LEVY ANDERSON CÉSAR ALVES

**Estudo do metaboloma de biofluidos em pacientes pediátricos nefropatas e
sua associação com a doença periodontal**

São Paulo

2016

LEVY ANDERSON CÉSAR ALVES

**Estudo do metaboloma de biofluidos em pacientes pediátricos nefropatas e
sua associação com a doença periodontal**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Ciamponi

Co-orientadora: Pesquisadora Dra. Maria Anita Mendes

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Alves, Levy Anderson César.

Estudo do metaboloma de biofluidos em pacientes pediátricos nefropatas e sua associação com a doença periodontal / Levy Anderson César Alves; orientador Ana Lúcia Ciamponi; coorientador Maria Anita Mendes -- São Paulo, 2016.

108 p : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Odontopediatria. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original.

1. Doenças periodontais. 2. Metabólitos. 3. Insuficiência renal crônica. 4. Urina. 5. Saliva. 6. Cromatografia gasosa. 7. Espectrometria de massas. I. Ciamponi, Ana Lúcia. II. Mendes, Maria Anita. III. Título.

Alves LAC. Estudo do metaboloma de biofluidos em pacientes pediátricos nefropatas e sua associação com a doença periodontal. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força para vencer cada obstáculo, mesmo enfrentando tantos percalços ao longo do caminho.

À minha família pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

À minha orientadora, Prof Dra Ana Lídia Ciamponi, pela confiança e oportunidades que me proporcionou ao longo desse período de convivência. Período esse que se estendeu além do doutorado, já que tive a oportunidade de ser estagiário da disciplina antes de ingressar no programa de pós-graduação. O seu profissionalismo aliado ao seu lado humanista foi fundamental para estabelecermos essa excelente relação orientador-orientado e claro, de amizade também. Obrigado por tudo Ana!

À minha co-orientadora, pesquisadora Dra Maria Anita Mendes, pelo apoio incondicional recebido desde a nossa primeira reunião para discutir o projeto. Todas as vezes que precisei você sempre foi muito solícita, a ponto de até mesmo deixar suas atividades do laboratório para me orientar e depois retomá-las. Conhecimento?? Isso foi o que mais adquiri durante os momentos que trabalhei no laboratório. Mas além de tudo isso, agradeço imensamente pelo vínculo de amizade e confiança que estabelecemos, isso sim, é impagável!

À Profa Dra Rebeca Di Nicoló, minha inspiração na Odontopediatria. Tudo começou numa aula de Anestesiologia, onde meu temor por atender os pequenos pacientes foi diminuindo, sempre recebendo apoio e estímulo de sua pessoa. Agradeço também pela confiança e por não ter hesitado em momento algum em me fornecer os requisitos para chegar até aqui. Tenho um carinho muito grande pela senhora e família!

Ao Prof Dr Marcelo Fava, obrigado por ter nos aberto as portas no Instituto da Criança – FMUSP e ter acreditado que desenvolveríamos um trabalho de qualidade e responsabilidade. Agradeço também pelas orientações desde a graduação na UNESP, e pela amizade que estabelecemos ao longo de todos esses anos.

À Prof Dra Vera Kock, ter sido seu aluno em uma das disciplinas do doutorado só me fez admirá-la mais ainda. Obrigado pela forma como sempre me recebe no ICr e pelo carinho com o qual sempre me trata. Gosto muito da sua frase, “Metabolômica é o estado-da-arte”, rs.

Dra Andreia Watanabe, sem palavras para agradecer por todo o seu apoio desde a organização do calendário para iniciarmos as coletas. A forma como você sempre visualizou esse projeto, obviamente, muito me encorajou, mesmo nos momentos em que me parecia ser impossível conseguir concluir. Obrigado pelo apoio e pela amizade com os “nefrodonos”, rs.

Aos demais professores, médicos e residentes do departamento de Nefropediatria do Instituto da Criança – FMUSP pelo apoio e respeito, e por terem sido tão solícitos na troca de informações sobre os pacientes e também na discussão dos casos clínicos, quando relevantes para esse trabalho.

Ao Prof Dr Claudio Oller, por ter confiado e nos acolhido no Laboratório de Simulação e Controle do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP, e pelos ensinamentos quando precisei discutir as condutas estatísticas do trabalho.

Ao Rodrigo Schulz e família, obrigado pelo acolhimento, pelas conversas, pelo apoio e por dividirmos momentos tão importantes ao longo desse período.

À Vanessinha, seu apoio como amiga-irmã, desde o meu começo na pós-graduação foi fundamental. Obrigado por me ouvir e compartilhar “tuuuudo”. Isso só fortalece a nossa amizade e cumplicidade.

À Dra Kelly, pela companhia, carinho, aprendizado e compreensão de sempre.

Ao grande amigo Glauco Hamanaka, por todo carinho e atenção dispensados a mim e à minha família, principalmente nos momentos mais difíceis que enfrentamos.

Ao Dr Tiago Watanabe, meu amigo-irmão, obrigado pelo apoio, companheirismo e pela amizade de sempre.

À Meriellen, por sempre me ajudar com a parte técnica do laboratório, desde o preparo das soluções para análise à interpretação de alguns dados e manuseio dos equipamentos. Além disso, obrigado pelo carinho, atenção e pela amizade que foram fundamentais ao longo desses anos. Tudo isso levaremos por toda a vida!

À Dra Lidiane, também da EPUSP, obrigado pela amizade e pelas conversas de sempre. Foi muito bom ter a sua companhia no laboratório e sempre que possível, compartilhando seus conhecimentos.

À Deise, minha grande amiga, sinto-me privilegiado por ter sua amizade e companhia, que certamente não é para qualquer pessoa. A sua generosidade, sinceridade e potencial é o que torna nossa amizade mais fortalecida. Obrigado por todos os conselhos e por tudo o que você faz por mim, sem medir esforços.

À Taci, sem palavras para agradecer todos os momentos que você esteve me auxiliando nesse trabalho. Sem a sua participação, seria impossível termos concluído as coletas no período ideal. Você nunca hesitou em me ajudar, e mesmo em datas que eram extremamente importantes para você estar com a sua família, lá estava você comigo no ambulatório fazendo as coletas. Obrigado, de coração!

Alê (Alessandra Reyes), o que dizer de uma amiga tão sincera e generosa? Obrigado por compartilhar momentos tão importantes da vida e pela confiança dispensada a mim.

Edu, grande amigo, tão amigo que também se enveredou pelos caminhos das “ômicas”, gosto muito de compartilhar conhecimentos com você, e o mais bacana, conversamos de tudo. Você agrega muito a mim como pessoa e profissional. Que o nosso caminho pelas “ômicas” nos proporcione muito sucesso, já que aprendemos a gostar muito do assunto.

Carol e Ju Kimura, minhas queridas amigas “japas” da pós, tivemos momentos de muita alegria juntos. Momentos estes que jamais esquecerei.

Cris Murakami, Jenny, Tuca, Tati Lenzi, Camillinha, Camilla Abdala, Dani Hesse, Caleb, Renatinha, Evelyn, Gabi, Ana Flávia, Gustavo, Heleninha e Bruna, vocês também foram pessoas muito próximas e que certamente agregaram muito à minha trajetória. Obrigado pelas conversas e risadas de sempre!

Agradeço aos demais colegas da pós-graduação pela convivência e por todos os momentos de aprendizado, especialmente ao Rafael, por ter compartilhado também desse trabalho comigo.

À Profa Dra Ana Estela Haddad, muito obrigado pela atenção, carinho e profissionalismo com o qual sempre vem me conduzindo. Agradeço também pela amizade e por todas as oportunidades que recebi para participar de projetos de pesquisa que muito fortaleceram a minha formação. Gostei tanto da “teleodontologia” que acabei indo para bioinformática, rss.

À Profa Dra Mariana Braga, sua precocidade científica muito me inspira. Obrigado por todas as vezes que me recebeu em sua sala para o esclarecimento de dúvidas, conversas, enfim. Tenho um carinho e admiração muito grande por você Mari.

Prof Dr José Carlos Imparato e Prof Dra Maria Salete, obrigado pelas oportunidades, confiança, e pelos momentos de aprendizado que tive ao longo desses anos. Ter sido aluno de vocês na pós-graduação, é motivo de orgulho!

Prof Dr Fausto Mendes, obrigado pelos ensinamentos e por toda atenção dispensada a mim durante esses anos de pós-graduação. Admiro o seu profissionalismo!

Aos demais professores do Departamento de Odontopediatria, Dr Guedes Pinto (*in memoria*), Dr Marcelo Bönecker, Dra Daniela Raggio e Dra Márcia Wanderley, obrigado pelos ensinamentos e pela convivência.

Ao Dr Frederico Buhatem, à preceptora Dra Marília Figueiredo, e aos funcionários da APCD Vila Mariana, obrigado por compartilharmos todas as terças à noite com os nossos alunos.

À Karin Fernandes, muito obrigado pela amizade e pela companhia de sempre no CAPE.

Aos estagiários e funcionárias do GEAPE, obrigado pelo acolhimento.

Aos técnicos e secretários do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria da FOU SP, muito obrigado por serem tão solícitos e serem pessoas tão agradáveis de se conviver.

Às bibliotecárias da FOU SP, especialmente à Glauce, obrigado por ser tão solícita.

Aos queridos alunos dos cursos onde ministrei aulas, obrigado por tudo e por também me ensinarem muito.

Aos Professores Dr Elcio Magdalena, Dra Ruth e Dra Setsuko , pessoas queridas que me receberam de forma carinhosa e respeitosa na equipe de professores de pós graduação em Pacientes Especiais da Universidade Paulista, SP.

Às queridas Dra Monira e Ana Rutta, como aprendo com vocês. Obrigado por compartilharem conhecimentos!

Aos amigos da British School, Elisabeth Moorhouse, Paul Highdale, Patrícia Shiga, Elaine Pereira, Marina Openheimer, "I still remember the old times at school". Obrigado por essa amizade que permanece até hoje.

A todos os que aqui não nomeei, mas que contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho.

Alves LAC. Estudo do metaboloma de biofluidos em pacientes pediátricos nefropatas e sua associação com a doença periodontal [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

RESUMO

Metabolômica é a técnica que analisa quantitativamente metabólitos endógenos e exógenos de baixa massa molecular encontrados em biofluidos e tecidos. Estas pequenas moléculas representativas encontradas em um sistema biológico abrangem carboidratos, ácidos graxos, nucleotídeos, aminoácidos entre outras classes de compostos. Alguns estudos têm mostrado a importância da manutenção da saúde bucal para pacientes com doença renal crônica (DRC). DRC, um problema mundial de saúde pública, pode ser definida em função da presença de danos renais ou de uma taxa de filtração glomerular $< 60 \text{ mL/min por } 1.73\text{m}^2$ por 3 meses, independente da causa. Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar e interpretar a função de metabólitos salivares e de urina de pacientes com DRC e sua possível associação com a doença periodontal (DP). Trinta adolescentes e adultos jovens, 12-18 anos, diagnóstico médico definitivo de DRC, cadastrados no CAPE (Centro de atendimento a pacientes especiais) da Faculdade de Odontologia e no Instituto da Criança da Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo (USP), fizeram parte deste estudo. O grupo controle também foi composto por 30 indivíduos, porém, clinicamente saudáveis. Todos os participantes receberam informações prévias à coleta de urina e saliva. As amostras de saliva e a primeira urina da manhã foram coletadas e armazenadas a -80°C até a realização da análise. A análise periodontal foi realizada por meio do índice de higiene oral simplificado (OHI-S), sangramento à sondagem e profundidade de sondagem. Todas as amostras foram avaliadas no departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP por meio de análise de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS). As análises estatísticas foram realizadas por meio da análise de componentes principais (PCA), testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. A quantificação relativa de cada metabólito mostrou maiores concentrações estatisticamente significativas entre pacientes com DRC sem DP e com DRC e com DP, de alanina ($p<0.0001$), glicina ($p<0.0001$), tirosina

($p=0.021$), serina ($p<0.0001$), prolina ($p<0.0002$), leucina ($p<0.0003$), citrulina ($p<0.0001$) e arginina ($p<0.0002$). Os valores médios da concentração de p-Cresol também mostraram-se alterados para os mesmos grupos citados acima. Grupos com DRC mostraram concentrações alteradas de ácidos carboxílicos como ácido butírico e de dimetilarginina. Concluimos, portanto, que ambas as patologias estimulam o processo oxidativo sintetizando metabólitos como ácido butírico, L-prolina, dentre outros, os quais podem potencializar a severidade da DRC. Verificamos também que, apesar do perfil metabólico ser diferente, alguns metabólitos como uréia, creatinina, ácido octadecanóico, ciclohexano, são compartilhados por todos os grupos.

Palavras-chave: Doenças periodontais. Metabolômica. Doença renal crônica. Urina. Saliva. Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas.

Alves LAC. Metabolomics study of biofluids of paediatric patients with chronic kidney disease and its association with periodontitis [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

ABSTRACT

Metabolomics is a quantitative analysis of biofluids and tissue for low molecular mass organic endogenous / exogenous metabolites. These representative small molecules found within a system cover a broad range of small molecules, such as carbohydrates, fatty acids, nucleotides, amino acids among many other classes of compounds. A few studies have been published focusing on the oral health of chronic kidney disease (CKD) patients. CKD, a public health problem worldwide, can be defined based on the presence of kidney damage or glomerular filtration rate (GFR) $< 60 \text{ mL/min per } 1.73\text{m}^2$ for 3 months, regardless of cause. On account of that, the aim of this study was to identify and interpret the role of saliva and urine metabolites of CKD individuals and their possible association with periodontitis (PD). Thirty adolescents and young adults, aged 12-18 years, with definite medical diagnosis of CKD and attending the CAPE (Center of Attendance for Special Needs Patients) of the Dental School and the Children Institute of the Medical School - University of São Paulo (USP), comprised the study. The control group was comprised of 30 clinically healthy individuals. Participants were asked to refrain from oral activities for 2 h prior to saliva collection. The first morning urine was also collected and both specimens were frozen at -80°C until assay. Periodontal evaluation was carried out by means of the simplified oral hygiene index (OHI-S), bleeding on probing and probing depth. All samples were analyzed in the Chemical Engineering Department of the Polytechnics School of USP, by means of the Gas-chromatography – mass spectrometry (GC-MS) technique. Statistical analyses were performed by means of the principal component analysis (PCA), Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. The relative quantification showed higher levels of alanine ($p<0.0001$), glycine ($p<0.0001$), tyrosine ($p=0.021$), serine ($p<0.0001$), proline ($p<0.0002$), leucine ($p<0.0003$), citrulline ($p<0.0001$) and arginine ($p<0.0002$) for groups II and IV. The mean concentration of p-Cresol was also greater and statically significant when comparing groups II and IV. Groups with CKD displayed

higher concentrations of carboxylic acids such as butyric acid, and also of dimethylarginine. In conclusion, it could be verified that both pathologies stimulate oxidative stress which synthesises metabolites such as butyric acid and L-proline which can potentialise the severity of CKD. Additionally, despite being possible to distinguish the metabolic profile of patients with PD, PD and CKD and only CKD from clinically healthy individuals, some of these metabolites such as acetic acid, urea, creatinine, octadecanoic acid and cyclohexane were shared among all groups.

Keywords: Periodontal disease. Metabolomics. Chronic Kidney Disease. Urine. Saliva. Gas Chromatography - Mass Spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Esquema da perda evolutiva de néfrons após lesão renal inicial	22
Figura 2.2 - Modelo hipotético de como a periodontite pode ser uma potencial causa de inflamação local e sistêmica em pacientes com doença renal crônica	34
Figura 4.1 - Modelo representativo do delineamento da pesquisa.....	41
Figura 4.2 - Coleta, armazenamento e secagem das amostras de urina	47
Figura 4.3 - Processo de extração de metabólitos da urina	48
Figura 4.4 - Processo de derivatização dos metabólitos da urina.....	49
Figura 4.5 - Processo de extração e derivatização de metabólitos salivares	50
Figura 5.1 - Diagrama de Venn para os metabólitos da urina.....	56
Figura 5.2 - Diagrama de Venn para os metabólitos salivares.....	56
Figura 5.3 - Análise de PCA – Plano fatorial 1 – metabólitos excretados na saliva ..	58
Figura 5.4 - Correlação dos metabólitos salivares comuns aos quatro grupos em função da análise de PCA	58
Figura 5.5 - Análise de PCA dos metabólitos salivares em primeiro plano fatorial para os Grupos I e II	60
Figura 5.6- Correlação dos metabólitos salivares comuns aos Grupos I e II em função da análise de PCA. A identificação numérica faz referência aos códigos do HMDB/CAS (APÊNDICE A)	61

Figura 5.7- Metabólitos salivares dos grupos II e IV	62
Figura 5.8- Metabólitos da urina – Grupos I a IV.....	66
Figura 5.9- Correlação dos metabólitos da urina comuns aos Grupos em função da análise de PCA. A identificação numérica faz referência aos códigos do HMDB/CAS (Apêndice B)	67
Figura 5.10-Média da quantificação relativa da concentração dos metabólitos salivares mais significativos entre os grupos I x II	71
Figura 5.11-Média da quantificação relativa da concentração dos metabólitos salivares mais significativos entre os grupos II x IV	72
Figura 5.12-Média da quantificação relativa da concentração dos metabólitos da urina mais significativos entre os grupos I x II	73
Figura 5.13-- Média da quantificação relativa da concentração de metabólitos da urina mais significativos entre os grupos II x IV	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Distribuição e frequência das variáveis clínicas do estudo	53
Tabela 5.2 - Dados descritivos e comparativos entre grupos.....	54
Tabela 5.3 - Dados descritivos e comparativos entre grupos em função dos estágios da DRC	55
Tabela 5.4 - Autovalores e % de variabilidade na análise de componentes principais dos metabólitos de saliva presentes em 30% da amostra	57
Tabela 5.5 - Autovalores e % de variabilidade na análise de componentes principais dos metabólitos de saliva dos Grupos I e II.....	60
Tabela 5.6 - Autovalores e % de variabilidade na análise de componentes principais dos metabólitos de saliva dos Grupos II e IV	62
Tabela 5.7 - Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos salivares em comum para os grupos I e II e <i>valor-p</i> do teste de Mann-Withney	64
Tabela 5.8 - Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos salivares em comum para os grupos II e IV e <i>valor-p</i> do teste de Mann-Withney	65
Tabela 5.9 - Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos da urina em comum para os grupos I e II e <i>valor-p</i> do teste de Mann-Withney	68
Tabela 5.10- Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos da urina em comum para os grupos II e IV e <i>valor-p</i> do teste de Mann-Withney	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Doença renal crônica	19
2.2	Tratamento da doença renal crônica	24
2.3	Análise do metaboloma de pacientes nefropatas	28
2.4	Doença periodontal em indivíduos nefropatas	32
2.5	Hiperplasia gengival medicamentosa.....	37
3	PROPOSIÇÃO	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	CASUÍSTICA – MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Anamnese e avaliação bucal.....	42
4.2	Coleta dos espécimes clínicos.....	45
4.3	Preparo e análise metabolômica das amostras	46
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Análise dos dados clínicos.....	51
5.2	Análise do Perfil Metabólico	51
5.3	Dados Demográficos e Clínicos	52
5.4	Metaboloma Salivar e de urina	55
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	APÊNDICES	100
	ANEXOS	107

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é atualmente considerada um problema de saúde pública mundial. O aumento no número de casos, a falência renal nos estágios mais avançados que invariavelmente levam ao tratamento de diálise e ao transplante e o custo elevado dos tratamentos preocupam sobremaneira os sistemas de saúde, dado que poucos países são economicamente capazes de enfrentar tais desafios (El Nahas; Bello, 2005).

Em 2002, diretrizes estabelecidas pela Kidney Disease Outcome Quality Initiative (KDOQI), definiram a doença renal crônica como a presença de lesão e/ou perda da função renal por três meses ou mais, independente da causa e estabeleceram que a DRC deveria ser classificada em 5 estágios, baseados na TFG (taxa de filtração glomerular). É a partir do estágio 3 que o paciente apresenta insuficiência renal, quando os valores do clearance de creatinina são menores que 60mL/min/1,73 m² (Hogg et al., 2003).

Estudar os metabólitos que compõem biofluidos como urina, sangue, saliva e plasma tem sido de grande valia no que diz respeito à identificação de possíveis biomarcadores capazes de mostrar possíveis associações entre diferentes patologias.

