neste estudo, também foi observado um aumento nos níveis de DRS após a HD no 6º e no 12º reuso. No 1º uso, foi observado diferença entre as membranas; a membrana de AC demonstrou aumento nos níveis de DRS após a HD, enquanto a membrana de PS não apresentou esta diferença (Artigo Fig.2). Nesta mesma linha, HERNANDEZ et al. (2004) demonstraram que a membrana de celulose provocou uma maior ativação de leucócitos do que a membrana sintética durante a HD.

Em relação à influência da HD no sistema antioxidante, nossos resultados mostraram que a sessão de HD provocou um aumento nos níveis de PSH em todos os usos (Artigo Fig.4), um aumento nos níveis de NPSH no 1º uso e no 6º reuso (Artigo Fig.3) e um aumento na atividade da GSH-Px no 12º reuso (Artigo Fig.5) do dialisador. Considerando que a GSH é o principal tiol não protéico envolvido no sistema de defesa antioxidante (PASTORE et al., 2003) e que a GSH-Px é uma enzima antioxidante que pode destoxificar peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos

lipídicos na presença de GSH (ARTEEL e SIES, 2001); podemos considerar que este aumento nos níveis de PSH, NPSH e na atividade da GSH-Px após a sessão de HD, foi em resposta ao processo oxidativo gerado durante a HD. Na mesma linha do nosso trabalho, níveis aumentados de PSH (CLERMONT et al., 2000; HIMMELFARB et al., 2000; WLODEK et al., 2006), de NPSH e GSH-Px (OZDEN et al., 2002) têm sido verificados após a sessão de HD.

Quando consideramos a reutilização dos dialisadores, observamos que os níveis de NPSH diminuíram com a reutilização. Consideramos que esta diminuição poderá ter ocorrido devido ao consumo da GSH. Por outro lado, os níveis de PSH aumentaram com a reutilização dos dialisadores. Neste contexto, GÜNDÜZ et al. (1996) observaram um aumento de PSH após a reutilização e sugeriram que a reutilização dos dialisadores poderá diminuir a perda de grupos -SH.

Os níveis de vitamina C diminuíram após a HD em todos os usos do dialisador (Artigo Fig.6), evidenciando alteração no sistema antioxidante. A vitamina C é solúvel em água e é o principal antioxidante do plasma, exercendo importante papel na proteção de lipídios plasmáticos contra o processo de peroxidação (NORDBERG e ARNER, 2001). Diversos trabalhos têm indicado que durante o processo de HD, a concentração de vitamina C do plasma poderá diminuir em até 50% do valor basal (BÖHM et al., 1997; CLERMONT et al., 2000). Este efeito poderá ser atribuído ao consumo, para a defesa dos radicais livres, ou mais diretamente a filtração deste composto de baixo peso molecular através da membrana do dialisador (CLERMONT et al., 2000; CHAO, 2002). Desse modo, a suplementação com antioxidantes poderá ser particularmente relevante, sendo que CHAO et al. (2002) já demonstraram que o uso da mesma poderá melhorar o *status* antioxidante e diminuir a peroxidação lipídica dos pacientes em HD.

Portanto, nossos resultados mostraram que o uso de diferentes membranas para a realização de HD não interferiu de forma diferente no *status* oxidativo dos pacientes, evidenciado pela não modificação dos marcadores aqui observados. Além disso, este estudo demonstrou que a sessão de HD pode interferir na geração de estresse oxidativo, sendo que houve um aumento nos níveis de TBARS, DRS, PSH, NPSH, GSH-Px e uma diminuição nos níveis de vitamina C. No entanto, a reutilização dos dialisadores demonstrou ser eficiente na redução da peroxidação lipídica, evidenciada pela diminuição dos efeitos da sessão de HD sobre os níveis de TBARS, no 12º reuso.

5 CONCLUSÕES

Apartir dos resultados presentes neste estudo podemos concluir que:

- O uso de membrana de acetato de celulose ou de membrana de polisulfona não interferiu de forma diferente no *status* oxidativo dos pacientes em HD, sendo que não houve diferença nos marcadores de estresse oxidativo estudados.
- A sessão de HD contribuiu para um aumento dos níveis de TBARS, DRS, PSH, NPSH, GSH-Px e para uma diminuição dos níveis de vitamina C. Entretanto, não influenciou nos níveis de oxidação de proteínas e na atividade da CAT e da SOD. Sendo assim, a sessão de HD pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo nos pacientes em HD.
- A reutilização dos dialisadores contribuiu para uma diminuição dos níveis de NPSH e para um aumento dos níveis de PSH. Além disso, diminuiu os efeitos da sessão de HD sobre os níveis de TBARS, indicando assim que poderá ser eficiente como forma de redução da peroxidação lipídica nos pacientes em HD.