Para tal, utilizamos ferramentas da engenharia metabólica, uma área em crescente desenvolvimento na investigação de metabólitos presentes em um sistema biológico. Dentre elas, podemos citar a metabolômica que é o ramo da ciência que estuda de forma quantitativa os compostos de baixo peso molecular (metabólitos) presentes em uma célula viva ou organismo, e que participam das reações metabólicas necessárias para o crescimento, funcionalidade e manutenção dos mesmos (Dunn et al., 2005, Patti et al., 2012).

Forte plausibilidade biológica tem sido demonstrada com relação a associação entre DRC e doença periodontal (DP). Um dos possíveis mecanismos sugeridos é o de que patógenos periodontais, tais como a *Porphyromonas gingivalis* podem causar injúria direta ao néfron, visto que inúmeros procedimentos bucais podem levar ao processo de bacteremia transitória. Dessa forma, bactérias podem então ser filtradas

do sangue nos rins e, conseqüentemente, seus produtos atingirem o endotélio renal (Oliveira et al., 2008; Garrido, et al., 2016).

Apesar de diversos microrganismos já terem sido identificados e relacionados com a patogênese da DP, algumas perguntas ainda continuam sem resposta quanto aos tipos de metabólitos sintetizados por esses microrganismos ou pelo próprio indivíduo com DRC - seja em função do comprometimento sistêmico apresentado, quer pelo processo metabólico das medicações em uso e pela interação desses fatores.

Por conseguinte, estabelecer a relação existente entre a DP e as nefropatias vem sendo foco de vários estudos, a fim de se explicar os principais mecanismos fisiológicos, patológicos e microbiológicos dessa relação.

Assim, a identificação dos metabólitos, a obtenção do perfil fenotípico de pacientes e a combinação destas informações permite, no contexto da medicina personalizada (Mastrangelo et al., 2014), uma promissora individualização do tratamento médico e odontológico (Harambat et al., 2012).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) constitui hoje em um importante problema médico e de saúde pública. No Brasil, a prevalência de pacientes mantidos em programa de diálise dobrou nos últimos anos (Romão Junior, 2004). Um estudo brasileiro recente estimou cerca de 1283 o número de pacientes pediátricos em estágio terminal da DRC e que estão submetidos à diálise, sendo a média de idade 12,5 anos (IC:95%: 11,7-13,4) e a distribuição racial de 45,8% caucasianos, 42,4% mulatos, 0,2% indígenas, 11,1% negros e 0,6% outros, resultando numa prevalência de 20 casos por milhão da população com idade compatível (pmpi) (Konstantyner et al., 2015).

Os primeiros relatos da DRC remontam aos estudos de Richard Bright (Ellis, 1942). Seu reconhecimento, no meio acadêmico, deve-se, entre outros, às suas observações relativas a um conjunto de sinais e sintomas clínicos que, quando presentes em um paciente, estavam relacionados a uma inevitável evolução para insuficiência renal e óbito. As características atribuídas ao que se chamou *Morbus Brightii* ou “Doença de Bright” associavam sinais clínicos como edema e albuminúria a achados como hipertrofia ventricular esquerda, hemorragias cerebrais e rins com aspecto “contraído e granular” à necropsia. Bright relatou que esse conjunto de sinais e sintomas não era especificamente de uma determinada doença, mas uma evolução não muito bem elucidada que várias doenças renais poderiam percorrer (Zorzo, 2008).

A púrpura de Henoch-Schönlein, a extrofia de bexiga e as nefrites foram as primeiras doenças renais relatadas em crianças no século XIX. Desde então, a Nefrologia Pediátrica foi sedimentando seus achados clínicos e de pesquisa e sua expansão ocorreu em função da necessidade de maiores investigações e produção de conhecimento no que diz respeito a distúrbios do equilíbrio ácido-base e hidro-eletrolítico, síndrome nefrótica, indicações e técnicas de biópsia renal, tratamento de infecções urinárias, diálise e transplantes (Zorzo, 2008).

A etiologia da DRC em crianças e adolescentes é diferente daquela descrita para pacientes adultos. De acordo com Belangero (2010), Peres e Bertol (2012) e Konstantyner et al. (2015), as causas iniciais de lesão renal variam de acordo com a localização geográfica, faixa etária e região onde os estudos são realizados. Porém, as principais causas na população pediátrica e relatadas na literatura são as malformações do trato urinário, as doenças glomerulares e as doenças hereditárias. Enquanto que, nos adultos, o diabetes e a hipertensão arterial são as etiologias mais frequentes (Soares et al., 2008).

A DRC é uma doença progressiva, caracterizada pela crescente incapacidade dos rins em manter níveis normais dos produtos do metabolismo das proteínas e valores normais da pressão arterial e do hematócrito, bem como o equilíbrio do sódio, da água, do potássio, equilíbrio ácido-básico, síntese de eritropoietina, 1,25 – dihidroxicolecalciferol e renina (Little et al., 2009), além de refletir um estado de imunocomprometimento caracterizado pelo déficit na função de células T e B, assim como de monócitos/macrófagos (Fisher et al., 2011).

Embora a prevalência da DRC em crianças seja menor que a encontrada em adultos, é importante ressaltar que a insuficiência renal crônica (IRC) traz um forte impacto negativo sobre o desenvolvimento pômoro-estatural e neurológico desses indivíduos (Belangero, 2010).

A avaliação do estadiamento da função renal (Tabela 2.1) é de grande importância, e tão logo seja diagnosticado déficit nessa função, o tratamento conservador deve ser iniciado trazendo benefícios não apenas aos rins mas também ao sistema cardiovascular (Hogg et al., 2003; Stenvinkel, 2006).

Tabela 2.1 – Estágios da DRC

Estágio	TFG (mL/min/1,73)	Descrição
1	≥ 90	Lesão renal com TFG normal ou aumentada
2	60 a 89	Lesão renal com redução discreta da TFG
3	30 a 59	Redução moderada da TFG
4	15 a 29	Redução severa da TFG
5	< 15 (ou diálise)	Falência renal

Fonte: Adaptado de Hogg et al. (2003).

No estágio 1 da DRC, quando há dano renal e a TFG ≥ 90 mL/min/1,73 m², ocorre a presença de microalbuminúria. Os primeiros estágios também podem mostrar a presença de hipertensão arterial. No estágio 2, ou insuficiência renal precoce, observa-se aumento do hormônio da paratireóide e no estágio 3, ou insuficiência moderada, há diminuição da absorção de cálcio, diminuição da nutrição e da síntese de eritropoietina que leva ao quadro de anemia. No estágio 4, pré-dialítico ou insuficiência renal severa, é comum a presença de hiperfosfatemia, acidose metabólica, hipercalemia e dislipidemia. Já no estágio 5, doença renal terminal, ocorrem sinais de uremia, sendo a diálise ou o transplante necessários para a manutenção da vida (Belanger, 2010; Gattineni, 2012).

Os sinais clínicos da DRC na infância variam conforme a doença desencadeante e o ritmo de queda na TFG. Após a lesão inicial, os néfrons remanescentes sofrem alterações e adaptações que levam à perda consequente de novos néfrons, desencadeando, assim, um ciclo vicioso que resulta na IRC estágio 5 (Figura 2.1). O exame físico pode ser completamente normal, embora seja comum a presença de sintomas inespecíficos como palidez, fraqueza e hipertensão arterial (Belanger, 2010; Zorzo, 2008).

Figura 2.1 – Esquema da perda evolutiva de néfrons após lesão renal inicial

Fonte: Belangero (2010) adaptado de Andrade; Carvalhaes, 2010.

Outras manifestações sistêmicas vão se instalando com a evolução do distúrbio renal (Zorzo, 2008), e alterações no mecanismo homeostático que regulam as concentrações séricas de cálcio (Ca^{+2}), fosfato (PO_4^{3-}), vitamina D, paratormônio (PTH) e fator de crescimento fibroblástico-23 levam ao desenvolvimento da osteodistrofia renal e alteração mineral óssea.

As vitaminas D_2 e D_3 são ambas sintetizadas no fígado pela reação de hidroxilação formando 25-hidroxicalciferol, o qual posteriormente sofre hidroxilação nos túbulos renais, produzindo o metabólito ativo 1,25 hidroxicalciferol ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$). Pacientes com DRC apresentam deficiência no processo de 1α -hidroxilação pelos túbulos renais, resultando na deficiência de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. A perda urinária de megalina, uma proteína “brush-border” do túbulo proximal necessária para o transporte da proteína de ligação da vitamina D até seu receptor, também está relacionada com a diminuição de vitamina D disponível.

A proteinúria é um marcador importante da função renal, e nas crianças é necessário diferenciar se ela é transitória, ou seja, benigna ou se representa uma doença renal. De acordo com Belangero (2010), ela pode ser classificada em:

- Isolada – proteinúria discreta e que pode estar presente em situações como febre, exercício físico, estresse e insuficiência cardíaca;
- Ortostática – ausência de proteinúria quando o paciente está deitado, porém, presente quando se encontra em posição supina;
- Fixa – não apresenta relação com os itens descritos anteriormente e o paciente necessita de acompanhamento periódico.

Outra ocorrência comum em pacientes com DRC diz respeito às dislipidemias, e há evidências na literatura que mostram sua contribuição para o início e progressão da DRC. Dentre as alterações que aparecem em períodos precoces da DRC, podemos citar a tríade lipídica: aumento de triglicérides, baixa quantidade de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDLc) e colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDLc). Essas alterações apresentam maior intensidade quanto maior for a severidade da doença (Bover et al., 2016; Laurivanicius; Santos, 2008). Saland et al. (2010) relataram que quanto menor a TFG, maior a prevalência de hipertrigliceridemia, menor as quantidades de HDLc e de dislipidemias combinadas. Os mecanismos primários das dislipidemias na DRC são descritos como relacionados a distúrbios na lipólise de triglicédeos, aumento da apolipoproteína C-III (um inibidor da lipase de lipoproteína) e reduzida sensibilidade à insulina no endotélio vascular do músculo esquelético e em outros órgãos que utilizam os triglicérides como fonte de energia.

A diminuição da TFG também leva a uma menor filtração e excreção de fósforo. Nos estágios 4 e 5, há um aumento de fósforo sérico, pois o rim não consegue excretar o fósforo proveniente da dieta.

Há também na literatura relatos de associação entre as “heat shock proteins” (HSP), células apresentadoras de antígenos, e DRC (Musiał; Zwolińska, 2011). Essas proteínas são produzidas em resposta a estímulos ambientais como altas temperaturas, estresse mecânico e infecção, além de participarem de processos celulares vitais (Nethravathy et al., 2014). Os principais componentes do estresse gerado para a síntese dessas proteínas na DRC são: toxinas urêmicas, mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio, apoptose, infecções, e finalmente, o

processo de diálise. Portanto, avaliar o mecanismo das HSP na DRC deve ocorrer por meio de duas formas paralelas: analisar o processo de injúria renal crônica e o possível impacto das HSP - seja protetor ou deletério, na progressão da doença – e definir a função das HSP nas possíveis intervenções terapêuticas (Musial & Zwolinska, 2010).

A HSP 60 foi identificada em soro, apesar de ser considerada tipicamente um componente intracelular. A origem dessa proteína circulante livre ainda não está bem esclarecida, porém, independentemente de sua origem, os níveis circulantes de HSP 60 apresentam significância clínica, pois ela está relacionada com a etiopatogenia da doença cardiovascular. Além disso, mostra correlação com a suprarregulação de E-selectina, molécula de adesão intercelular-1, expressão da molécula 1 de adesão da célula vascular e produção de IL-6 em células endoteliais (Nethravathy et al., 2014). Assim, a aterogênese das artérias renais de médio e grande calibre e das arteríolas pode levar ao quadro de isquemia, glomeruloesclerose e insuficiência renal severa (Kshirsagar et al., 2007).

Diversos estudos com o objetivo de mapear algumas doenças genéticas, seguidos pela clonagem posicional de genes relacionados a determinadas patologias, e estudos de associação ampla do genoma (Genome-wide association studies) têm reforçado os relatos de que há um grande número de doenças com etiologia genética. Assim, mapear tanto as interações proteína-proteína quanto os metabólitos humanos pode auxiliar no estabelecimento das associações entre genes que são responsáveis por mais de uma doença (Goh et al., 2007).

2.2 Tratamento da doença renal crônica

É essencial proceder a determinação da pressão arterial e do estado do volume de líquido extracelular, bem como a obtenção de uma cuidadosa história clínica à procura de sinais e sintomas precoces das complicações da DRC e síndrome urêmica (Nakhjavani; Bayramy, 2007). São obtidos, a intervalos regulares, os níveis séricos de eletrólitos, uréia sanguínea, níveis séricos de creatinina, cálcio e fósforo, o hematócrito

e volume corpuscular médio, a excreção de proteína na urina de 24 horas, níveis séricos de paratormônio e, em alguns pacientes, exame microscópico da urina.

A abordagem clínica da DRC pode ser realizada com base em três modalidades: o tratamento conservador, a diálise e a terapia renal substitutiva.

Nos estágios mais avançados da DRC e em todos os pacientes com síndrome nefrótica, determina-se também o nível sérico de albumina para ajudar a avaliar o estado nutricional. O tratamento da hipertensão constitui a medida mais importante para retardar a progressão da DRC e reduzir tanto a morbidade quanto a mortalidade cardiovascular. Ao contrário da hipertensão essencial, a hipertensão secundária à DRC progride habitualmente e determina um círculo vicioso de agravamento da hipertensão e da função renal (Haddad, 2007).

O tratamento conservador tem o objetivo de retardar a progressão da função renal, favorecendo a participação da criança/adolescente em todas as suas atividades habituais, assim como permitir que os mesmos tenham crescimento normal.

Proctor et al. (2005) relatam que o tratamento conservador da DRC inclui mudanças na dieta e correção das complicações sistêmicas. Restrições na dieta e no consumo de líquidos são necessárias em função da redução da capacidade de excreção dos rins. A acidose e o aumento nos níveis de potássio podem ser tratados pela redução no consumo de alimentos ricos em potássio. Além disso, a restrição quanto ao consumo de sódio pode também levar a um melhor controle da hipertensão e algumas vezes também é necessário que se diminua o consumo de proteína para reduzir ou evitar os sintomas de uremia. Apesar dessas condutas, muitos pacientes chegam ao estágio final da doença renal, requerendo, assim, diálise ou transplante.

Essa população demanda cuidados extensivos de assistência, além de medicamentos que são onerosos ao governo, principalmente quando o paciente está em procedimento de diálise ou foi submetido ao transplante renal. É certo que o desenvolvimento da terapêutica, bem como a evolução das “ômicas” e os protocolos de tratamento disponíveis, entre outros, vem possibilitando uma melhoria na abordagem da doença tanto em adultos quanto em crianças (Zorzo, 2008).

A terapêutica medicamentosa deve ser iniciada em caso de hipertensão sintomática, secundária, evidência de lesão de órgão-alvo, diabetes melito tipo 1 ou 2 e hipertensão persistente não responsiva à terapêutica não farmacológica. (Dirschnabel et al., 2011; Dhull et al., 2016). A literatura relata o uso de múltiplos fármacos para o tratamento da hipertensão. Os inibidores da ECA ou os bloqueadores de renina-angiotensina constituem os fármacos iniciais de escolha. Durante o tratamento com essas medicações deve-se ater ao possível desenvolvimento de hiperpotassemia e insuficiência pré-renal hemodinâmica. Geralmente todos os pacientes com DRC necessitam fazer uso de diurético de alça como parte do tratamento (Dirschnabel et al., 2011).

Os inibidores da ECA possuem metabolismo hepático e excreção renal, logo, é necessário o ajuste das doses quando há presença de IRC. Os agentes pertencentes a esse grupo e que são mais utilizados são o Captopril® e o Enalapril® (Dhull et al., 2016).

Os bloqueadores dos canais de cálcio de ação prolongada fazem parte do segundo grupo de escolha para o tratamento. Esses fármacos exercem efeitos sinérgicos com os inibidores da ECA e diuréticos de alça (Fitzpatrick et al., 2008; Little et al., 2009). Entre os medicamentos mais utilizados deste grupo de anti-hipertensivos, podemos citar a nifedipina e amlodipina, ambos pertencentes à classe de di-hidropiridínicos (Dhull et al., 2016).

Os bloqueadores do receptor AT-I (BRA) são agentes hipotensores que bloqueiam a ação da angiotensina II, no receptor AT-I, sem a ação bloqueadora da cininase, responsável pela degradação da bradicinina.

Os β -bloqueadores levam à diminuição do débito cardíaco, inibem a secreção da renina e reduzem a resistência vascular periférica. Apresentam graus variados de metabolismo hepático e excreção renal.

Já os diuréticos levam a uma redução do volume circulante, da resistência vascular periférica e da pressão arterial. Aqueles que são do grupo dos tiazídicos são utilizados em Pediatria quando da presença de hipervolemia ou associados a outros hipotensores (Koch, 2010, Seikaly, 2012).

O controle do fósforo sérico é feito por meio do controle da quantidade de fósforo ingerido na dieta e pelo uso de agentes quelantes. Os quelantes mais comuns são os sais de cálcio, como carbonato e acetato, ou por meio de polímero catiônico hidrogel de alto peso molecular, o Cloridrato de sevelamer (Meng; Fu, 2015; Cozzolino et al., 2012).

A não responsividade às condutas conservadoras leva o paciente ao tratamento de diálise ou transplante. A diálise consiste no transporte bidirecional de água e solutos por meio de uma membrana artificial semipermeável no caso da hemodiálise ou uma membrana natural (peritônio) na diálise peritoneal (DPE) (Evenepoel et al., 2009; Velázquez et al., 2004).

Em pacientes pediátricos, a DPE é a modalidade de escolha. A diálise é indicada quando o *clearance* de creatinina do paciente pediátrico é menor que 10 mL/min/1,73m² (Zorzo, 2008), e no caso do adulto, quando o valor de creatinina sérica está cronicamente acima de 3 mg/dL e o *clearance* de creatinina abaixo de 20 L/min (Little et al., 2009).

Outro método de escolha para o tratamento da DRC de uma porção significativa dos pacientes com uremia terminal ou pré-terminal é o transplante, o qual pode ocorrer por meio de doadores vivos ou não, e depende da biocompatibilidade entre o tecido do hospedeiro, do sistema sanguíneo ABO, idade e tamanho do doador e receptor. No entanto, Barros et al. (2006) relatam que suporte dialítico, tanto hemodiálise como DPE, deve ser oferecido ao paciente com DRC terminal previamente ao transplante, uma vez que o mesmo necessita estar estável em tratamento dialítico, com parâmetros clínicos e laboratoriais aceitáveis.

Apesar desse avanço, o processo de concentração da urina nos túbulos renais faz com que as células fiquem mais expostas às toxinas presentes no fluido tubular. Essas toxinas destroem permanentemente as células dos túbulos renais, principalmente as da porção proximal, as quais apresentam maior atividade metabólica e os mais avançados mecanismos de transporte. Várias enzimas envolvidas no metabolismo de drogas como as oxidases e citocromo p450 apresentam alta atividade na região 3, e alterações bioquímicas intensas ocorrem nos túbulos proximais. Portanto, proteínas estruturais componentes das células epiteliais dos túbulos renais podem ser o principal alvo para os metabólitos tóxicos das drogas

imunossupressoras, podendo modificar as propriedades das proteínas e consequentemente as funções celulares.

A ciclosporina tem sido a base dos esquemas terapêuticos de imunossupressores e pode estar associada à azatioprina ou ao micofenolato mofetila. No entanto, além de sua nefrotoxicidade e neurotoxicidade, pode levar a diversos efeitos, dentre eles o crescimento gengival.

O tacrolimus exibe eficácia na profilaxia e no tratamento da rejeição em grupos de alto risco imunológico. No que tange aos corticosteróides, estes são utilizados desde o início dos transplantes, porém, um de seus efeitos indesejáveis e de grande impacto em pacientes pediátricos é o retardo de crescimento.

A azatioprina é um agente antiproliferativo tanto quanto o micofenolato, e é utilizada principalmente na profilaxia de rejeição.

2.3 Análise do metaboloma de pacientes nefropatas

A homeostase dinâmica é uma característica comum de cada organismo vivo e demonstra que cada organismo sofre alterações com o tempo, quando exposto a vários estímulos exógenos como terapêutica medicamentosa, dieta ou fatores ambientais.

Atualmente, para compreender a complexidade e a dinâmica dos sistemas vivos, uma abordagem holística - biologia dos sistemas - tem sido muito empregada. Estuda-se a estrutura e a dinâmica dos diversos níveis de organização de um organismo (célula, tecido e órgão), a fim de compreender seu comportamento frente a um conjunto de componentes biológicos e suas interações (Bujak et al., 2015).

A metabolômica, também conhecida como metabonômica ou perfil metabólico, é definida como a medida de respostas metabólicas multiparamétricas dos sistemas vivos a estímulos patofisiológicos ou modificações genéticas, que consistem em um grupo de metabólitos de baixo peso molecular presentes em um organismo biológico, muitos dos quais são produtos finais de expressão gênica.

Estes metabólitos representativos podem ser pequenas moléculas como glicose, colesterol, adenosina trifosfato, aminas biogênicas, moléculas sinalizadoras de lipídios entre outras (Zhao, 2013).

A complexidade metabólica dos seres vivos explica-se pelo fato de que há diferentes vias que interagem com um papel de causa-efeito permutáveis. Dessa maneira, a metabolômica e sua integração com outros estudos de “ômicas”, tais como genômica, transcriptômica e proteômica, representa uma abordagem valiosa que nos últimos anos vem impulsionando o processo de conhecimento na biologia de sistemas. Por meio desse tipo de análise é possível uma avaliação completa, capaz de detalhar onde os efeitos de um gene específico ou grupos de genes precisam ser investigados (Lindon; Nicholson, 2014).

As alterações genéticas no sequenciamento de DNA por deleção de nucleotídeos, inserção ou polimorfismo de nucleotídeo único podem afetar a atividade enzimática de uma determinada proteína que é responsável por converter um metabólito em outro. Se não houver outra enzima que seja capaz de interagir com um metabólito específico, a concentração dele aumentará. A fim de restabelecer a homeostase, o metabólito é exportado da célula para biofluidos como soro, urina e saliva (Schnackenberg; Beger, 2007).

Enquanto genes e proteínas estão sujeitos a processos epigenéticos regulatórios podendo sofrer modificações pós-translacionais, os metabólitos representam produtos metabólicos endógenos finais mais próximos do fenótipo de um indivíduo. Logo, alterações em um único gene ou em uma única proteína podem levar a alterações metabólicas em cascata.

Urina e plasma são os biofluidos mais utilizados para análise metabolômica, pois são facilmente obtidos e frequentes na rotina laboratorial. Porém, muitos outros biofluidos incluindo líquido seminal, fluido cérebro-espinhal, fluido sinovial, fluidos císticos, aspirações pulmonares, saliva e fluidos dialíticos também têm sido fontes de informações metabólicas. A análise de biópsias teciduais, seus extratos lipídicos e aquosos também vem sendo amplamente empregada, tanto quanto as análises de sistemas celulares *in vitro* (Lindon; Nicholson, 2014).

À despeito de a urina, fluido gengival e a placa bacteriana serem biofluidos complexos compostos por metabólitos inorgânicos e orgânicos de estrutura molecular simples e complexa, há poucos estudos direcionados à avaliação do perfil de metabólitos de baixa massa molecular. Sendo assim, o conhecimento dos produtos finais que compõem estes biofluidos, denominado metaboloma de biofluidos, é de extrema importância não apenas na odontologia, mas também na medicina para a avaliação de processos patológicos, como forma de diagnóstico (Fidalgo, 2010).

Além de ressaltar aspectos inovadores em pesquisa, Jinchun Sun et al. (2012) e Petersen et al (2014), mostraram que associações entre as variantes genéticas e alterações de metabólitos podem fornecer uma descrição única de genótipo e fenótipo de um indivíduo. Consequentemente, deve-se então salientar que a capacidade da metabolômica em identificar precisamente biomarcadores translacionais relacionados às injúrias ao rim, fígado, coração e ao sistema vascular faz com que ela seja de grande importância no contexto da medicina personalizada.

Muitos benefícios têm sido mostrados na identificação de biomarcadores envolvidos na DRC e diversos estudos (Toyohara et al., 2010; Shah et al., 2013; Mutsaers et al., 2013; Duranton et al., 2014) corroboram o potencial das técnicas para análise metabolômica no diagnóstico de pacientes com doenças crônicas.

Sharma et al. (2013) relataram que a análise metabolômica de urina pode ser uma plataforma clinicamente útil, já que é capaz de fornecer identidades metabólicas e novos critérios bioquímicos para o diagnóstico de pacientes diabéticos e com DRC.

Villas-Bôas e Gombert (2006) relataram que os metabólitos podem agir como substratos, produtos ou cofatores nas reações bioquímicas, e, certamente, desempenham papel muito importante na conexão das diferentes vias metabólicas que operam dentro de uma célula viva. O uso de técnicas analíticas mais precisas no delineamento de novos estudos para identificação de outros biomarcadores, assim como a simplificação de ensaios clínicos para melhor traçar o perfil metabólico de um determinado indivíduo, corrobora a significância das “ômicas” em planos de tratamento (Schnackenberg; Beger, 2007).

Diversas metodologias são capazes de identificar biomarcadores, dentre elas a espectrometria de massas, muito utilizada na detecção de proteínas, e os diferentes tipos de cromatografia: gás-líquida (GLC) de coluna e de alta performance (HPLC). No entanto, essas metodologias requerem como pré-requisito conhecimento amplo sobre as biomoléculas a serem avaliadas (Fidalgo, 2010).

Fiehn (2002) propôs uma classificação das diversas abordagens disponíveis para a análise dos metabólitos, dividindo-as em quatro grupos: (a) análise direcionada, (b) perfil metabólico, (c) metabolômica e (d) “fingerprinting” metabólico. Porém, em função da complexidade das análises de metaboloma, sugeriu-se que a palavra metabolômica fosse utilizada para descrever a nova área da ciência responsável pela análise do metaboloma, em vez de se referir apenas a uma abordagem analítica específica. Sendo assim, do ponto de vista analítico há duas abordagens principais para se analisar o metaboloma: (a) análise direcionada e (b) perfil metabólico, sendo este último subdividido em (i) “fingerprinting” metabólico, referindo-se a metabólitos intracelulares e (ii) “footprinting” metabólico para perfil de metabólitos extracelulares.

A análise direcionada refere-se à determinação de um grupo de metabólitos pré-definidos, ignorando quaisquer outros metabólitos que tenham sido detectados durante a análise. Já o perfil metabólico está relacionado ao conjunto de metabólitos ou produtos derivados deles (identificáveis ou não), que sejam detectados em uma amostra utilizando-se determinada técnica analítica específica e acompanhados por uma estimativa de quantidade, seja ela absoluta ou relativa (Villas-Bôas; Gombert, 2006).

Considerando-se o atual estágio de desenvolvimento das “ômicas”, a análise de metaboloma não tem o objetivo apenas de caracterizar alguns compostos por vez, mas vários compostos de uma só vez, sendo possível a identificação e quantificação de vários metabólitos, o que permite melhor compreensão das alterações fisiológicas e metabólicas do indivíduo. No entanto, vale ressaltar que vários intermediários metabólicos possuem tempo de vida intracelular muito curto, dificultando, assim, em alguns casos, sua detecção.

Não obstante, a identificação de metabólitos produzidos por processos catabólicos do organismo e por reações metabólicas dos medicamentos em uso por indivíduos com DRC oferece contínua oportunidade para a otimização de métodos

diagnósticos nas áreas médica e odontológica, e permite a avaliação da resposta de organismos à(s) medicação(ões) em uso, além de auxiliar no monitoramento de progressão das doenças (Weiss; Kim, 2011).

2.4 Doença periodontal em indivíduos nefropatas

A doença periodontal é uma condição inflamatória crônica dos tecidos de suporte dentário que resulta da infecção e interação de microorganismos específicos com componentes da resposta imunológica do hospedeiro. A presença desses microorganismos no biofilme subgengival leva à liberação de enzimas proteolíticas que são capazes de degradar o tecido gengival. No entanto, o mecanismo da resposta sistêmica aos periodontopatógenos depende da quantidade de bactérias, antígenos, endotoxinas e citocinas inflamatórias presentes no sistema circulatório (Vilela et al., 2011)

Nas últimas décadas, a crescente preocupação com as possíveis associações entre doenças da cavidade bucal, como exemplo, a periodontite, e várias outras doenças sistêmicas como artrite reumatóide, doenças pulmonares e a DRC, tem gerado um maior número de estudos, a fim de se esclarecer o mecanismo pelo qual essas patologias vêm se desenvolvendo. Fisher et al. (2011) demonstraram relação bidirecional entre DRC, suas comorbidades e DP por meio de modelos de equações estruturais e sugeriram que o efeito da DP na DRC pode ter dois componentes, um efeito direto e outro efeito mediado pela duração do diabetes e hipertensão, no adulto.

Vilela et al. (2011)–mostraram associação entre periodontite crônica (PC) e a maior prevalência de *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella nigrescens* e *Candida albicans* em pacientes com DRC, quando comparados a pacientes clinicamente saudáveis (controle). Além disso, a PC se mostrou mais severa em pacientes que apresentaram maior perda de função renal (estágios 3,4 e 5) e que foram submetidos ao transplante.

Concatenando a esse estudo, Alves et al. (2016) mostraram que bactérias como *Corynebacterium argentoflavum*, *Acinetobacter ursingii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythensis* apresentam alta prevalência em pacientes com DRC.

A alta prevalência desses microrganismos em pacientes com DRC pode ser atribuída às anormalidades do sistema imune humoral e celular e da atividade fagocitária descritas em estudos *in vivo* e *in vitro*, associadas ao quadro de uremia presente nesses indivíduos (Vilela et al., 2011).

Os patógenos periodontais podem estar relacionados com adesão, invasão e proliferação em células endoteliais de artérias coronárias, levando à formação do ateroma. Como doenças cardiovasculares e DRC compartilham muitos dos fatores de risco, torna-se biologicamente plausível dizer que a doença periodontal tem efeitos semelhantes sobre a vascularização renal (Grubbs et al., 2011).

Kshirsagar et al., 2007, mostraram que indivíduos com alto título de anticorpos para *P.gingivalis*, *T.denticola*, *S.Noxia*, *A.actinomycetemcomitans*, *V.parvula* foram os que apresentaram maior redução da função renal, comparados aos indivíduos com baixo título de anticorpos aos mesmos microrganismos.

As HSP são talvez os autoantígenos relacionados com a doença periodontal mais estudados. Tecidos gengivais afetados pela DP apresentam uma suprarregulação na expressão da HSP 60. Esta proteína mostrou induzir secreção de citocinas pró-inflamatórias por células apresentadoras de antígenos, ativar células-T na estimulação primária e, portanto, prolongar o processo inflamatório, assim como descrito para a DRC.

Sharma et al. (2013) relataram que a DP pode ter impacto na intensidade da inflamação sistêmica e que supostos mecanismos para tal incluem: infecção metastática por meio de bactérias periodontais; inflamação metastática a partir da resposta imune no local e que se espalha pela circulação, e injúria metastática causada por patógenos periodontais ou seus produtos, os quais adentram a circulação, e, conseqüentemente, estimulam tanto a fase aguda quanto as respostas ao estresse oxidativo.

Apesar de diversos estudos demonstrarem relação entre a DP e a DRC, os resultados encontrados ainda são inconsistentes na literatura. Esse fato talvez ocorra porque a grande maioria dos estudos é transversal e avalia a prevalência da DP em pacientes nefropatas ao invés de avaliar o impacto da DP na evolução da DRC (Grubbs et al., 2011).

De acordo com Kshirsagar et al. (2007), periodontopatógenos podem causar injúria celular ao néfron ou à sua vascularização, e indivíduos com periodontite podem apresentar episódios crônicos e recorrentes de bacteremia. As bactérias podem ser filtradas do sangue nos glomérulos, onde esses microrganismos ou seus produtos podem invadir o endotélio capilar ou células mesangiais/ matriz.

Uma revisão sistemática de 2013 Chambrone et al. mostrou que a periodontite pode ser considerada um fator de risco não tradicional para a DRC devido aos seguintes fatores: (a) quantidade de inflamação sistêmica causada pela inflamação periodontal e seus mediadores inflamatórios locais produzidos como IL-1, IL-6, PGE2 e TNF- α ; e (b) presença de bactérias e seus produtos na corrente sanguínea (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Modelo hipotético de como a periodontite pode ser uma potencial causa de inflamação local e sistêmica em pacientes com doença renal crônica

Considerando esse achado, Ardalan et al. (2011) relataram que lipopolissacarídeos de periodontopatógenos podem ativar diretamente os receptores “Toll-like” de células epiteliais bucais levando também à produção de citocinas inflamatórias. As atividades mitogênicas da IL-1, IL-6 e TNF- α foram observadas em células mesangiais e epiteliais, e acredita-se que podem levar à inflamação glomerular. Ainda no mesmo estudo, os autores avaliaram a relação entre periodontite e glomerulonefrite e relataram que o tratamento periodontal pode ter colaborado com a redução de proteinúria em indivíduos comprometidos, muito embora os pacientes avaliados também fizeram uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou de bloqueadores de receptores da angiotensina II paralelamente ao tratamento.

Chambrone et al. (2013) relataram que pacientes com periodontite apresentaram aumento na quantidade de proteína C-reativa e consequentemente desencadearam uma resposta inflamatória aguda sistêmica quando comparados a pacientes clinicamente saudáveis. Porém, corroborando o relato de Grubbs et al. (2011), esse estudo concluiu que apesar do número de pesquisas e do tipo de delineamento realizado, ainda há necessidade de se esclarecer se o tratamento periodontal, por si só, pode ou não levar a uma melhora na taxa de filtração glomerular.

Pradeep et al. (2012), avaliando a quantidade de proteína de fase aguda, Pentraxina 3 (PTX3) em plasma sanguíneo, mostraram que seus níveis estão aumentados em condições inflamatórias, como consequência de um grande espectro de doenças, desde infecções a alterações autoimunes e/ou degenerativas. De um modo geral, proteínas de fase aguda podem ser detectadas pela sua atividade na cascata inflamatória. Porém, esses biomarcadores apresentam diferentes funções no sistema imune inato e são secretados por várias células em quantidades diferentes. Nesse estudo, os autores mostraram que a PTX3 é ativamente secretada por células que predominam na atividade da doença periodontal.

A literatura também mostra (Latini et al., 2004) que a PTX3 é um marcador precoce dos quadros de angina instável e infarto do miocárdio. Além disso, pode contribuir com a patogênese da aterosclerose e de eventos tromboembólicos que podem levar a doenças cardiovasculares e DRC. O aumento da quantidade de PTX3 no plasma de pacientes com DRC e que apresentavam doença periodontal, indicou

acúmulo de neutrófilos e monócitos nos locais comprometidos e aumento da quantidade de citocinas como TNF- α , IL-1 e -6.

Pouco se sabe sobre os metabólitos produzidos pelos microrganismos presentes em regiões bucais com comprometimento periodontal, assim como sobre os efeitos dos metabólitos que são produtos do comprometimento sistêmico, dentre eles os ácidos graxos, e/ou produtos das vias de metabolização medicamentosa.

Os possíveis mecanismos que explicam a associação entre periodontite e dislipidemias incluem, infecção, lipopolissacarídeos bacterianos, lipoproteínas séricas, lipoproteínas associadas a proteínas pró-inflamatórias e efeitos dos lipídios provenientes da dieta sobre as funções do sistema imune (Lee et al., 2013).

A hiperlipidemia resultante das alterações no metabolismo de lipídios devido a quantidade inadequada de colesterol ou deficiência genética tem sido relacionada à potencialização da DP. A alta quantidade de colesterol ou de ácidos graxos pode inibir funções imunológicas e os efeitos bactericidas sobre *P.gingivalis* no hospedeiro.

Assim, a hiperlipidemia pode influenciar diretamente a indução da doença e indiretamente modular as respostas imunes (Lee et al., 2013, Jaramillo et al. (2013)) relataram que a doença periodontal não tratada pode estar associada a alterações de importantes marcadores lipídicos relacionadas às doenças cardiovasculares.

Pacientes com DP apresentam baixos níveis de HDL ou lipoproteína antiaterogênica; porém, esse fato não está associado ao aumento inesperado de LDL ou lipoproteína pró-aterogênica. A HDL é considerada uma lipoproteína antiaterogênica, pois neutraliza os lipopolissacarídeos da circulação, previne a oxidação da LDL, e evita o transporte de colesterol, já que recebe o colesterol da membrana celular durante sua eliminação.

Os pacientes portadores de DRC frequentemente apresentam grande acúmulo de biofilme bucal, distúrbios do metabolismo de cálcio e fósforo que podem levar a alterações do osso alveolar (assim como perda da lâmina dura), hiperparatireoidismo secundário, diminuição da função de polimorfonucleares, e alguns são submetidos a terapia imunossupressora, o que os torna mais susceptíveis a infecções (Davidovich et al., 2005; Proctor et al., 2005; Bots et al., 2006; Craig, 2008). No entanto, apesar de a doença periodontal afetar apenas 2% a 5% da população pediátrica, comparada a

30% - 40% da população adulta, a instalação precoce da periodontite e da gengivite durante a adolescência é peculiar e apresenta significativa morbidade nessa faixa etária (Katz; Bimstein, 2011).

Pode-se dizer então que, em qualquer caso, se a doença periodontal e a diminuição de leucócitos polimorfonucleares são diagnosticadas precocemente, esses pacientes podem ser tratados com sucesso, sempre observando a necessidade do controle de biofilme. De acordo com Vilela et al. (2011) o percurso da DP pode ser amenizado com o tratamento periodontal, já que haverá redução significativa de marcadores inflamatórios (IL-6, proteína C-reativa, etc).

2.5 Hiperplasia gengival medicamentosa

A importante melhora na sobrevida de órgãos e de pacientes observada nas últimas décadas deveu-se principalmente à otimização da imunossupressão, pelo uso mais adequado de ciclosporina, menores doses de corticosteróides e uso de novos e mais potentes imunossupressores como o micofenolato mofetil, a rapamicina, o tacrolimo e os anticorpos monoclonais humanizados anti IL2R.

Porém, a hiperplasia gengival medicamentosa (HGM) tem sido relatada como um dos principais problemas bucais associados à DRC sobre os tecidos periodontais. O uso desses medicamentos, principalmente inibidores de calcineurina, bloqueadores dos canais de cálcio e imunossupressores pode levar a um quadro de crescimento gengival induzido quimicamente, requerendo um plano de tratamento adequado para amenizar os efeitos ao periodonto.

De acordo com Somacarrera et al. (1994) e Bader et al. (1998), o crescimento gengival pode ocorrer tanto na região anterior quanto na posterior, no entanto, a severidade é maior nas áreas interproximais da região anterior e com maior frequência em faces vestibulares.

Amlodipina é um bloqueador de canal de cálcio com ação prolongada e pertence ao grupo da dihidropiridina, a qual é utilizada para o tratamento de angina e hipertensão. Após 2 – 3 meses de uso da medicação o paciente apresenta crescimento gengival

Bartold (1989) observou que a ciclosporina estimula a síntese do DNA e a atividade proliferativa dos fibroblastos. No caso de hiperplasia gengival por ciclosporina, sugere-se que há o aumento do número de células fibroblásticas acompanhado por aumento proporcional da matriz extracelular. Há relato na literatura de que a prevalência de hiperplasia induzida pelo uso de ciclosporina em pacientes que foram submetidos ao transplante renal varia de 22 – 58% (Davidovich et al., 2005).

Em 2008 Craig relatou que a hiperplasia gengival pode estar associada ao aumento da dosagem de ciclosporina administrada a esses pacientes, corroborando o relato de Bartold (1989). Porém, alternativas terapêuticas como o uso de antibióticos - azitromicina, metronidazol e claritromicina, os quais apresentam ação antibactericida, podem levar à redução da inflamação local, e possível supressão da síntese de proteína nos fibroblastos, antes mesmo que a hiperplasia se instale.

Locsey et al (1986) e Bertram et al. (2009) relataram higiene bucal precária e inflamação gengival em curso, em pacientes que fazem hemodiálise. Estes pacientes, por estarem em estágio crônico da doença, poderiam apresentar síndrome urêmica e a uremia poderia estar relacionada à disfunção imune, afetando assim a função dos linfócitos e monócitos.