6 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Realizar estudos com suplementação de vitamina C para verificar a influência da mesma sobre os marcadores de estresse oxidativo;
- Realizar estudos, *in vitro*, de avaliação da influência do tipo de membrana e da reutilização das mesmas sobre a geração do estresse oxidativo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. RDC nº 154, de 15 de junho de 2004. Estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços de diálise. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 17 jun. 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>

ARTEEL, G. E.; SIES, H. B. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, p. 153–158, 2001.

BÖHM, V. et al. Vitamin C status of patients with chronic renal failure, dialysis patients and patients after renal transplantation. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 4, p. 262-266, 1997.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**, v.6, p. 391–397, 1997.

CANZIANI, M. E. F., DRAIBE, S. A., NADALETTO, M. A. J. Técnicas Dialíticas na Insuficiência Renal Crônica. In: AJZEN, H.; SCHOR, N. **Guia de medicina ambulatorial e hospitalar de nefrologia**. 2ed. Barueri, SP: Manole, 2005.

CEBALLOS-PICOT, I. et al. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n.6, p.845-853, 1996.

CHAO, J. C. J. et al. Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hemodialysis patients. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 13, n. 11, p. 653-663, 2002.

CLARK, W. R.; HAMBURGER, R. J.; LYSAGHT, M. J. Effect of membrane composition and structure on solute removal and biocompatibility in hemodialysis. **Kidney International**, v. 56, p. 2005-2015, 1999.

CLERMONT, G. et al. Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. **Cardiovascular Research**, v. 47, p.618-623, 2000.

CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants. **Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 274-277, 1996.

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

D'ÁVILA, D. O.; FIGUEIREDO, A. E. Métodos de depuração extra-renal: hemodiálise, diálise peritoneal e novas técnicas. In: RIELLA, M.C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrolíticos**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabarra; 1996. cap. 48, p. 607-645.

DAUGIRDAS, J. T.; STONE, J. V. C. Physiologic principles and urea kinetic modeling. In: DAUGIRDAS, J. T.; BLAKE, P. G.; ING, T. S. **Handbook of Dialysis**. Lippincott Williams & Wilkins, 3rd. Philadelphia, USA: 2001, cap. 2, p. 15-45.

DAUGIRDAS, J. T.; STONE, J. V. C.; BOAG, J. T. Hemodialysis Apparatus. In: DAUGIRDAS, J. T.; BLAKE, P. G.; ING, T. S. **Handbook of Dialysis**. Lippincott Williams & Wilkins, 3rd. Philadelphia, USA: 2001, cap. 3, p. 46-66.

DEPPISCH, R. M.; STORR, M.; BUCK, R.; GÖHL, H. Blood material interactions at the surfaces of membranes in medical applications. **Separation and Purification Technology**, v. 14, p. 241-254, 1998.

DESCAMPS-LATSCHA, B.; DRÜEKE, T.; WITKO-SARSAT, V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. **Seminars in Dialysis**, v. 14, n. 3, P. 193-199, 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1, p. 61-68, 1997.

FINELLI, L. et al. National Surveillance of dialysis-associated diseases in the United States, 2002. **Seminars in Dialysis**, v. 18, n. 1, p. 52-61, 2005.

GASTALDELLO K, et al. Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.15, p. 1638-1646, 2000.

GUASQUE, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. **Molecular Immunology**, v.41, p.1089-1098, 2004.

GÜNDÜZ, A. et al. The effects of dialyzer reuse on plasma antioxidant mechanisms in patients on regular hemodialysis treatment. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 2, p. 225-231, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: _____. **Free Radicals in Biology & Medicine**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 1999. cap.4, p. 246-350.

HART, M. L., WALSH, M. C.; STAHL, G. L. Initiation of complement activation following oxidative stress. In vitro and in vivo observations. **Molecular Immunology**, v. 41, p. 165–171, 2004.

HERNANDEZ M. R. et al. Biocompatibility of cellulosic and synthetic membranes assessed by leukocyte activation. **American Journal of Nephrology**, v. 24, n. 2, p. 235-341, 2004.

HIMMELFARB, J.; McMONAGLE, E.; MCMENAMIN, E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. **Kidney International**, v. 58, p. 2571-2578, 2000.

HÖRL, W. H. Hemodialysis membranes: interleukins, biocompatibility, and middle molecules. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.13, p. s62-s71, 2002.

HWANG, E.S.; KIMB, G.H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology**, v. 229, p. 1–10, 2007.

INOUE M. et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p.2495–2505, 2003.

JANEWAY, C.A. et al. Imunidade inata. In: _____. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. cap.2, p. 55-111.

JUNIOR, J. E. R. et al. Censo SBN 2002: informações epidemiológicas das unidades de diálise do Brasil. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 25, n.4, p.188-199, 2003.

JUNIOR, J. E. R. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n.3, supl.1, p.1-3, 2004.