Os pacientes renais crônicos apresentam um quadro de doença bucal avançado e os resultados de diversos estudos sugerem, portanto, a necessidade de programas de promoção e prevenção de saúde bucal, colaborando com a melhora da saúde geral e da qualidade de vida.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Por meio de um estudo transversal analítico e descritivo, avaliar o metaboloma de biofluidos de adolescentes e adultos jovens com DRC, estágios 1-5, e estabelecer uma possível associação com a doença periodontal.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e interpretar a atividade dos metabólitos endógenos na urina e saliva;
- Identificar possíveis biomarcadores relacionados com o desenvolvimento da doença renal e doença periodontal;
- Identificar possíveis metabólitos que sejam produzidos por microrganismos associados à doença periodontal e que podem potencializar a doença renal.

4 CASUÍSTICA – MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo no qual participaram 60 adolescentes e adultos jovens divididos em 4 grupos e pareados por gênero e idade. Os grupos foram compostos da seguinte forma:

- Grupo I - indivíduos com DRC e sem DP (n=15);
- Grupo II – indivíduos com DRC e DP (n=15);
- Grupo III – indivíduos sem DRC e sem DP (n=15);
- Grupo IV – indivíduos sem DRC e com DP (n=15).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (FOUSP) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (Anexo A). Os responsáveis legais concederam autorização para a realização do estudo, após terem lido e concordado com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, previamente elaborado pelo pesquisador (Apêndice C).

A coleta dos dados clínicos foi realizada por dois examinadores (RCS e LACA), previamente calibrados (Peres et al., 2001). Realizamos a calibração inter e intra-examinador por meio de um estudo piloto, para verificar a concordância. Foram examinadas 10 crianças da clínica de Odontopediatria da FOUSP e reexaminadas após um intervalo de 10 dias.

Realizamos as mensurações das seguintes variáveis índice de placa, índice cálculo e profundidade de sondagem, e os valores de concordância Kappa intra-examinador obtidos foram 0,89, 0,73 e 0,82, respectivamente. Os valores de concordância Kappa inter-examinador foram de 0,85; 0,78 e 0,78, respectivamente.

Figura 4.1 – Modelo representativo do delineamento da pesquisa

Contatamos todas as crianças e adultos jovens com diagnóstico médico definitivo de DRC (estágios 1 a 5), cadastrados no CAPE (Centro de atendimento a Pacientes Especiais) / FOU SP e no Instituto da Criança (ICR) / FMUSP, idade entre 12-18 anos e as convidamos a participarem do estudo. Aqueles com número de lesões de cárie por dente > 3 e que fizeram uso de antimicrobianos e antiinflamatórios nos 6 meses anteriores à avaliação, e/ou que foram submetidos a tratamento periodontal nos últimos 6 meses, usuários de aparelho ortodôntico e tabagistas, foram excluídos da amostra final.

Convidamos também, crianças / adultos jovens saudáveis, pareados por gênero e idade que estivessem de acordo com os mesmos critérios de exclusão a participarem do estudo.

Encaminhamos e/ou tratamos todos os participantes do estudo à Clínica do CAPE - FOU SP ou à divisão de Odontologia do ICR - FMUSP. Realizamos procedimentos como instruções sobre higiene bucal e orientações dietéticas, além de medidas preventivas como fluoterapia e tratamentos interceptativos.

4.1 Anamnese e avaliação bucal

Coletamos os dados demográficos e clínicos (história médica pregressa e uso de medicamentos) dos pacientes durante a anamnese. Todas as avaliações foram feitas por dois examinadores (LACA e RCS) previamente treinados e calibrados (Peres et al., 2001).

Realizamos o exame clínico odontológico (índice CPOD, índice de placa, índice de cálculo dentário, sangramento à sondagem e profundidade de sondagem – Apêndice D), fornecemos orientações quanto às coletas de urina e saliva, e todos os pacientes receberam um frasco estéril para a coleta de urina e entrega na próxima consulta.

Para todos os grupos realizamos o exame clínico odontológico em uma sala sob luz artificial focada, com o auxílio de espelho clínico, gaze, espátula de madeira, sondas periodontais da marca TRINITY do tipo 621 da OMS, recomendada pela ADA (American Dental Association) / AAP (American Academy of Periodontology). Esta sonda apresenta uma esfera de 0,5 mm de diâmetro em sua extremidade e uma faixa colorida entre as medidas de 3,5 mm e 5,5 mm que permite a identificação de bolsas nessa faixa de profundidade (Landry; Jean, 2002), além dos equipamentos de proteção individual (EPIs).

Secamos as superfícies dentárias com gaze estéril para facilitar a visualização e utilizamos o índice proposto pela World Health Organization (1997), CPO-D (dentes cariados, perdidos ou obturados) para avaliarmos a presença ou ausência da doença cárie.

Medimos a quantidade de placa e cálculo numericamente, variando de 0 a 3, de acordo com os seguintes critérios:

Índice de placa:

- - grau zero (0) – ausência de placa ou mancha extrínseca;
- - grau um (1) – presença de placa cobrindo não mais de 1/3 da superfície examinada, ou ausência de placa, mas presença de mancha extrínseca;
- - grau dois (2) – presença de placa cobrindo mais de 1/3, mas não mais de 2/3 da superfície examinada, poderá haver ou não presença de mancha extrínseca;
- - grau três (3) – presença de placa cobrindo mais de 2/3 da superfície examinada (terço gengival, médio e oclusal).

Obtivemos o índice de placa por meio da soma dos valores encontrados dividido pelo número de superfícies avaliadas.

Índice de cálculo:

- - grau zero (0) – ausência de cálculo supra ou subgengival;
- - grau um (1) – presença de cálculo supragengival cobrindo não mais de 1/3 da superfície examinada;
- - grau dois (2) – presença de cálculo supragengival cobrindo mais de 1/3 da superfície, mas não mais de 2/3 da superfície examinada, ou presença de pequenas porções de cálculo subgengival em torno da área cervical do dente;
- - grau três (3) – presença de cálculo supragengival cobrindo mais de 2/3 da superfície examinada ou uma faixa contínua de cálculo subgengival ao longo da região cervical do dente, ou ambos.

O índice de cálculo foi obtido por meio da soma dos valores encontrados, dividido pelo número de superfícies avaliadas.

Índice de sangramento:

Realizamos o índice de sangramento (IS) por meio da verificação de presença de sangue visível nos pontos sondados até 15 segundos pós sondagem. A sondagem foi realizada em gengiva marginal após serem secas com jatos de ar e isoladas com roletes de algodão, nas faces vestibular, lingual/palatina, mesial e distal. Dividimos o número de faces dentais sangrantes pelo número total de faces dentais, obtendo o resultado, que foi anotado e avaliado por meio do teste de Ainamo e Bay (1975), avaliando a presença ou ausência de inflamação em um padrão binomial (contagem dicotômica). Nesse sistema, o sangramento da margem gengival recebeu “1”, enquanto a ausência de sangramento recebeu marcação “0”

Avaliação Periodontal:

Consideramos a cavidade bucal dividida em seis sextantes compreendendo os dentes 17-14; 13-23; 24-27; 37-34; 33-43 e 44-47 e as medições foram realizadas percorrendo-se o sulco gengival de todos os dentes com a sonda em uma posição paralela ao longo eixo das unidades dentais, sendo o maior escore do sextante anotado. Definimos a doença periodontal com base na profundidade de sondagem e sangramento a sondagem: quando houvesse pelo menos 1 sítio por sextante com profundidade de sondagem igual ou maior que 4mm e pelo menos 50% com sangramento à sondagem (adaptado de Marchesan et al., 2015).

4.2 Coleta dos espécimes clínicos

Realizamos a coleta dos espécimes no período da manhã para minimizar os efeitos das variações salivares na sua composição. Instruímos aos pacientes para não ingerirem quaisquer alimentos, nem realizar escovação dentária, pelo tempo mínimo de duas horas, antes dos procedimentos de coleta da saliva.

Coleta de saliva

Para a coleta de saliva, os indivíduos de cada grupo, controle e estudo, permaneceram sentados de forma ereta, em ambiente arejado e calmo, sob as condições descritas anteriormente. Realizamos a coleta da saliva de forma não estimulada por meio da expectoração em um tubo plástico descartável (Falcon®, Rio de Janeiro) de acordo com o método modificado de Navazesh (Navazesh et al., 2008). Orientamos os pacientes a expectorarem 3 mL de saliva nos tubos plásticos imersos em gelo. Após a coleta, os tubos foram hermeticamente fechados, transportados por um período de no máximo 1 hora até o laboratório e armazenados a -80°C até o momento da análise.

Coleta de urina

Pacientes participantes do estudo receberam instruções para que coletassem um volume entre 20 a 40 mL da primeira urina da manhã em frascos de coleta estéreis, por ser mais concentrada, e armazenassem essas amostras sob refrigeração até o momento da consulta. A partir de então, nós armazenamos a amostra a -80°C até o momento da análise (Figura 4.2).

4.3 Preparo e análise metabolômica das amostras

Preparamos e analisamos as amostras no Laboratório de Controle e Simulação de Processos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP (EPUSP). A metodologia de análise da urina foi desenvolvida no próprio laboratório da EPUSP, pela equipe de químicos, engenheiros químicos e cirurgiões-dentistas envolvidos no estudo, e a metodologia de análise da saliva foi adaptada de Barnes et al., 2011).

Após o descongelamento das amostras à temperatura ambiente, transferimos 1000 µL de urina para um tubo plástico (Eppendorf, Germany) de 1,5 mL por meio de uma micropipeta automática (Biohit, 100 a 1000 µL, Brasil). Secamos as amostras em aparelho Speedvac (Centrivap concentrator, Labconco, Brasil) por um período de 2h, ou até secagem completa. Após o processo de secagem realizamos a extração dos compostos (Figura 4.2), em duas etapas.

Figura 4.2 – Coleta, armazenamento e secagem das amostras de urina

(A) Urina

Na primeira etapa, adicionamos 1,0 mL de metanol em tubo plástico contendo a amostra seca, para a extração de moléculas polares, agitamos em agitador do tipo vortex (modelo AP59, Phoenic Luferco, 3800 rpm, Brasil) por 2 minutos, e centrifugamos em centrífuga de laboratório (modelo 800-1, 13000 rpm, Brasil) por 5 minutos. O produto sobrenadante dessa reação foi transferido para um novo tubo plástico, seco em aparelho Speedvac e resuspenso em 250 µL de metanol. O novo produto sobrenadante foi transferido para um tubo Vial (CMS 123TAT, Brasil) transparente de 2 mL com tarja, para posterior injeção de 2 µL da amostra em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS, QP 2010 Plus, Shimadzu do Brasil), coluna DB-1, 50 m de comprimento, diâmetro interno de 0,32 mm e espessura de filme de 1,20 µm (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Processo de extração de metabólitos da urina

Analizamos as amostras nas seguintes condições:

- temperatura do injetor : 280°C
- temperatura inicial da coluna: 50°C
- taxa de aquecimento: 5°C por min até 300°C, permanecendo a essa temperatura por 10 min.
- Tempo total de corrida: 60 min
- Temperatura da fonte de ionização: 300°C
- Corte de solvente : 5 min
- Temperatura de interface: 290°C

Obtivemos um cromatograma de íons total (TIC) com intervalo de massa de 40 a 600 Da.

A segunda etapa consistiu em uma nova extração seguida de derivatização com hexano para extração das moléculas apolares presentes na urina. Adicionamos

1 mL de hexano à amostra no tubo plástico e agitamos em agitador do tipo vortex por 2 segundos. Acrescentamos 200 μ L de solução de hidróxido de sódio metanólico 2 N e fizemos uma nova agitação. Colocamos o tubo por 20 segundos em um banho à 50°C e agitamos manualmente por um minuto. Adicionamos 200 μ L de solução de ácido clorídrico metanólico (2N) e fizemos nova agitação em agitador do tipo vortex por 2 segundos, seguida de centrifugação. Houve a formação de 2 fases, sendo a fase superior a camada orgânica que contém lipídios esterificados solubilizados em hexano. Transferimos o produto sobrenadante dessa reação para um novo eppendorf, seco em aparelho Speedvac e resuspendemos em 250 μ L de hexano. Transferimos o novo produto sobrenadante para um tubo Vial, por meio de uma micropipeta eletrônica para posterior análise de GC-MS, sob as mesmas condições anteriores (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Processo de derivatização dos metabólitos da urina

(B) Saliva

As amostras de saliva foram descongeladas à temperatura ambiente, e 300 μL foram secos em aparelho Speedvac. Posteriormente, adicionamos 300 μL de metanol, agitamos em agitador do tipo vortex por 2 segundos, e novamente secamos em aparelho Speedvac. Seguido ao processo de extração, realizamos a derivatização adicionando a cada eppendorf 150 μL de partes iguais de uma solução de bistrimetil-silil-trifluoroacetamida (250 μL) e uma mistura de solventes, acetonitrila (125 μL): diclorometano (100 μL) :ciclohexano (25 μL) - (v/v 5:4:1) com 5% de trietilamina (25 μL) , agitamos em agitador do tipo vortex novamente por 2 segundos e as mantivemos em banho térmico a 60°C por 1 hora. As amostras foram retiradas do banho térmico e novamente agitadas e centrifugadas (13000 rpm por 2s). O sobrenadante foi transferido para um tubo Vial com insert, por meio de uma micropipeta eletrônica, para análise no GC-MS sob as mesmas condições descritas para as amostras de urina (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Processo de extração e derivatização de metabólitos salivares

5 RESULTADOS

5.1 Análise dos dados clínicos

Realizamos as análises dos dados clínicos a partir da descrição de variáveis categóricas com contagens e proporções, e descrevemos variáveis quantitativas de distribuição normal e assimétrica como média $\pm$ desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil), respectivamente. A normalidade foi avaliada com a inspeção visual de histogramas ou aplicação do teste de normalidade D'Agostino et al. (1990), quando adequado. O nível de significância de 5% ($p < 0.05$) foi aplicado para todos os testes estatísticos. Realizamos as análises estatísticas dos dados por meio do software R (R Foundation, Vienna, Austria) (Horton; Kleinman, 2015, Horton; Kleinman, 2010, Boshnakov, 2012).

Utilizamos o teste exato de Fisher-Freeman-Halton para avaliar associação entre variáveis categóricas em tabelas de contingência maiores que 2x2, e comparamos variáveis quantitativas de distribuição normal entre 2 grupos independentes segundo teste t-Student.

Realizamos também o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis na comparação de variáveis quantitativas de distribuição assimétrica ou quando observamos tamanho da amostra consideravelmente reduzido nos grupos.

5.2 Análise do Perfil Metabólico

Realizamos a análise de componentes principais (PCA) tanto dos metabólitos salivares quanto da urina, viabilizando a redução do número de informações coletadas. Esta análise foi realizada, pois seus resultados são utilizados para selecionar um subconjunto de **m** variáveis capaz de descrever a maior parte da variabilidade dos seus dados. Além disso, os resultados demonstram agrupamentos,

tendências de alocação (fracionamento), valores anômalos (outliers) e relações entre variáveis.

O primeiro plano fatorial foi utilizado para avaliarmos cada indivíduo e o modelo de correlação foi relacionado com os quatro grupos (GI a GIV).

5.3 Dados Demográficos e Clínicos

A partir de triagem realizada no ambulatório médico de Nefrologia Pediátrica do Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr – FMUSP) e do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CAPE-FOUSP), avaliamos primeiramente 50 pacientes na faixa etária de 12 a 18 anos, no período de Dezembro de 2014 a Julho de 2015.

Destes, 5 não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), 6 não retornaram para a fase de coleta das amostras, 5 faziam uso de antimicrobianos, 3 estavam em tratamento ortodôntico e 1 recusou participar do estudo. Após a triagem, realizamos a avaliação clínica de cada indivíduo para distribuição dos mesmos entre os grupos I a IV.

Selecionamos os indivíduos do grupo controle na Clínica de graduação e de Adolescentes do departamento de Ortodontia e Odontopediatria da FOUSP, pacientes estes que estavam apenas em acompanhamento e que também preenchiam os critérios de inclusão. Todos os indivíduos foram pareados por gênero e idade.

Avaliamos, portanto, 60 indivíduos, alocados nos grupos I a IV, como mencionado anteriormente. Podemos observar que a idade média da população sem DP foi de 13,68 ($\pm 1,54$) anos enquanto que a média de idade dos que apresentaram DP foi de 14,90 ($\pm 1,72$) anos. Por meio do teste t-Student, verificamos que houve diferença estatisticamente significativa para as médias de idade comparadas entre os grupos com e sem a DP ($p=0.0052$) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Distribuição e frequência das variáveis clínicas do estudo

Variável	Ausência de DP (N=30)	Presença de DP (N=30)	Valor-p
Idade (Média $\pm$ DP (N))	13.68 $\pm$ 1.54 (N=30)	14.90 $\pm$ 1.72 (N=30)	0.0052°
Gênero			
Feminino	16 (53,3%)	13 (43,3%)	0.62 ³
Masculino	14 (46,7%)	17 (56,7%)	
Sangramento à sondagem			
0	12 (75.0%)	5 (25.0%)	0.041 ³
1	18 (43.2%)	25 (56.8%)	
Índice de placa			
0	20 (74.1%)	7 (25.9%)	0.0002 ⁴
1	8 (60.0%)	6 (40.0%)	
2	2 (20.0%)	9 (80.0%)	
3	0 (0.0%)	8 (100.0%)	
Índice de Cálculo			
Ausente	18 (43.2%)	25 (56.8%)	0.0001 ⁴
Presente	12 (75%)	5 (25.0%)	
Profundidade de Sondagem			
< 3mm	28 (63.61%)	14 (31.9%)	0.0002 ⁴
3 a 4 mm	2 (4.5%)	16 (36.35%)	
>5mm	0	0	

Por meio do teste exato de Fisher, verificamos que houve associação significativa entre sangramento à sondagem e DP (25% x 56.8%, $p=0.0041$). Ao nível de significância de 5%, houve diferença significativa também na proporção entre a presença de DP e índice de placa =0,1,2,3 (Fisher-Freeman Halton test, $p=0.0002$). Como $p < 0,05$ no teste Fisher-Freeman Halton, realizamos testes de permutação para obtermos valores de p ajustados para comparações múltiplas.

Os resultados obtidos nestas comparações podem ser vistos na tabela 5.2, e podemos verificar que houve diferença estatisticamente quanto à presença de DP entre os grupos I x II, I x IV e III x IV.

Tabela 5.2 - Dados descritivos e comparativos entre grupos

Variável	Comparação múltipla	Valor-p
DP	G I x G II	0.004
DP	G I x G III	0.843
DP	G I x G IV	<0.001
DP	G II x G III	0.008
DP	G II x G IV	0.062
DP	G III x G IV	0.002

No que tange às variáveis idade, gênero, sangramento à sondagem, índice de placa, índice de cálculo dentário e profundidade de sondagem quando avaliadas em relação à DRC (Tabela 5.3), verificamos que as variáveis que apresentaram diferença estatisticamente significativa foram: presença de sangramento à sondagem ($p= 0,02$), índices de placa 1, 2 e 3 (*valor-p*: 0,09, 0,04 e 0,03, respectivamente), presença de cálculo ($p= 0,01$) e profundidade de sondagem < 3mm ($p= 0,01$) e entre 3 a 4 mm ($p= 0,02$).

Tabela 5.3 - Dados descritivos e comparativos entre grupos em função dos estágios da DRC

Variável	DRC = 1 (N=3)	DRC = 2 (N=6)	DRC = 3 (N=7)	DRC = 4 (N=9)	DRC = 5 (N=5)	Valor-p
Idade (Mediana (q1-q3))	13.00 (12.00-14.00)	14.50 (12.00-18.00)	15.00 (12.00-16.00)	14.00 (13.00-15.00)	14.00 (14.00-15.00)	0.77 ²
Gênero						
0	0 (0.0%)	3 (23.1%)	4 (30.8%)	5 (38.5%)	1 (7.7%)	0.41 ³
1	3 (17.6%)	3 (17.6%)	3 (17.6%)	4 (23.5%)	4 (23.5%)	
Sang. sond						
0	1 (25.0%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	0 (0.0%)	2 (50.0%)	0.12 ³
1	2 (7.7%)	6 (23.1%)	6 (23.1%)	9 (34.6%)	3 (11.5%)	0.02 ³
Índice de placa						
0	2 (14.3%)	4 (28.6%)	3 (21.4%)	2 (14.3%)	3 (21.4%)	0.81 ³
1	1 (14.3%)	1 (14.3%)	1 (14.3%)	4 (57.1%)	0 (0.0%)	0.09 ³
2	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	2 (50.0%)	1 (25.0%)	0.04 ³
3	0 (0.0%)	1 (20.0%)	2 (40.0%)	1 (20.0%)	1 (20.0%)	0.03 ³
Índice de Cálculo						
Ausente	2(18.1%)	4 (32.1%)	3 (19.2%)	4 (19.1%)	1 (11.5%)	0.09 ³
Presente	1 (4.3%)	2 (18.1%)	4 (31.5%)	5 (32.1)	4 (14.0%)	0.01 ³
Profundidade de Sondagem						
< 3mm	3 (19.2%)	5 (32.1%)	4 (21.1%)	5 (19.9%)	1(7,7%)	0.01 ³
3 a 4 mm	0	2 (21.5%)	2 (23.6%)	4 (31,5%)	4(23,4%)	0.02 ³
> 5 mm	0	0	0	0	0	0.0

³ Teste de Fisher-Freeman-Halton ; ² Teste de Kruskal-Wallis; (valor-p = 0.05)

5.4 Metaboloma Salivar e de urina

Todos os metabólitos salivares e de urina foram colocados em um diagrama de Venn para avaliarmos sua distribuição entre grupos. A quantificação relativa dos metabólitos para cada grupo foi realizada a partir das áreas do cromatograma de íons totais (TIC).

A partir do diagrama de Venn (Figura 5.1), para os metabólitos da urina, observamos que o grupo que apresentou um maior número de metabólitos específicos foi o GIII (535 metabólitos), seguido pelos grupos IV (165 metabólitos), I (83 metabólitos) e II (80 metabólitos), respectivamente. Os grupos que apresentaram o

maior número de metabólitos em comum foram os grupos II e IV (314 metabólitos). Por outro lado, foram encontrados 402 metabólitos comuns aos quatro grupos.

Figura 5.1 – Diagrama de Venn para os metabólitos da urina

Na análise metabolômica da saliva, observando-se o diagrama de Venn (Figura 5.2), verificamos que o grupo que apresentou um maior número de metabólitos exclusivos foi o GIII (404 metabólitos), seguido pelos grupos IV (354), I (187) e II (175), respectivamente. Os grupos que apresentaram o maior número de metabólitos em comum entre si foram os grupos II e IV (203 metabólitos). Todos os demais grupos apresentaram 385 metabólitos em comum.

Figura 5.2 – Diagrama de Venn para os metabólitos salivares

Após essa separação, realizamos a análise de componentes principais (PCA) aplicando-se um filtro para os metabólitos de intersecção entre grupos, tanto para a urina como para a saliva. Autovalores maiores que 1 foram considerados como o número de componentes principais. Na análise salivar, devido à variação de dados (93%), 21 componentes principais foram capazes de explicar esta variação. Sendo que os dois primeiros componentes explicam 21% da variabilidade (Tabela 5.4 e Figura 5.3).

Tabela 5.4 - Autovalores e % de variabilidade na análise de componentes principais dos metabólitos de saliva presentes em 30% da amostra

Componente	Autovalor	% variabilidade
1	53,15	0,20
2	8,50	0,21
3	8,01	0,31
4	7,41	0,35
5	6,54	0,41
6	5,91	0,45
7	4,96	0,52
8	4,73	0,53
9	3,76	0,54
10	3,54	0,61
11	3,45	0,63
12	3,12	0,65
13	3,01	0,71
14	2,98	0,73
15	2,65	0,79
16	2,63	0,81
17	2,31	0,85
18	2,13	0,89
19	1,23	0,90
20	1,08	0,92
21	1,00	0,93

Figura 5.3 – Análise de PCA – Plano fatorial 1 – metabólitos excretados na saliva

Figura 5.4 – Correlação dos metabólitos salivares comuns aos quatro grupos em função da análise de PCA

A análise de correlação para todos os metabólitos salivares comuns aos grupos foi colocada no gráfico em primeiro plano fatorial. Observando este mapa (Figura 5.4), pode-se dizer que, quando a seta é maior em comprimento, maior o valor do desvio total. Como são vários metabólitos, e a fim de facilitar a identificação dos mesmos, todos foram colocados em uma tabela (Apêndice A) e os códigos de identificação utilizados na confecção do gráfico são os mesmos de cada composto de acordo com o HMDB (Human Metabolome database) / CAS (Chemical Abstracts Service).

Avaliando-se, portanto, as correlações entre esses metabólitos salivares, é possível sugerir que há correlação entre os metabólitos 162 (L-prolina) e 294 (uréia), 162 e 161 (L-prolina e L-alanina), 187 e 214 (L-serina e L-ornitina), 562 (creatinina) e 827 (ácido octadecanóico). Por outro lado, a menor correlação fica para o metabólito 220 (ácido hexadecanóico). No entanto, quando avaliamos o terceiro quadrante do gráfico, existe uma sobreposição (*) dos pontos, o que mostra forte correlação entre vários metabólitos, mas que por essa primeira projeção não foi possível separá-los adequadamente. Ou seja, quando avaliados os grupos I a IV simultaneamente.

Desenvolvemos um novo modelo então para realizarmos as comparações entre grupos I e II, II e IV. A partir deste novo modelo, elaboramos uma tabela (Tabela 5.5) de autovalores mostrando uma nova porcentagem de variabilidade. Podemos verificar que 10 componentes principais refletem uma variabilidade de 88%, e os dois primeiros componentes explicam uma variabilidade de 34%.

Um novo gráfico (Figura 5.5) foi elaborado, a fim de melhor compreendermos a distribuição dos metabólitos entre os grupos I e II.

Tabela 5.5 - Autovalores e % de variabilidade na análise de componentes principais dos metabólitos de saliva dos Grupos I e II

Componente	Autovalor	% variabilidade
1	11,14	25
2	10,21	34
3	9,65	37
4	8,54	45
5	7,53	47
6	6,54	54
7	5,77	69
8	4,56	72
9	3,67	73
10	2,01	88

Figura 5.5 – Análise de PCA dos metabólitos salivares em primeiro plano fatorial para os Grupos I e II

A análise da figura 5.5 nos permite observar que há uma melhor separação dos metabólitos entre os grupos I e II e que existe uma maior concentração de metabólitos do Grupo II ao lado direito do gráfico. No entanto, apesar dessa maior concentração, este grupo também apresenta uma maior quantidade de valores anômalos ao lado esquerdo do gráfico, onde podemos observar maior dispersão dos pontos, ou seja, uma maior variabilidade. Os metabólitos em comuns aos dois grupos são aqueles que estão concentrados na área central do gráfico. A maior separação dos pontos do GII, sugere, portanto, que indivíduos com DRC apresentam alteração na concentração dos metabólitos salivares relacionados com a DP.

A figura 5.6 demonstra a nítida correlação encontrada no novo modelo entre os metabólitos nos quatro quadrantes do gráfico para os grupos I e II.

Figura 5.6 - Correlação dos metabólitos salivares comuns aos Grupos I e II em função da análise de PCA. A identificação numérica faz referência aos códigos do HMDB/CAS (APÊNDICE A)

Para os grupos II e IV, realizamos também uma análise de PCA, e verificamos que há 9 componentes principais (Tabela 5.6), variabilidade de 89%, e os dois primeiros refletem uma variabilidade de 37%.

Tabela 5.6 - Autovalores e % de variabilidade na análise de componentes principais dos metabólitos de saliva dos Grupos II e IV

Componente	Autovalor	% variabilidade
1	15,78	29
2	9,76	37
3	4,88	45
4	2,15	51
5	2,08	67
6	1,99	75
7	1,86	78
8	1,33	80
9	1,02	89

O gráfico da Figura 5.7 demonstra que há evidente separação entre os metabólitos excretados pelos grupos II e IV e esta acontece no primeiro plano fatorial.

Figura 5.7 - Metabólitos salivares dos grupos II e IV

Realizamos a análise estatística da quantificação relativa de cada metabólito salivar, e a fim de abrangermos aqueles que estavam presentes em ao menos 80% da amostra utilizamos um filtro com esse percentual. As tabelas 5.7 e 5.8 mostram apenas os metabólitos salivares que foram estatisticamente significantes, comparando-se os grupos I x II e II x IV. Utilizamos o teste de Mann-Whitney para DRC e DP.

Tabela 5.7 – Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos salivares em comum para os grupos I e II e *valor-p* do teste de Mann-Whitney

Metabólito Salivar	G I			G II			<i>valor-p</i>
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
Ácido propanóico	5,55	5,46	0,44	6,54	8,43	1,34	<0.0002
Ácido acético	4,44	4,76	0,32	5,67	2,56	2,34	<0.0001
L-Alanina	6,89	5,88	1,56	4,56	3,88	1,24	<0.0001
Glicina	5,77	2,33	2,11	2,34	2,11	1,11	<0.0001
Ácido fosfórico	3,67	2,33	3,14	1,23	4,55	3,15	0.0350
Uréia	4,32	3,88	2,11	4,57	2,98	1,14	<0.0001
L-Ornitina	5,67	4,67	1,09	4,66	5,22	1,23	<0.0002
Ácido capróico	8,99	6,78	1,17	9,76	8,45	2,35	<0.0001
Beta-L-Manopirose	4,67	2,67	1,13	4,12	1,67	1,45	<0.0310
Ácido hexadecanóico	11,45	9,66	2,44	17,89	8,77	0,75	<0.0001
Ácido octadecanóico	4,76	2,36	1,56	3,78	1,35	1,25	<0.0001
Ácido butírico, 2-metil-4-(2,5-xilil)-	35,78	31,8	1,67	21,24	12,87	1,55	<0.0001
Beta-D-Xilopiranoze	1,45	0,87	1,09	2,55	2,33	3,12	0.0320
Tirosina	11,65	10,34	3,11	15,76	11,31	2,58	0.0210
Ácido tetradecanóico	11,56	10,51	1,23	10,45	1,23	1,09	<0.0002
Ácido pentanóico	32,7	25,65	2,31	17,56	3,56	0,56	<0.0007
Creatinina enol	33,87	29,3	1,45	28,56	21,21	3,55	<0.0004
L-Serina	21,78	19,56	1,21	18,45	12,67	4,12	<0.0001
Propano, 1,2,3-tricloro-2-methyl-	45,78	41,23	0,87	34,7	23,1	2,87	<0.0001
Ciclopentano, 1,2-dipropil-	13,56	11,54	2,13	11,8	12,6	0,32	<0.0001
L-Prolina	3,45	3,74	0,23	10,7	8,54	0,65	<0.0002
L-Leucina	4,90	2,56	2,10	2,89	1,23	1,45	<0.0003
Furano, 2,5-bis(2-furanilmetil)-	1,89	3,71	1,12	0,88	2,44	0,65	<0.0001
Ácido benzóico	6,88	5,61	2,56	2,67	2,31	2,35	<0.0001
Ácido carbâmico, [2-[(cianometil)amino]-1-metil-2-oxoetil]-, 1,1-dimetiletil ester, (s)-	4,66	1,44	3,43	1,56	1,81	0,65	<0.0002
Piridina, 2,5-dicloro-	8,55	2,45	1,23	9,78	3,78	0,45	<0.0001
1-Propanotiol, 2-(9-borabíciclo[3.3.1]non-9-iloxi)-	5,31	3,58	2,34	3,56	4,11	0,11	<0.0002
Imidazol, 4-aminocarbonil-5-fluoro-1-.beta.-d-ribofuranosil-	23,56	21,43	0,98	18,3	11,3	3,01	<0.0001
1,3,5-Triazina	1,65	0,87	2,56	0,87	11,3	0,65	<0.0001
Ácido pentanodióico	15,56	12,34	1,77	12,55	10,7	0,33	<0.0001
(.+/-)-2,3-Butanodiol	1,34	0,98	0,63	0,87	2,34	0,65	<0.0001
Ciclohexanol	1,55	0,76	1,24	1,11	1,45	1,43	0.0410

Tabela 5.8 – Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos salivares em comum para os grupos II e IV e *valor-p* do teste de Mann-Whitney

Metabólito Salivar	G II			G IV			<i>valor-p</i>
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
Ácido propanóico	6,54	8,43	1,34	9,54	3,43	2,24	<0.0002
Ácido acético	5,67	2,56	2,34	1,34	4,56	2,09	<0.0001
L-Alanina	4,56	3,88	1,24	4,56	3,88	1,24	<0.0001
Glicina	2,34	2,11	1,11	2,34	2,11	1,11	<0.0001
Ácido fosfórico	1,23	4,55	3,15	4,57	2,98	1,14	<0.0001
Uréia	4,57	2,98	1,14	4,66	5,22	1,23	<0.0002
L-Ornitina	4,66	5,22	1,23	7,76	2,45	2,35	<0.0001
Ácido capróico	9,76	8,45	2,35	4,12	1,67	1,45	<0.031
Beta-L-Manopirose	4,12	1,67	1,45	7,89	2,77	0,75	<0.0001
Ácido hexadecanóico	17,89	8,77	0,75	13,48	11,58	1,25	<0.0001
Ácido butírico, 2-metil-4-(2,5-xilil)-	3,78	1,35	1,25	10,45	1,23	1,09	<0.0002
Beta-D-Xilopirranose	21,24	12,87	1,55	17,56	3,56	0,56	<0.0007
Tirosina	2,55	2,33	3,12	28,56	1,21	3,55	<0.0004
Ácido tetradecanóico	15,76	11,31	2,58	8,35	7,67	8,35	<0.0001
Ácido pentanóico	10,45	1,23	1,09	4,7	23,1	4,7	<0.0001
Creatinina enol	17,56	3,56	0,56	11,8	12,6	0,32	<0.0001
L-Serina	28,56	21,21	3,55	10,7	9,54	0,65	<0.0002
Propano, 1,2,3-tricloro-2-methyl-	18,45	12,67	4,12	2,89	1,23	1,45	<0.0003
Ciclopentano, 1,2-dipropil-	34,7	23,1	2,87	1,88	2,44	0,65	<0.0001
L-Prolina	11,8	12,6	0,32	18,23	12,31	2,42	<0.0001
L-Leucina	10,7	8,54	0,65	1,56	1,81	0,65	<0.0002
Furano, 2,5-bis(2-furanilmetil)-	2,89	1,23	1,45	6,78	3,78	0,45	<0.0001
Ácido benzóico	0,88	2,44	0,65	3,56	4,11	0,11	<0.0002
Ácido carbâmico, [2-[(cianometil)amino]-1-metil-2-oxoetil]-, 1,1-dimetiletil ester, (s)-	2,67	2,31	2,35	18,3	11,3	3,01	<0.0001
Piridina, 2,5-dichloro-	9,78	3,78	0,45	6,78	3,78	0,45	<0.0001
1-Propanotiol, 2-(9-borabicyclo[3.3.1]non-9-yloxy)-	3,56	4,11	0,11	3,56	4,11	0,11	<0.0002
Imidazol, 4-aminocarbonyl-5-fluoro-1-.beta.-d-ribofuranosyl-	18,3	11,3	3,01	18,3	11,3	3,01	<0.0001
Ácido octadecanóico, trimethylsilyl ester	0,87	11,3	0,65	9,34	11,23	0,45	<0.0002
1,3,5-Triazina, 2,4,6-tris[(trimethylsilyl)oxy]-	12,55	10,7	0,33	0,87	11,3	0,65	<0.0001
Ácido pentanodióico, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, bis(trimethylsilyl) ester	9,78	3,78	0,45	12,55	11,7	0,33	<0.0001
(.+/-)-2,3-Butanodiol diTMS	0,87	2,34	0,65	0,87	2,34	0,65	<0.0001
Ciclohexanol, TMS derivative	1,11	1,45	1,43	1,11	1,45	1,43	0.041

Para a análise metabolômica da urina, mantivemos os mesmos critérios de PCA utilizados para a análise salivar, e observando-se a Figura 5.8 da primeira componente na análise de PCA, verificamos para a análise de urina que há uma melhor distinção dos metabólitos excretados pelos grupos I e II, ou seja, entre os grupos com DRC, porém, na ausência ou presença de DP, respectivamente. Quando avaliamos os grupos III e IV, verificamos que para ambos, torna-se mais difícil distinguir os metabólitos excretados por um grupo ou outro.

Tanto os metabólitos excretados pelo GI como pelo GII são mais heterogêneos, já que apresentam uma maior dispersão no gráfico. No entanto, quando comparado ao gráfico para os resultados da saliva, a heterogeneidade demonstrou ser ainda maior.

Utilizando-se o mesmo referencial de filtro (80%) para a saliva, a análise de PCA conseguiu separar os componentes principais dos grupos com e sem DRC. Assim, podemos dizer que há metabólitos diferentes entre os grupos. Já no caso da DP, podemos verificar que os grupos II e IV não compartilham do mesmo plano, sugerindo que a correlação dos metabólitos em ambos os grupos se apresenta de maneira distinta.

Figura 5.8 - Metabólitos da urina – Grupos I a IV

Figura 5.9 - Correlação dos metabólitos da urina comuns aos Grupos em função da análise de PCA. A identificação numérica faz referência aos códigos do HMDB/CAS (Apêndice B).

A figura 5.9 demonstra a nítida correlação encontrada no primeiro plano fatorial entre os metabólitos nos quatro quadrantes do gráfico para todos os grupos.

Novamente realizamos a análise estatística da quantificação relativa de cada metabólito, porém para a urina, e a fim de abrangermos aqueles que estavam presentes em ao menos 80% da amostra, um filtro com esse percentual foi mantido.

As tabelas 5.9 e 5.10 mostram apenas os metabólitos da urina que foram estatisticamente significantes, comparando-se os grupos I x II e II x IV. Utilizamos o teste de Mann-Withney para DRC e DP.