KAUFMAN, A. M.; LEVIN, N. W. Dialyzer reuse. In: DAUGIRDAS, J. T.; BLAKE, P. G.; ING, T. S. **Handbook of Dialysis**. Lippincott Williams & Wilkins, 3rd. Philadelphia, USA: 2001. cap.8, p.169-181.

KLAUNIG E. et al. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. In: TAYLOR & FRANCIS, **Free Radical Toxicology**, London: K.B. Wallace (Ed.), p. 375-400, 1997.

KÖSE, K. et al. Oxidative stress in hemodialyzed patients and the long-term effects of dialyzer reuse practice. **Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 601-606, 1997.

KUWAHARA, T.; MARKERT, M.; WAUTERS, J. P. Neutrophil oxygen radical production by dialysis membranes. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 3, n. 5, p. 661-665, 1988.

LACSON, E. Jr.; LAZARUS, J. M. Dialyzer best practice: single use or reuse? **Seminars in Dialysis**, v.19, n. 2, p.120-128, 2006.

LOCATELLI, F. et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: na emerging threat to patient outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.18, p.1272-1280, 2003.

MAIDMENT, H. J.; PETERSEN, J. E. The dialysis prescription: Reuse. **American Journal of Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 52-59, 1996.

MILES, A. M. V.; FRIEDMAN, E. A. A review of hemodialyzer reuse. **Seminars in Dialysis**, v. 10, n. 1, p. 32-37, 1997.

MURTHY, B. V. R.; PEREIRA, B. J. G. Does reuse have clinically important effects on dialyzer function? **Seminars in Dialysis**, v. 13, n. 5, p. 282-286, 2000.

NETO, M. C.; SANTOS, B. F. C. Revisão/atualização em insuficiência renal aguda: biocompatibilidade de membranas na insuficiência renal aguda. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.18, n.4, p.415-423, 1996.

NGUYEN-KHOA, T.; MASSY, Z. A.; de BANDT, J. P. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.16, p. 335-340, 2001.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

NOUROOZ-ZADEH, J. Effect of dialysis on oxidative stress in uraemia. **Redox report**, v. 4, n. 1-2, p. 17-22, 1999.

OZDEN, M. et al. Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 269-273, 2002.

PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 19-39, 2003.

POLIDORI, M. C. et al. Profiles of antioxidants in human plasma. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 5, p. 456–462, 2001.

PUPIM, L. B. et al. Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. **Kidney International**, v. 65, p. 2371-2379, 2004.

RAO, M. et al. Dialyzer membrane type and reuse practice influence polymorphonuclear leukocyte function in hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 65, p. 682-691, 2004.

ROBINSON, B. M.; FELDMAN, H. Dialyzer reuse and patient outcomes: what do we know now? **Seminars in Dialysis**, v.18, n.3, p.175-179, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA - CENSO 2006. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/censos.htm>> acesso em 28 de maio de 2007.

TEPEL, M. et al. Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis. **Kidney International**, v. 58, p. 867-872, 2000.

TRZNADEL, K. et al. Superoxide anion generation and lipid peroxidation processes during hemodialysis with reused cuprophan dialyzers, **Free Radical Biology & Medicine**, v.8, n. 5, p. 429-432, 1990.

TWARDOWSKI, J. Z. Dialyzer reuse-part II: advantages and disadvantages. **Seminars in Dialysis**, v.19, n.3, p. 217-226, 2006.

VALKO, M. et al. Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p.1-40, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VINHAS, J.; SANTOS, J. P. Haemodialyzer reuse: facts and fiction. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 15, p. 5-8, 2000.

WALKER, R. J.; SUTHERLAND, W. H. F.; de JONG, S. A. Effect of changing from a cellulose acetate to a polysulphone dialysis membrane on protein oxidation and inflammation markers. **Clinical Nephrology**, v. 61, n. 3, p. 198-206, 2004.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p.1058-1066, 2001.

WALPORT, M. J. Complement. Second of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p.1140-1144, 2001.

WARD, R. A.; McLEISH, K. R. Hemodialysis with cellulose membranes primes the neutrophil oxidative burst. **Artificial Organs**, v. 19, n.8, p. 801-807, 1995.

WARD, R. A.; McLEISH, K. R. Oxidative stress in Hemodialysis Patients: What are the Determining Factors? **Artificial Organs**, v. 27, n.3, p. 230-236, 2003.

WEINSTEIN, T. et al. Haemolysis in hemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 15, p. 883-887, 2000.

WLODEK, P. J. et al. Disruption of thiol homeostasis in plasma of terminal renal failure patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 366, p.137-145, 2006.

WU, C. C. et al. Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, p. 1134-1139, 2005.

YAVUZ, O. et al. The effect of different dialysis membranes on oxidative stress and selenium status. **Clinica Chimica Acta**, v. 346, p. 153-160, 2004.