Tabela 5.9 – Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos da urina em comum para os grupos I e II e *valor-p* do teste de Mann-Whitney

Metabólito Urina	G I			G II			<i>valor-p</i>
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
4-Hydroxipiperidina	8,59	6,48	0,44	28,56	3,78	1,13	<0.0007
Acetofenona	9,24	5,78	0,32	18,45	4,11	2,44	<0.0004
4-metil-fenol (p-cresol)	1,45	5,09	1,56	34,7	2,33	1,56	<0.0008
2-metoxi-fenol	6,98	3,65	2,11	11,8	1,31	0,65	<0.0001
Uréia,	2,76	1,67	3,14	10,7	1,23	1,45	<0.0001
Ciclohexanol, 5-metil-2-(1-metiletil)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-(./.-)-	1,56	2,77	2,11	2,89	3,78	0,65	<0.0002
Metilsalicilato	3,46	1,45	1,09	4,66	5,22	1,23	<0.0003
Indol	6,78	2,56	1,17	0,32	2,45	2,35	<0.0001
Benzamida	1,56	1,45	1,13	1,56	1,67	1,45	<0.031
ácido 5-hidroxipecólico	9,76	3,56	2,44	2,11	2,77	0,75	<0.0001
Glicina	3,56	2,45	1,56	3,14	1,35	1,25	0.085
1H-Indol-3-ácido acético	1,45	3,67	1,67	0,32	0,87	1,13	<0.0001
Ácido hexadecanóico	1,45	4,78	1,09	1,56	2,33	2,44	<0.0001
Xantina	8,98	2,55	3,11	15,76	1,31	1,65	<0.0001
L-Glutamina	5,76	7,88	1,23	10,45	1,23	1,09	<0.0002
Ácido tetradecanóico	9,66	4,66	2,31	17,56	3,56	0,56	<0.0007
1-Undeceno, 7-methyl-	1,34	4,88	1,45	28,56	1,21	3,55	<0.0004
Ácido octadecanóico, methyl ester	2,35	9,76	1,21	18,45	12,67	4,12	<0.0001
L-citrulina	8,66	3,65	0,87	14,7	23,1	2,87	<0.0001
Glicil-l-triptofil-glicine	3,87	2,54	2,13	11,8	12,6	0,32	<0.0001
Eicosano	2,67	1,78	0,76	10,7	9,54	0,65	<0.0002
Cyclohexano	8,65	5,55	2,10	2,89	1,23	1,45	<0.0003
Cyclopentano, metil-	3,56	7,31	1,12	1,88	2,44	0,65	<0.0001
Dialdeído malônico	5,67	4,43	2,56	9,67	2,31	2,35	<0.031
Metil benzoato, 2-methoxi-3-nitro-	3,99	4,77	3,43	1,56	1,81	0,65	<0.0001
3,7,11,15,18-Pentaoxa-2,19-disilaeicosano, 2,2,19,19-tetrametil-	8,55	2,45	1,23	6,78	3,78	0,45	<0.0001
4-Morfolinaetanol	1,25	1,58	2,34	3,56	4,11	0,11	<0.0001
Benzenoetanol, 4-metil-	3,56	0,43	0,98	18,3	2,33	3,01	0.032
2-Propenoico acido, 3-(2-hydroxifenil)-, (E)-	2,67	4,54	1,56	10,5	1,31	2,05	0.021
2-Oxabiciclo[2.2.2]octan-6-ol, 1,3,3-trimetil-	2,45	2,87	2,56	0,87	1,23	1,17	<0.0001
Ciclopropano, 1-metil-2-(1-metiletil)-3-(1-metiletilidene)-, cis-	2,67	7,34	1,77	12,55	3,56	1,13	<0.0001
2-Metoxi-4-vinilfenol	1,56	9,98	0,63	0,87	1,21	2,44	<0.0001
Fenol, 2,5-bis(1,1-dimetiletil)-	3,46	4,77	2,34	28,56	12,67	1,56	<0.0002
2H-Indol-2-ona, 3-diazo-1,3-diidro-	1,24	1,58	1,56	34,7	12,6	1,09	<0.0004
Ciclooctasiloxano, hexadecametil-	2,56	0,43	2,56	11,8	9,54	3,11	<0.0001
Cafeína	1,44	4,54	0,87	10,7	2,33	1,23	<0.0001
Ciclopentano, metil-	6,78	2,87	2,13	2,89	1,31	2,31	<0.0001
2-Piperidinona	3,45	1,77	0,76	5,55	1,23	1,45	<0.0002
Cicloheptasiloxano, tetradecametil-	4,11	2,45	0,98	18,45	23,1	1,67	<0.0007

Tabela 5.10 – Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos da urina em comum para os grupos II e IV e *valor-p* do teste de Mann-Withney

(*continua*)

Metabólito Urina	G II			G IV			<i>valor-p</i>
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	
4-Hydroxipiperidina	28,56	3,78	1,13	28,56	3,78	1,13	<0.0007
Acetofenona	18,45	4,11	2,44	1,45	0,11	1,23	<0.0004
4-metil-fenol (p-cresol)	34,7	2,33	1,56	4,7	2,33	1,56	<0.0008
2-metoxi-fenol	11,8	1,31	0,65	11,8	1,31	0,65	<0.0001
Uréia,	10,7	1,23	1,45	10,7	1,23	1,45	<0.0001
Ciclohexanol, 5-metil-2-(1-metiletil)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-(./-.)-	2,89	3,78	0,65	2,89	3,78	0,65	<0.0002
Metilsalicilato	4,66	5,22	1,23	4,66	5,22	1,23	<0.0003
Indol	0,32	2,45	2,35	0,32	2,45	2,35	<0.0001
Benzamida	1,56	1,67	1,45	1,56	1,67	1,45	<0.031
ácido 5-hidroxipecólico	2,11	2,77	0,75	2,11	2,77	0,75	<0.0001
Glicina	3,14	1,35	1,25	3,14	1,35	1,25	<0.0004
1H-Indol-3-ácido acético	0,32	0,87	1,13	0,32	0,87	1,13	<0.0001
Ácido hexadecanóico	1,56	2,33	2,44	1,56	2,33	2,44	<0.0001
Xantina	15,76	1,31	1,65	2,34	0,63	1,24	<0.0008
L-Glutamina	10,45	1,23	1,09	10,45	1,23	1,09	<0.0002
Ácido tetradecanóico	17,56	3,56	0,56	17,56	3,56	0,56	<0.0007
1-Undeceno, 7-methyl-	28,56	1,21	3,55	28,56	1,21	3,55	<0.0004
Ácido octadecanóico, methyl ester	18,45	12,67	4,12	18,45	12,67	4,12	<0.0001
L-citrulina	14,7	23,1	2,87	1,23	3,41	1,57	<0.0001
Glicil-l-triptofil-glicine	11,8	12,6	0,32	11,8	12,6	0,32	<0.0001
Eicosano	10,7	9,54	0,65	2,34	1,65	0,21	<0.0007
Cyclohexano	2,89	1,23	1,45	2,89	1,23	1,45	<0.0003
Cyclopentano, metil-	1,88	2,44	0,65	1,88	2,44	0,65	<0.0001
Dialdeído malônico	9,67	2,31	2,35	0,23	1,54	2,91	<0.0001
Metil benzoato, 2-methoxi-3-nitro-	1,56	1,81	0,65	1,56	1,81	0,65	<0.0001
3,7,11,15,18-Pentaoxa-2,19-disilaeicosano, 2,2,19,19-tetrametil-	6,78	3,78	0,45	6,78	3,78	0,45	<0.0001

Tabela 5.10 – Valores referentes à média, mediana e desvio padrão da concentração dos metabólitos da urina em comum para os grupos II e IV e *valor-p* do teste de Mann-Withney

Metabólito Urina	G II			G VI			(conclusão)
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP	<i>valor-p</i>
4-Morfolinaetanol	3,56	4,11	0,11	3,56	4,11	0,11	<0.0001
Benzenoetanol, 4-metil-	18,3	2,33	3,01	18,3	2,33	3,01	0.032
2-Propenoico acido, 3-(2-hydroxifenil)-, (E)-	10,5	1,31	2,05	10,5	1,31	2,05	0.021
2-Oxabiciclo[2.2.2]octan-6-ol, 1,3,3-trimetil-	0,87	1,23	1,17	0,87	1,23	1,17	<0.0001
Ciclopropano, 1-metil-2-(1-metiletil)-3-(1-metiletilidene)-, cis-	12,55	3,56	1,13	2,34	5,38	2,73	<0.0001
2-Metoxi-4-vinilfenol	0,87	1,21	2,44	0,87	1,21	2,44	<0.0001
Fenol, 2,5-bis(1,1-dimetiletil)-	28,56	12,67	1,56	28,56	12,67	1,56	<0.0002
2H-Indol-2-ona, 3-diazo-1,3-diidro-	34,7	12,6	1,09	34,7	12,6	1,09	<0.0004
Ciclooctasiloxano, hexadecametil-	11,8	9,54	3,11	11,8	9,54	3,11	<0.0001
Cafeína	10,7	2,33	1,23	10,7	2,33	1,23	<0.0001
Ciclopentano, metil-	2,89	1,31	2,31	2,89	1,31	2,31	<0.0001
2-Piperidinona	5,55	1,23	1,45	5,55	1,23	1,45	<0.0002
Cicloheptasiloxano, tetradecametil-	18,45	23,1	1,67	18,45	23,1	1,67	<0.0007

As figuras 5.10 a 5.13 mostram as concentrações médias relativas de cada metabólito quando comparados os grupos I x II e II x IV.

Figura 5.10 - Média da quantificação relativa da concentração dos metabólitos salivares mais significativos entre os grupos I x II

Figura 5.11 - Média da quantificação relativa da concentração dos metabólitos salivares mais significativos entre os grupos II x IV

Figura 5.12 - Média da quantificação relativa da concentração dos metabólitos da urina mais significativos entre os grupos I x II

Figura 5.13 - Média da quantificação relativa da concentração de metabólitos da urina mais significativos entre os grupos II x IV

6 DISCUSSÃO

A análise metabolômica não direcionada foi aplicada no presente estudo para a determinação de metabólitos que demonstrem possíveis associações entre a DRC e a DP. Dentre os diversos paradigmas atuais propostos para o diagnóstico de doenças crônicas, a metabolômica apresenta-se como uma técnica de grande valia, já que permite estimar a variabilidade de metabólitos entre os estágios da DRC e a oportunidade de avaliar as relações causais entre esses metabólitos e o desenvolvimento de ambas as doenças, corroborando com a relação bidirecional entre elas.

Diversas são as técnicas utilizadas para análise metabolômica (Zhao, 2013). No entanto, para o presente estudo utilizamos a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), que apresenta-se como uma técnica de caráter robusto e confere excelente reprodutibilidade dos dados avaliados, além de permitir a identificação dos metabólitos por meio de um banco de dados (biblioteca) de compostos.

O trabalho descrito utilizou o estudo metabolômico para o “screening” de compostos candidatos a possíveis biomarcadores da doença renal crônica associada à doença periodontal. A partir da identificação desses metabólitos, foi possível avaliar a variação nas concentrações dos mesmos, e por meio da análise de biologia dos sistemas, identificar como essas vias metabólicas podem ter sido alteradas por ambas as doenças.

Avaliamos amostras de urina e saliva, a fim de encontrarmos biomarcadores que pudessem mostrar uma possível associação entre a DRC e a DP. No entanto, o fato de trabalharmos com amostras biológicas que apresentam uma variabilidade grande, seja em função dos distúrbios que ocorrem nos processos metabólicos de pacientes sistemicamente comprometidos ou até mesmo em função das medicações em uso pelos mesmos, favorecem o aparecimento de alguns resultados anômalos e que foram observados nas análises de PCA.

Barnes et al. (2009), relataram que a quantificação de metabólitos salivares é importante por traçar um perfil fenotípico de determinados indivíduos quanto à

propensão em apresentar ou não certas patologias. Assim, de acordo com Toyohara et al. (2010) a detecção precoce de distúrbios na função renal permite elaborar um plano de tratamento a fim de diminuir as complicações inerentes ao agravamento da doença.

Até o presente momento, este é o primeiro trabalho que avalia de forma integrada a relação entre metabólitos presentes em saliva e urina de pacientes com DRC e sua condição periodontal. Desta forma, a partir dos dados obtidos foi possível estabelecer um perfil metabólico distinto, capaz de avaliar os processos metabólicos globais, tanto para a saliva quanto para a urina em pacientes com DRC, independente do estágio da doença.

Avaliando-se os dados demográficos deste estudo, podemos verificar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0.041$) entre as idades de pacientes com e sem DP, sendo que pacientes adultos jovens apresentaram maior propensão a ter DP quando comparados aos adolescentes. Porém, quanto ao gênero, não foi observada diferença significativa ($p=0.62$). Muito embora a DP não seja comum nesta faixa etária, já que o processo de perda óssea acontece ao longo da vida, independentemente da idade, quando ocorre a presença de microrganismos gram-negativos há estímulo da produção de substâncias tóxicas como os lipopolissacarídeos que induzem a produção de citocinas pelas células do hospedeiro. Desta maneira, bactérias e mediadores inflamatórios entram na corrente sanguínea podendo levar a uma disfunção endotelial (Chen et al., 2008; Ebersole et al., 2010; Almeida et al., 2016).

Também foi possível avaliar que os valores encontrados para as variáveis índice de placa ($p=0.002$), índice de cálculo ($p=0.001$) e profundidade de sondagem ($p=0.002$) mostraram significância estatística avaliando-se os grupos quanto à presença ou ausência de DP, sendo maiores nos grupos com DP.

A partir do teste de permutação (DRC x DP) em comparações múltiplas, foi possível avaliarmos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos I x II ($p=0.004$), I x IV ($p < 0.001$) e III x IV ($p < 0.002$). Ou seja, independente da presença de DRC os grupos III e IV mostraram diferenças estatísticas significantes entre si quanto à DP.

Avaliando-se os dados descritivos da tabela 5.3, podemos observar que índices de placa 2 e 3 apresentaram diferenças estatísticas significantes quando comparados os estágios da DRC, ou seja, indivíduos em estágios 3 e 5 da doença renal apresentaram um maior índice de placa comparados aos demais. Quanto à presença de cálculo, indivíduos em estágios 3,4 e 5 da doença renal apresentaram uma maior quantidade ($p=0.01$) quando comparados aos demais.

A profundidade de sondagem, também demonstrou resultados significativos, ou seja, indivíduos em estágios mais avançados da doença renal apresentaram maior profundidade de sondagem ($p=0.02$).

Estas diferenças mostram que nos casos de pacientes com DRC a complexidade do cuidado sistêmico pode provocar negligência com o cuidado bucal. Vale ressaltar, que a higiene bucal deficiente está associada a doenças cardiovasculares e desfechos adversos nestes indivíduos (Garrido et al., 2015). Quanto às maiores profundidades de sondagem, além do maior acúmulo de placa e da maior presença de cálculo, quando presentes concomitantemente, estas alterações podem favorecer o processo de reabsorção óssea e osteíte fibrosa. As alterações no metabolismo ósseo de indivíduos com DRC ocorrem principalmente devido ao hiperparatireoidismo secundário, consequência da maior concentração sérica de fósforo, em função da redução de seu *clearance* renal e menor quantidade de cálcio e calcitriol séricos, este último, devido à redução do processo de hidroxilação renal da 25-hidroxivitamina D3 (Hamid et al., 2006).

A análise metabolômica salivar do presente estudo mostrou um total de 2850 metabólitos. Sendo que 83 metabólitos específicos foram encontrados apenas nos indivíduos do G I, enquanto que indivíduos do G III apresentaram aproximadamente 7 vezes mais metabólitos específicos.

Desenvolvemos dois modelos de PCA para analisar o metaboloma salivar. No primeiro modelo (Figura 5.3), observamos que os grupos III e IV apesar de estarem no mesmo plano, apresentam pontos muito concentrados, não favorecendo a identificação dos metabólitos encontrados. Além disso, quando elaboramos o gráfico de correlação dos metabólitos (Figura 5.4), no terceiro quadrante houve sobreposição das setas com diversos comprimentos, o que mostra forte correlação entre esses metabólitos, porém, não sendo capazes de serem identificados graficamente.

No entanto, elaboramos um segundo modelo (Figura 5.5), com filtro de 80%, no qual verificamos uma melhor separação entre os grupos I e II, e que o grupo II apresenta uma maior concentração de metabólitos. Isso demonstra que o fato de indivíduos do grupo II apresentarem tanto a DRC como a DP, estão mais propensos a distúrbios do metabolismo, seja em função da doença renal, da doença periodontal e /ou da presença de metabólitos exógenos no organismo.

O estresse oxidativo, situação presente tanto na DRC quanto na DP, representa um processo de desequilíbrio entre as manifestações sistêmicas das espécies reativas de oxigênio e a habilidade dos sistemas em eliminar os intermediários reativos ou reparar danos causados pelos mesmos. Vários metabólitos podem ser produzidos durante os processos de oxidação, dentre eles, hidrocarbonetos que são marcadores de peroxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados encontrados nas membranas celulares (Buljubasic; Buchbauer, 2015) (Apêndices A e B).

Tanto nas amostras de saliva quanto nas de urina, encontramos concentrações expressivas de hidrocarbonetos (butano, ciclopropano, ciclopentano e ciclohexano) nos quatro grupos, porém, para o grupo com DP e DRC (GII) essas concentrações apresentaram-se maiores, corroborando com os achados de que estes hidrocarbonetos sofrem alterações quando há desequilíbrio de processos oxidativos.

Prakash e Puneet (2010) relataram que hidrocarbonetos podem inibir o processo de formação óssea, principalmente na presença de cofatores bacterianos, levando à perda óssea periodontal. Além disso, a presença desses metabólitos implica no aparecimento de algumas patologias, mais especificamente, calcificações vasculares. A presença da xantina oxidase, comum tanto na DRC como na DP, favorece a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), e muito embora o metabolismo das ROS ainda não está muito bem esclarecido para a DP, a superprodução destes metabólitos pode diminuir as propriedades celulares antioxidantes, favorecer a destruição tecidual e aumentar a severidade da DP (Barnes et al., 2009).

Alves et al. (2016) relataram a presença de vários microrganismos em pacientes com DRC e DP, o que corrobora com a relação existente entre a presença de hidrocarbonetos, bactérias em saliva e a DP nestes indivíduos. O fato de não termos indivíduos submetidos a tratamento ortodôntico em nossa amostra, evitou que

metabólitos excretados em saliva, como hidrocarbonetos, fossem provenientes do metabolismo de microrganismos colonizados na superfície de bráquetes ortodônticos, pois de acordo com Bergamo et al., 2016, as quantidades de espécies microbianas assim como fatores relacionados ao seu metabolismo e ao hospedeiro apresentam impacto relevante na manutenção da saúde bucal e no desenvolvimento da DP.

O fato de pacientes com DRC apresentarem risco relativo de mortalidade cardiovascular aumentado (Kaysen, 2009), torna o estudo do metabolismo de lipídios relevante, principalmente quando verificamos que os mecanismos da relação entre DRC e DP ocorrem em função da alta carga inflamatória sistêmica e baixa imunidade, além dos fatores comuns entre elas (Almeida et al., 2011).

Raju et al. (2013) em um estudo avaliando o perfil lipídico e de peroxidação lipídica em pacientes com DRC mostrou que houve aumento nos níveis séricos de dialdeído malônico (MDA) tanto em pacientes fazendo diálise como em pacientes que não faziam. Estes resultados refletem aumento no estresse oxidativo, e além disso, os quadros de anemia, fator comum entre esses indivíduos, quando tratados com altas quantidades de ferro podem também induzir ao estresse oxidativo.

Ainda no mesmo estudo, os autores mostraram que a quantidade da enzima superóxido dismutase (SOD) estava diminuída nesses indivíduos. A SOD é uma metaloenzima, que é linha frontal de defesa contra os ânions superóxidos, convertendo-os em peróxido de hidrogênio. O aumento nos níveis de MDA e o declínio nos níveis de SOD, contribuem com a alta morbidade e mortalidade de pacientes com DRC em função das complicações cardiovasculares às quais estão propensos. Ou seja, a intensa produção de espécies reativas de oxigênio é o maior dano nesses pacientes, já que apresentam um sistema antioxidante debilitado devido a uma dieta com baixas concentrações de vitaminas antioxidantes.

No presente estudo, avaliando-se as tabelas 5.9 e 5.10, verificamos que quando comparados os grupos I e II, ou seja, indivíduos com DRC, mas sem e com DP, respectivamente, verificamos que as quantidades relativas de MDA estão alteradas nestes grupos, sendo maior para o G II, onde temos a presença de dois processos patológicos simultaneamente e que estão relacionados com o estresse oxidativo. Quando comparados os grupos II e IV, houve também diferença estatística, porém, há uma menor concentração média de MDA para o G IV. Podemos assim

inferir que, em função da presença de apenas um dos quadros patológicos, DP, este metabólito se apresentou em menor concentração.

Além disso, podemos observar que entre os grupos II e IV, a concentração média de MDA foi maior para o grupo com DRC, porém sem DP. Este fato sugere então que, os processos oxidativos na DRC são mais acentuados quando comparados à DP.

Zhao et al. (2015) mostraram que a concentração de ácidos graxos em tecidos renais de ratos induzidos à DRC pode estar significativamente alterada e relataram que isto ocorre, principalmente, devido a distúrbios no processo de oxidação dos ácidos graxos em células epiteliais tubulares renais em modelos animais e também em humanos com fibrose intersticial. A alteração no processo de oxidação de ácidos graxos limita a produção de ATP mitocondrial e aumenta a produção de ROS, evento que contribui para a morte celular epitelial, estresse oxidativo, inflamação (Kaysen, 2009) e lesões de natureza hemodinâmica como a fibrose intersticial.

As lesões de natureza hemodinâmica são os principais mecanismos patogênicos nas doenças renais crônicas. Estas lesões não ocorrem apenas por meio de processos mecânicos mas também por ativação contínua de uma série de mediadores inflamatórios. Primeiramente ocorre lesão à célula endotelial, acompanhada por lesão da células mesangial e podocitária, ativação de vias inflamatórias e aumento na expressão de citocina e de fatores de crescimento favorecendo a cronicidade do processo inflamatório.

Corroborando esta informação, verificamos que a quantidade de ácidos carboxílicos encontrados nos indivíduos com DRC e DP, mostrou-se alterada também quando comparada aos demais grupos, tanto em saliva quanto em urina.

Os eicosanoides são mensageiros químicos que agem no sistema imune, além disso estas moléculas apresentam forte relação com os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) e inflamação (Calder, 2008). Çiçek et al. (2005), relataram que os níveis de eicosanoides encontram-se alterados em sítios inflamados do periodonto. Esses mediadores atuam como hormônios autócrinos / parácrinos, mediando uma variedade de funções como as respostas imunológicas, pressão sanguínea e coagulação. Este grupo de mensageiros químicos inclui as prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos,

lipoxinas entre outras substâncias. O ácido graxo precursor da síntese de eicosanoides é liberado pelos fosfolipídios da membrana celular, geralmente pela ação da fosfolipase A₂ ativada em resposta a um estímulo celular. Como a membrana celular da maioria das células imunológicas apresenta grandes quantidades de ácido araquidônico (AA) comparadas a outros ácidos, o AA acaba sendo o principal precursor da síntese de eicosanoides (Calder, 2001; Calder, 2008).

Em nosso estudo, verificamos alteração na excreção de eicosanoides, principalmente nos grupos com DRC e DP, mostrando que estes indivíduos realmente apresentam um maior quadro inflamatório. Quando comparados os grupos com DRC, porém sem e com DP (GI e GII), observamos que a diferença estatística é maior ($p < 0.0002$) se comparada aos grupos com e sem DRC, porém com DP (GII e GIV) ($p < 0.0004$). Podemos assim dizer que para a população em estudo, a DRC produziu uma maior quantidade de eicosanoides quando comparada à DP, porém, como houve diferença estatística para ambas as comparações, podemos inferir que um processo potencializou o outro. No entanto, Huang et al., 2012 relatou que, apesar da presença de AA nos processos inflamatórios avaliados, houve associação inversa entre a presença de AA e os níveis de IL-6, e todas as demais causas de mortalidade em uma população Sueca em diálise.

A presença de ácidos carboxílicos como ácido octadecanóico ($p < 0.0001$), ácido hexadecanóico ($p < 0.0001$) e ácido hexadecanóico ($p < 0.0007$), esterificados e encontrados em concentrações significativamente alteradas nos grupos estudados, tanto em urina quanto em saliva, vai de encontro aos achados de Çiçek et al., 2005, que relataram níveis elevados de ácidos graxos poli e monoinsaturados em tecidos gengivais inflamados.

Ainda sobre o metabolismo de lipídios, Aldámiz-Echevarria et al., 2007, relataram que a albumina constitui a maior parte das proteínas filtradas na urina de pacientes nefróticos e transporta diferentes substâncias hidrofóbicas, incluindo os ácidos graxos. Nesses indivíduos, a concentração de ácido graxo por molécula de albumina é acentuadamente aumentada em termos de fração molar. Estas moléculas, que estão presentes no túbulo proximal, e que são reabsorvidas pelo processo de endocitose mediado pela megalina, religam-se a uma proteína citoplasmática e são transportadas para a mitocôndria ou peroxissomos, onde serão metabolizadas por β -

oxidação. Quando há elevada proteinúria de origem glomerular, os complexos ácido graxo-albumina ficam mais concentrados no túbulo proximal e podem levar a alterações inflamatórias destruindo as células do túbulo intersticial.

A concentração média dos ácidos butírico, valérico e propanóico em saliva de pacientes com DP e DRC mostraram-se alteradas quando comparadas ao grupo controle sem DP. Estes metabólitos podem ser produtos finais do metabolismo de microrganismos (Siqueira; Rôças, 2007) presentes em pacientes com DP. De acordo com Alves et al. (2016), pacientes com DRC e DP podem apresentar alta prevalência de *Actinomyces dentalis*, *Acinetobacter ursingi*, *Aggregatibacter actinomycetencomitans*, *Corynebacterium argentocens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius* e *Tannerella forsythensis*. Podemos assim dizer que, estes resultados sugerem existir relação entre a DP e a concentração desses ácidos.

De acordo com Siqueira e Rôças (2007), estes metabólitos apresentam efeitos citotóxicos em células vero, e o ácido butírico pode inibir a proliferação de células T, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Corroborando com os achados do presente estudo, Nichols e Rojanasomsith (2006) relatou que o acúmulo de ácidos graxos resultantes do metabolismo de microrganismos em amostras de cálculo sub e supragengival podem induzir a produção de mediadores inflamatórios como a prostaglandina. Ainda de acordo com este estudo, cerca de 50% das crianças na faixa etária de 10-14 anos apresentam concentrações variadas de ácidos graxos, e 8% apresentam placas fibrosas, mostrando que a aterosclerose tem seu início na infância.

O padrão das dislipidemias em crianças com DRC é muito influenciado pela patologia de base, duração da doença, severidade da proteinúria e tratamento realizado.

Encontramos na análise metabolômica do presente estudo alguns aminoácidos com concentrações alteradas e estatisticamente significativas, comparando-se os achados em pacientes dos grupos estudo e dos grupos controle. Dentre eles podemos citar alanina ($p<0.0001$), glicina ($p<0.0001$), tirosina ($p=0.021$), serina ($p<0.0001$), prolina ($p<0.0002$), leucina ($p<0.0003$), citrulina ($p<0.0001$) e arginina ($p<0.0002$).

A citrulina é produzida principalmente no fígado por meio do ciclo da uréia e posteriormente é catabolizada em arginina nas células renais. Assim, a alteração na

quantidade de citrulina excretada pode estar relacionada à diminuição na quantidade da argininosuccinato sintetase, enzima responsável pela conversão desse metabólito em arginina, ou até mesmo às menores concentrações de seu precursor o qual pode ser obtido pela dieta. Uma maior excreção de citrulina demonstra uma redução da função renal (Duranton et al., 2014).

A arginina é um aminoácido relacionado a vários processos metabólicos. Dentre eles podemos citar a via do óxido nítrico (NO) e sua síntese pode estar relacionada com a melhora de vários aspectos da função renal, já que influencia processos de imunomodulação, vasodilatação, entre outros mecanismos. A arginina também está relacionada com a produção de creatinina, poliaminas, uréia, aldeídos, prolina e glutamato. No presente estudo ela apresentou-se em quantidades menores para os grupos que apresentaram excreção de creatinina e prolina alterada, comprovando a relação existente entre esses metabólitos.

A prolina que também se apresentou maior em pacientes com DRC está associada com a degradação de colágeno e apresenta-se como inibidor de metaloproteinase. Alguns microrganismos são mais proteolíticos que outros e são capazes de produzirem este aminoácido. De acordo com Franco et al. (2009) e Barnes et al. (2009), é o desequilíbrio entre a forma ativa das metaloproteinases da matriz e seus inibidores endógenos que promove o colapso patológico da matriz extracelular na DP.

Um estudo avaliando disfunção mitocondrial em pacientes com nefropatia diabética mostrou que a alteração nas concentrações de diversos metabólitos como aminoácidos e ácidos carboxílicos refletem interrompimento de alguns processos na síntese lipídica e do ciclo de Krebs em locais celulares diferentes (Sharma et al., 2013).

Um dos metabólitos que mostrou concentração estatisticamente significativa maior na urina de indivíduos com DRC e com DP foi o p-Cresol, produto final do catabolismo de proteínas ou de bactérias intestinais, como resultado do metabolismo da tirosina e da fenilalanina. Toxinas urêmicas ligadas a proteínas, como o p-Cresol e o sulfato de indoxil, estão associadas à progressão da falência renal na DRC (Huang et al., 2012). Tanto a capacidade do p-Cresol quanto do sulfato de indoxil em aumentar a liberação de micropartículas endoteliais, as quais podem estar associadas com o

aumento dos níveis de marcadores de ativação endotelial e comprometimento da função vascular em pacientes urêmicos sugerem que toxinas urêmicas específicas podem aumentar as micropartículas endoteliais desencadeando alterações cardiovasculares (Winchester et al., 2009).

Schepers et al. (2007) mostraram que tanto o p-Cresol quanto o sulfato de indoxil pode levar a oxidação de células endoteliais e comprometer ainda mais a função renal. Porém, de acordo com Huang et al. (2012), ainda não está bem esclarecido se o p-Cresol está ou não relacionado com os quadros de caquexia, assim como ocorre quando há uma maior concentração de citocinas, como a leptina, em pacientes urêmicos. No caso da DP, de acordo com Gandaghar et al. (2011) e Jain e Mulay (2014), quanto maior o comprometimento gengival, maior a diminuição das concentrações de leptina em tecidos gengivais e aumento de suas concentrações em plasma sanguíneo, indicando uma possível correlação entre a concentração de leptina em tecidos gengivais e o risco de doenças sistêmicas como as doenças cardiovasculares. Estes resultados corroboram os nossos achados quanto à concentração de p-Cresol, pois esta mostrou-se aumentada ($p < 0.0008$) em indivíduos com DRC e DP, seguida pelos indivíduos sem DRC mas com DP ($p < 0.003$) e por fim os indivíduos com DRC sem DP ($p < 0.002$). Consequentemente, a concentração de citocinas estará aumentada e a de leptina diminuída nos tecidos gengivais, levando ao maior risco de comorbidades nesses indivíduos. Além disso, podemos inferir que quando as duas patologias estão presentes, o nível de p-Cresol está alterado, porém comparando-se a presença de apenas uma das patologias, a diferença estatística entre os grupos é menor.

Alguns compostos podem inibir processos de oxidação em certos sistemas, porém isso não significa que serão fatores de proteção às células e tecidos para os tipos de danos oxidativos. Dentre estes compostos podemos citar a acetofenona, (Rebello, 2005, Mohsin Ali et al., 2012) metabólito que apresentou concentração estatisticamente significante maior em indivíduos com DRC porém sem DP, corroborando as características antiinflamatórias e antibacterianas do mesmo. Um dado importante foi que este maior valor foi encontrado após avaliarmos a via metabólica da sinvastatina, medicação em uso por alguns pacientes do G I quando comparados aos pacientes do G II. Sendo assim, podemos sugerir que este metabólito é um fator de proteção para a DP.

Um estudo envolvendo ratos, avaliou as propriedades antiinflamatórias e analgésicas da semicarbazona de benzofenona (SCB) e acetofenona (SCA), quando processos inflamatórios induzidos pela carragenina, um polissacarídeo sulfatado presente em várias espécies de algas vermelhas (Costa, 2004) foi utilizado. Os autores mostraram que o uso da SCA em dosagens de 25 mg e 50 mg/kg, levaram à redução do edema em pata de ratos em 34,65% e 41,58%, respectivamente, ao final de 4 horas. O processo inflamatório induzido pela carragenina é considerado um evento bifásico envolvendo diferentes mediadores inflamatórios. Na primeira fase (durante as primeiras 2h após injetar-se a carragenina), mediadores químicos como a histamina e a serotonina apresentaram importante papéis, enquanto que na segunda fase (3-4h após injetar-se a carragenina) ocorreu a liberação de prostaglandinas e quinonas. No entanto, o uso da SCA mostrou resultados na inibição do edema desde a primeira hora durante todas as fases da inflamação, ou seja, houve inibição de diferentes aspectos e mediadores químicos inflamatórios (Mohsin Ali et al., 2012).

Inúmeras citocinas são liberadas por células do epitélio sulcular e juncional, células dendríticas, fibroblastos, macrófagos e neutrófilos. Além disso, várias enzimas como as metaloproteinases da matriz são produzidas por neutrófilos, fibroblastos e osteoclastos, levando à degradação de tecido conjuntivo e de osso alveolar. Estes fatores levam a um processo inflamatório, o qual pode ser potencializado não somente por metabólitos produzidos localmente como sistemicamente, em função da patologia apresentada pelo indivíduo. Vale ressaltar, que a susceptibilidade do hospedeiro é um determinante crítico na patogênese da doença periodontal, fazendo com que os mediadores inflamatórios sejam de grande valia na avaliação de risco da atividade da doença.

O número de estudos envolvendo as dimetilargininas, derivados metilados da L-arginina (Hyla-Klekot et al., 2015), e sua relação com a DRC, doença cardiovascular e DP, vem aumentando nos últimos anos, e alguns trabalhos (Schwedhelm; Böger, 2011; Wilcox, 2012) relatam que esses metabólitos podem inibir a óxido nítrico sintase, limitando assim, a produção de NO e consequentemente levar a complicações cardiovasculares. Tanto a dimetilarginina simétrica (SDMA) quanto a assimétrica (ASDMA) são produzidas como modificações translacionais de resíduos da arginina em proteínas específicas (Shah et al., 2013). No entanto, a ADMA vem ganhando destaque como um marcador importante da disfunção endotelial e da

aterosclerose, já que maiores concentrações de SDMA são liberadas no plasma para “*clearance*” renal (Shah et al., 2013).

Em nosso estudo, muito embora a dimetilarginina não tenha sido encontrada em grupos controle, indivíduos dos grupos estudo apresentaram concentrações maiores desse metabólito, sugerindo assim que a dimetilarginina está relacionada com a DRC, e por estar presente em indivíduos com e sem DP, mesmo em estágios iniciais da DP, ela pode ser um fator acelerador do comprometimento vascular generalizado. Tsioufis et al. (2010) avaliaram se os índices de DP estavam ou não associados à disfunção endotelial por meio da ADMA, e mostraram que houve um impacto significativo da DP na disfunção endotelial quando da presença desta substância. Além disso, verificaram que os índices de DP estavam associados de forma “dose-dependente” com os níveis de ADMA em condições onde ocorreram tanto aumento quanto diminuição de inflamação sistêmica em indivíduos com hipertensão.

Além dos metabólitos produzidos endogenamente, verificamos também a presença de metabólitos exógenos, estes podem estar relacionados à dieta dos indivíduos, algumas medicações em uso pelos mesmos ou até mesmo a produtos industrializados. Dentre eles podemos citar metabólitos à base de siloxanos que são encontrados em dentifrícios (Leatherman et al., 2013) e que não mostraram significância estatística em nenhum dos grupos avaliados.

7 CONCLUSÕES

- O presente estudo identificou metabólitos comuns tanto para a DRC como para a DP e demonstrou principalmente que aminoácidos, ácidos graxos e subprodutos de seu metabolismo podem ser expressos diferencialmente em função da patologia presente.
- Ambas as patologias estimulam processos oxidativos que sintetizam metabólitos como responsáveis por potencializarem as complicações da DRC. Estes metabólitos tais como ácido butírico e L-prolina, foram encontrados nos indivíduos com DP.
- A identificação de metabólitos do grupo dos hidrocarbonetos e aminoácidos como prolina e arginina, sugere que estes metabólitos podem ser provenientes do metabolismo de microrganismos encontrados na microbiota bucal.
- A partir deste estudo foi possível distinguir o perfil metabólico de pacientes com DP, com DP e DRC e apenas com DRC de indivíduos clinicamente saudáveis. No entanto, apesar do perfil metabólico ser diferente, alguns deles como uréia, creatinina, ácido octadecanóico, ciclohexano, são compartilhados por todos os grupos.
- Identificamos metabólitos como acetofenona, possivelmente proveniente da metabolização das estatinas, e aminoácidos como prolina e glicina que apresentam características antagonistas quando à presença da DP.
- Apesar das análises de PCA serem úteis na discriminação do perfil metabólico de cada grupo analisado, com base nos perfis cromatográficos das amostras, provavelmente tais inferências necessita de mais informações, para que possamos identificar biomarcadores específicos relacionados à DRC e DP.

REFERÊNCIAS¹

Aldámiz-Echevarría L, Vallo A, Aguirre M, Sanjurjo P, Gonzalez-Lamuño D, Elorz J, et al. Essential fatty acid deficiency profile in patients with nephrotic-range proteinuria. *Pediatr Nephrol*. 2007 Apr;22(4):533-40.

Almeida DC, Pereira CS, Granjeiro JM, Machado WAS, Tostes FRV, Barboza ESP. A relação bidirecional entre doença periodontal e doença renal crônica: da progressão da doença renal crônica à terapia renal substitutiva de diálise. *Rev Periodontia*. 2011 mar.;21(1):73-9.

Almeida S, Figueredo CM, Lemos C, Bregman R, Fischer RG. Periodontal treatment in patients with chronic kidney disease: a pilot study. *J Periodontal Res*. 2016 May 2. doi: 10.1111/jre.12390. [Epub ahead of print].

Alves LAC, Souza RC, Silva TMC, Watanabe A, Dias M, Mendes MA, et al. Identification of microorganisms in biofluids of individuals with periodontitis and chronic kidney disease using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2016 May;30(10):1228-32.

Ardalan MR, Ghabili K, Pourabbas R, Shoja MM. A causative link between periodontal disease and glomerulonephritis: a preliminary study. *Ther Clin Risk Manag*. 2011;7:93-8. doi: 10.2147/TCRM.S14106. Epub 2011 Mar 8.

Bader G, Lejeune S, Messner M. Reduction of cyclosporine-induced gingival overgrowth following a change to tacrolimus. A case history involving a liver transplant patient. *J Periodontol*. 1998 Jun;69(6):729-32.

Barnes VM, Ciancio SG, Shibly O, Xu T, Devizio W, Trivedi HM, et al. Metabolomics reveals elevated macromolecular degradation in periodontal disease. *J Dent Res*. 2011 Nov;90(11):1293-7.

Barnes VM, Teles R, Trivedi HM, Devizio W, Xu T, Mitchell MW, et al. Acceleration of purine degradation by periodontal diseases. *J Dent Res*. 2009 Sep;88(9):851-5.

Barros E, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LF. *Nefrologia – rotinas, diagnóstico e tratamento*. 3a ed. São Paulo: Artmed; 2006.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Bartold PM. Regulation of human gingival fibroblast growth an synthetic activity by cyclosporine-A invitro. *J. Periodont. Res.* 1989 Sep;24(5):314-21.

Belangero VMS. Avaliação renal na infância. In: Andrade MC, Carvalhaes JTA. *Nefrologia para pediatras*. São Paulo: Atheneu; 2010. Capítulo 1.

Bergamo AZ, Nelson-Filho P, Andrucio MC, do Nascimento C, Pedrazzi V, Matsumoto MA. Microbial complexes levels in conventional and self-ligating brackets. *Clin Oral Investig. Clin Oral Investig.* 2016 Jun 6. [Epub ahead of print].

Bertram HC, Eggers N, Eller N. Potential of Human Saliva for Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomics and for Health-Related Biomarker Identification. *Anal Chem.* 2009 Nov;81(21): 9188-93. doi: 10.1021/ac9020598.

Boshnakov GN. Using R for data management, statistical analysis, and graphics. *J Appl Statistics.* 2012;39(6):1382-3.

Bots CP, Poorterman JH, Brand HS, Kalsbeek H, van Amerongen BM, Veerman EC, et al. The oral health status of dentate patients with chronic renal failure undergoing dialysis therapy. *Oral Dis.* 2006 Mar;12(2):176-80.

Bover J, Ureña P, Ruiz-García C, da Silva I, Lescano P, del Carpio J, et al. Clinical and practical use of calcimimetics in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016 Jan 7;11(1):161-74.

Buljubasic F, Buchbauer G,. The scent of human diseases: a review on specific volatile organic compounds as diagnostic biomarkers. *Flavour Fragr. J.* 2015 Jan;30(1):5-25.

Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *J Pharm Biomed Anal.* 2015 Sep 10;113:108-20. doi: 10.1016/j.jpba.2014.12.017. Epub 2014 Dec 25.

Calder PC. Omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *World Rev Nutr Diet.* 2001;88:109-16.

Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res.* 2008 Aug;52(8):885-97.

Chambrone L, Foz AM, Guglielmetti MR, Pannuti CM, Artese HP, Feres M, et al. Periodontitis and chronic kidney disease: a systematic review of the association of diseases and the effect of periodontal treatment on estimated glomerular filtration rate. *J Clin Periodontol*. 2013 May;40(5):443-56.

Chen YW, Umeda M, Nagasawa T, Takeuchi Y, Huang Y, Inoue Y, et al. Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2008 Feb;35(2):153-8.

Çiçek Y, Özmen I, Canakçı V, Dilsiz A, Sahin F. Content and composition of fatty acids in normal and inflamed gingival tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Mar;72(3):147-51.

Costa KA. Alodínia mecânica e edema de pata induzidos por um ativador da proteína quinase C, PDD: caracterização e comparação com as respostas induzidas pela carragenina [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.

Cozzolino M, Rizzo MA, Stucchi A, Cusi D, Gallieni M. Sevelamer for hyperphosphataemia in kidney failure: controversy and perspective. *Ther Adv Chronic Dis*. 2012 Mar;3(2):59-68.

Craig RG. Interactions between chronic renal disease and periodontal disease. *Oral Dis*. 2008 Jan;14(1):1-7. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01430.x.

D'Agostino RB, Belanger A, D'Agostino RB, Jr. A suggestion for using powerful and informative tests of normality. *Am Statistician*. 1990 Nov;44(4):316-21.

Davidovich E, Schwarz Z, Davidovitch M, Eidelman E, Bimstein E. Oral findings and periodontal status in children, adolescents and young adults suffering from renal failure. *J Clin Periodontol*. 2005 Oct;32(10):1076-82.

Dhull RS, Baracco R, Jain A, Mattoo TK. Pharmacologic Treatment of Pediatric Hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2016 Apr;18(4):32. doi: 10.1007/s11906-016-0639-4.

Dirschnabel AJ, Martins AS, Dantas SAG, Ribas MO, Grégio AMT, Alanis LRA, et al. Clinical oral findings in dialysis and kidney-transplant patients. *Quintessence Int.* 2011 Feb;42(2):127-33.

Dunn WB, Bailey NJC, Johnson HE. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst.* 2005 May;130(5):606-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/B418288J>.

Duranton F, Lundin U, Gayraud N, Mischak H, Aparicio M, Mourad G, et al. Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014 Jan;9(1):37-45.

Ebersole JL, Stevens J, Steffen MJ, Dawson Iii D, Novak MJ. Systemic endotoxin levels in chronic indolent periodontal infections. *J Periodontal Res.* 2010 Feb;45(1):1-7.

El Nahas AM, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet.* 2005 Jan;365(9456):331-40.

Ellis A. Natural history of Bright's Disease. *Lancet.* 1942 Jan;239(6177):72-6 [citado 28 jun. 2016]. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067360070290X>.

Evenepoel P, Selgas R, Caputo F, Foggensteiner L, Heaf JG, Ortiz A, et al. Efficacy and safety of sevelamer hydrochloride and calcium acetate in patients on peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Jan;24(1):278-85.

Fidalgo TKS. Análise do metaboloma salivar de crianças por meio da ressonância magnética nuclear [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia; 2010.

Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol.* 2002 Jan;48(1-2):155-71.

Fisher MA, Taylor GW, West BT, McCarthy ET. Bidirectional relationship between chronic kidney and periodontal disease: a study using structural equation modeling. *Kidney Int.* 2011 Feb;79(3):347-55.

Fitzpatrick JJ, Wilson MH, McArdle NS, Stassen LF. Renal disease and chronic renal failure in dental practice. *J Ir Dent Assoc.* 2008 Oct-Nov;54(5):215-7.

Franco CF, Souza ACD, Costa JE, Lima PMA. Papel da mmp-8 na doença periodontal. *Rev Periodontia*. 2009 dez.;19(4):51-60.

Gangadhar V, Ramesh A, Thomas B. Correlation between leptina and health of the gingiva: a predictor of medical risk. *Indian J Dental Res*. 2011 Jul-Aug;22(4):537-41. doi: 10.4103/0970-9290.90292.

Garrido D, Silva TMC da, Alves LAC, Ciamponi AL, Haddad AE. Metabolômica – ferramenta diagnóstica de doenças bucais associadas à doença renal crônica e comorbidades. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo*. 2015 jan./mar.;26(1 Supl):24-7 [citado 23 jan. 2016]. Disponível em: <http://www.socesp.org.br/upload/suplemento/2016/SUPLEMENTO-REVISTA-SOCESP-V26-N1.pdf>.

Gattineni J. Inherited disorders of calcium and phosphate metabolism. *Curr Opin Pediatr*. 2014 Apr;26(2):215-22.

Goh KI, Cusick ME, Valle D, Childs B, Vidal M, Barabási AL. The human disease network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 22;104(21):8685-90. Epub 2007 May 14.

Grubbs V, Plantinga LC, Crews DC, Bibbins-Domingo K, Saran R, Heung M, et al. Vulnerable populations and the association between periodontal and chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Apr;6(4):711-7. doi: 10.2215/CJN.08270910.

Haddad AS. *Odontologia para pacientes com necessidades especiais*. São Paulo: Ed. Santos; 2007.

Hamid MJAA, Dummer CD, Pinto LS. Systemic conditions, oral findings and dental management of chronic renal failure patients: general considerations and case report. *Braz Dent J*. 2006;17(2):166–70.

Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol*. 2012 Mar;27(3):363-73. doi: 10.1007/s00467-011-1939-1. Epub 2011 Jun 29.

Hogg RJ, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, et al. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. *Pediatrics*. 2003 Jun 1;111(6 Pt 1):1416-21.

Horton NJ, Kleinman K. Using R for Data Management, Statistical Analysis, and Graphics. Boca Raton, FL: CRC Press; 2010.

Horton NJ, Kleinman K. Using R and RStudio for data management, statistical analysis, and graphics. Boca Raton, FL: CRC Press; 2015.

Huang ST, Shu KH, Cheng CH, Wu MJ, Yu TM, Chuang YW, et al. Serum total p-cresol and indoxyl sulfate correlated with stage of chronic kidney disease in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2012 Apr;44(3):621-4.

Huang X, Stenvinkel P, Qureshi AR, Risérus U, Cederholm T, Bárány P, et al. Essential polyunsaturated fatty acids, inflammation and mortality in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Sep;27(9):3615-20.

Hyla-Klekot L, Bryniarski P, Pulcer B, Ziora K, Paradysz A. Dimethylarginines as risk markers of atherosclerosis and chronic kidney disease in children with nephrotic syndrome. *Adv Clin Exp Med.* 2015 Mar-Apr;24(2):307-14. doi: 10.17219/acem/40465.

Jain H, Mulay S. Relationship between periodontitis and systemic diseases: leptin, a new biomarker? *Indian J Dent Res.* 2014 Sep-Oct;25(5):657-61. doi: 10.4103/0970-9290.147118.

Jaramillo A, Lafaurie GI, Millán LV, Ardila CM, Duque A, Novoa C, et al. Association between periodontal disease and plasma levels of cholesterol and triglycerides. *Colomb Med (Cali).* 2013 Jun 30;44(2):80-6.

Jinchun Sun J, Beger RD, Schnackenberg LK. Metabolomics as a tool for personalizing medicine. 2012 update. *Personalized Med.* 2013 Mar;10(2):149-61.

Kaysen GA. Lipid and lipoprotein metabolism in chronic kidney disease. *J Ren Nutr.* 2009 Jan;19(1):73-7.

Katz J, Bimstein E. Pediatric obesity and periodontal disease: a systematic review of the literature. *Quintessence Int.* 2011 Jul-Aug;42(7):595-9.

Koch V. Terapia Medicamentosa. In: Andrade MC, Carvalhaes JTA. *Nefrologia para pediatras.* São Paulo: Atheneu; 2010. Capítulo 26.

Konstantyner T, Sesso R, De Camargo MF, De Santis Feltran L, Koch-Nogueira PC. Pediatric chronic dialysis in Brazil: epidemiology and regional inequalities. PLoS One. 2015 Aug 18;10(8):e0135649. doi: 10.1371/journal.pone.0135649. eCollection 2015.

Kshirsagar AV, Craig RG, Beck JD, Moss K, Offenbacher S, Kotanko P, et al. Severe periodontitis is associated with low serum albumin among patients on maintenance hemodialysis therapy. Clin J Am Soc Nephrol. 2007 Mar;2(2):239-44.

Landry RG, Jean M. Periodontal Screening and Recording (PSR) Index: precursors, utility and limitations in a clinical setting. Int Dent J. 2002 Feb;52(1):35-40.

Latini R, Maggioni AP, Peri G, Gonzini L, Lucci D, Mocarelli P, et al. Lipid Assessment Trial Italian Network (LATIN) Investigators. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. Circulation. 2004 Oct 19;110(16):2349-54.

Laurinavicius AG, Santos RD. Dislipidemia, estatinas e insuficiência renal crônica. Rev Bras Hipertens. 2008;15(3):156-61 [citado 23 jun. 2016]. Disponível em: <http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/15-3/10-dislipidemia.pdf>.

Leatherman MD, Policello GA, Rajaramaran SK. Cosmetic compositions comprising hydrolysis resistant organomodified disiloxane surfactants. United State patent US 8,491,876, 23 jul. 2013.

Lee JB, Yi HY, Bae KH. The association between periodontitis and dyslipidemia based on the Fourth Korea National Health and Nutrition Examination Survey. J Clin Periodontol. 2013 May;40(5):437-42.

Lindon JC, Nicholson JK. The emergent role of metabolic phenotyping in dynamic patient stratification. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2014 Jul;10(7):915-9. doi: 10.1517/17425255.2014.922954. Epub 2014 Jun 6.

Little JW, Falace DA, Miller CS, Rhodus NL. Manejo odontológico do paciente clinicamente comprometido. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. p. 175-86.

Locsey L, Alberth M, Mauks G. Dental management of chronic hemodialysis patients. Int Urol Nephrol. 1986;18(2):211-3.

Marchesan JT, Morelli T, Moss K, Barros SP, Ward M, Jenkins W, Aspiras MB, Offenbacher S. Association of Synergistetes and Cyclodipeptides with Periodontitis. *J Dent Res*. 2015 Oct;94(10):1425-31

Mastrangelo A, Armitage EG, García A, Barbas C. Metabolomics as a tool for drug discovery and personalised medicine. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(23):2627-36.

Meng L, Fu B. Practical use of sevelamer in chronic kidney disease patients on dialysis in People's Republic of China. *Ther Clin Risk Manag*. 2015 Apr 30;11:705-12. doi: 10.2147/TCRM.S64657. eCollection 2015.

Mohsin Ali SM, Jesmin M, Azad MAK, Islam MK, Zahan R. Anti-inflammatory and analgesic activities of acetophenone semicarbazone and benzophenone semicarbazone. *Asian Pacific J Trop Biomed*. 2012 Feb;2(2 Suppl.):S1036-39.

Musiak K, Zwolińska D. Heat shock proteins in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2011 Jul;26(7):1031-7. doi: 10.1007/s00467-010-1709-5. Epub 2010 Dec 31.

Mutsaers HA, Engelke UF, Wilmer MJ, Wetzels JF, Wevers RA, van den Heuvel LP, et al. Optimized metabolomic approach to identify uremic solutes in plasma of stage 3-4 chronic kidney disease patients. *PLoS One*. 2013 Aug 2;8(8):e71199. doi: 10.1371/journal.pone.0071199.

Nakhjavani YB, Bayramy A. The dental and oral status of children with chronic renal failure. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2007 Mar;25(1):7-9.

Navazesh M, Kumar SK, University of Southern California School of Dentistry. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc*. 2008 May;139 Suppl:35S-40S.

Nethravathy RR, Alamelu S, Arun KV, Kumar T. Evaluation of circulatory and salivary levels of heat shock protein 60 in periodontal health and disease. *Indian J Dent Res*. 2014 May-Jun;25(3):300-4. doi: 10.4103/0970-9290.138317.

Nichols FC, Rojanasomsith K. *Porphyromonas gingivalis* lipids and diseased dental tissues. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 Apr;21(2):84-92.

Oliveira C, Artese H, Silva A, Delgado A, Torres M. Manifestações bucais e doença renal crônica - revisão de literatura. *Periodontia*. 2008;18(1):14-9.

Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Mar 22;13(4):263-9.

Peres LAB, Bertol MFR. Doenças renais na infância. *Rev Med Res.* 2012;14(3):186-92.

Peres MA, Traebert J, Marcene W. Calibração de examinadores para estudos epidemiológicos de cárie dentária. *Cad Saúde Pública.* 2001 jan-fev;17(1):153-9.

Petersen AK, Zeilinger S, Kastenmüller G, Römisch-Margl W, Brugger M, Peters A, et al. Epigenetics meets metabolomics: an epigenome-wide association study with blood serum metabolic traits. *Hum Mol Genet.* 2014 Jan 15;23(2):534-45.

Pradeep AR, Kathariya R, Arjun Raju P, Sushma Rani R, Sharma A, Raghavendra NM. Risk factors for chronic kidney diseases may include periodontal diseases, as estimated by the correlations of plasma pentraxin-3 levels: a case-control study. *Int Urol Nephrol.* 2012 Jun;44(3):829-39.

Prakash N, Puneet N. Periodontal and cardiovascular diseases: an intriguing association. *Indian J Med Specialities* 2010;1(1):6-7.

Proctor R, Kumar N, Stein A, Moles D, Porter S. Oral and dental aspects of chronic renal failure. *J Dent Res.* 2005 Mar;84(3):199-208.

Raju DSSK, Lalitha DLL, Kiranmayi. A study of lipid profile and lipid peroxidation in chronic kidney disease with special reference to hemodialysis. *J Clin Res Bioeth.* 2013;4:143. doi: 10.4172/2155-9627.1000143.

Rebello JM. Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.

Romão Junior JE. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. *J Bras Nefrol.* 2004;26(3 Supl 1):1-3.

Saland JM, Pierce CB, Mitsnefes MM, Flynn JT, Goebel J, Kupferman JC, et al. Dyslipidemia in children with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2010 Dec;78(11):1154-63. doi: 10.1038/ki.2010.311. Epub 2010 Aug 25.

Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der Eycken J, Vanholder R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Feb;22(2):592-6.

Schnackenberg LK, Beger RD. Metabolomic biomarkers: their role in the critical path. *Drug Discov Today Technol*. 2007 Autumn;4(1):13-6. doi: 10.1016/j.ddtec.2007.10.012.

Schwedhelm E, Böger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011 May;7(5):275-85. doi: 10.1038/nrneph.2011.31. Epub 2011 Mar 29.

Seikaly MG. Highlights for the management of a child with hypertension. *Int J Pediatr*. 2012;2012:364716. doi: 10.1155/2012/364716. Epub 2012 Aug 13.

Shah A, Hada R, Kayastha BM. Dermatological disorders in chronic kidney disease with and without maintenance hemodialysis. *JNMA J Nepal Med Assoc*. 2013 Apr-Jun;52(190):365-71.

Shah VO, Townsend RR, Feldman HI, Pappan KL, Kensicki E, Vander Jagt DL. Plasma metabolomic profiles in different stages of CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013 Mar;8(3):363-70. doi: 10.2215/CJN.05540512. Epub 2012 Dec 6.

Sharma K, Karl B, Mathew AV, Gangoiti JA, Wassel CL, Saito R, et al. Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Nov;24(11):1901-12.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J*. 2007;18(4):267-80.

Soares CMB, Diniz JSS, Lima ME, Silva JMP, Oliveira GR, Canhestro MR, et al. Doença renal crônica em pediatria – Programa Interdisciplinar de Abordagem Pré-dialítica. *Rev Med Minas Gerais*. 2008;18(4 Supl1):S90-S97.

Somacarrera ML, Hernandez G, Acero J, Moskow BS. Factors related to the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival overgrowth in transplant patients. A longitudinal study. *J Periodontol*. 1994 Jul;65(7):671-5.

Stenvinkel P. New insights on inflammation in chronic kidney disease-genetic and non-genetic factors. *Nephrol Ther*. 2006 Jul;2(3):111-9.

Toyohara T, Akiyama Y, Suzuki T, Takeuchi Y, Mishima E, Tanemoto M, et al. Metabolomic profiling of uremic solutes in CKD patients. *Hypertens Res*. 2010 Sep;33(9):944-52.

Tsioufis C, Thomopoulos C, Soldatos N, Syrseloudis D, Kasiakogias A, Silvestros S, et al. The conjoint detrimental effect of chronic periodontal disease and systemic inflammation on asymmetric dimethyl-arginine in untreated hypertensive subjects. *Atherosclerosis*. 2010 Jan;208(1):258-63. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.07.017.

Velázquez NM, Orduña CG, Brieke WSM. Insuficiencia renal crónica y sus consideraciones estomatológicas. *Oral* 2004;5(16):236-8.

Vilela EM, Bastos JA, Fernandes N, Ferreira AP, Chaoubah A, Bastos MG. Treatment of chronic periodontitis decreases serum prohepcidin levels in patients with chronic kidney disease. *Clinics*. 2011;66(4):657-662.

Villas-Bôas SG, Gombert AK. Análise do Metaboloma. *Biotechnol Ciênc Desenvolvimento*. 2006 jan./jun.(36):58-69.

Weiss RH, Kim K. Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2011 Oct 25;8(1):22-33.

Wilcox CS. Asymmetric dimethylarginine and reactive oxygen species: unwelcometwin visitors to the cardiovascular and kidney disease tables. *Hypertension*. 2012 Feb;59(2):375-81. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187310. Epub 2012 Jan 3.

Winchester JF, Hostetter TH, Meyer TW. p-Cresol sulfate: further understanding of its cardiovascular disease potential in CKD. *Am J Kidney Dis*. 2009 Nov;54(5):792-4.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Oral health surveys: basic methods. 4th. ed. Geneva: WHO; 1997. (ORH/EPID).

Zhao H, Pflug BR, Lai X, Wang M. Metabolic and molecular regulation of dietary polyunsaturated fatty acids on prostate cancer. *Proteomics Clin Appl*. 2016 Mar;10(3):267-79. doi: 10.1002/prca.201500066. Epub 2015 Dec 10.

Zhao YY. Metabolomics in chronic kidney disease. Clin Chim Acta. 2013 Jun 25;422:59-69. doi: 10.1016/j.cca.2013.03.033. Epub 2013 Apr 6.

Zorzo RA. Perfil clínico-epidemiológico de 121 crianças e adolescentes com doença renal crônica: 22 anos de experiência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2008 [acesso 28 jun. 2016]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17138/tde-28072008-211159/>.

APÊNDICE A - Metabólitos Salivares mais significativos e catalogados no “Human Metabolome Database”

Metabólitos	HMDB/CAS	Classe	Sub-classe
			<i>(continua)</i>
Ácido propanóico	HMDB00237	Ác carbox. e derivados	Ács carbox.
Ácido acético	HMDB00042	Ác carbox. e derivados	Ács carbox.
L-Alanina	HMDB00161	Ác carbox. e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Glicina	HMDB00123	Ác carbox. e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Ácido fosfórico	HMDB01429	Composto n-metal.oxianiónico	Fosfato n-metálico
Uréia	HMDB00294	Ács orgânicos e derivados	Uréia
L-Ornitina	HMDB00214	Ác carbox. e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Ácido capróico	HMDB00535	Acilas/graxos	Ácidos graxos e conjugados
Beta-L-Manopirose	HMDB00169	Carb e conjugados de carbs	Monossacarídeos
Ácido hexadecanóico	HMDB00220	Acilas/graxos	Ácidos graxos e conjugados
Ácido octadecanóico	HMDB00827	Acilas/graxos	Ácidos graxos e conjugados
Ácido butírico, 2-metil-4-(2,5-xilil)-	HMDB00039	Acilas/graxos	Ácidos graxos e conjugados
Beta-D-Xilopiranosose	HMDB41272	Benzeno e derivados subst..	Ácidos benzoicos e derivados
Tirosina	HMDB00158	Ácidos fenilpropanóicos	-
Ácido tetradecanóico	HMDB00806	Acilas/graxos	Ácidos graxos e conjugados
Ácido pentanóico	HMDB00892	Acilas/graxos	Ácidos graxos e conjugados
Creatinina enol	HMDB00562	Azolinias	Imidazolinias
L-Serina	HMDB00187	Ác carbox. e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Propano, 1,2,3-tricloro-2-methyl-	HMDB31630	Alcanos	Alcanos acíclicos
Ciclopentano, 1,2-dipropil-	HMDB31542	Alcanos	Alcanos cíclicos

Metabólitos	HMDB/CAS	Classe	Sub-classe
			(conclusão)
L-Prolina	HMDB00162	Ác carbox. e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
L-Leucina	HMDB00687	Ác carbox. e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Furano, 2,5-bis(2-furanilmetil)-	HMDB13785	Compostos heteroaromáticos	-
Ácido benzóico	HMDB01870	Benzeno e derivados subst..	Ácidos benzoicos e derivados
Ácido carbâmico, [2-[(cianometil)amino]-1-metil-2-oxoetil]-, 1,1-dimetiletil ester, (s)-	HMDB03551	Ác carbox. e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
Piridina, 2,5-dicloro-	HMDB00926	Piridinas e derivados	-
1-Propanotiol, 2-(9-borabíciclo[3.3.1]non-9-iloxi)-	HMDB34238	Tióis	Alquil tióis
Imidazol, 4-aminocarbonil-5-fluoro-1-.beta.-d-ribofuranosil-	HMDB01525	Azóis	Imidazóis
Ácido octadecanóico	HMDB00827	Acilas/graxos	Ácidos graxos e conjugados
1,3,5-Triazina	HMDB41861	Triazinas	1,3,5 triazinas
Ácido pentanodióico	HMDB00661	Ác carbox. e derivados	Ácidos dicarboxílicos e derivados
(.+/-)-2,3-Butanodiol	HMDB03156	Álcoois e polialcóois	polióis
Ciclohexanol	HMDB12971	Acilas/graxos	Ácidos graxos e conjugados

p-valor ≤ 0,05 (p-val); HMDB (do inglês Human Metabolome database); CAS (do inglês Chemical Abstracts Service);

APÊNDICE B - Metabólitos da urina mais significativos e catalogados no “Human Metabolome Database”

Metabólitos	HMDB/CAS	Taxonomia Química	
		Classe	Sub-classe
4-Hydroxipiperidina	HMDB60902	Piperidinas	Fenilpiperidinas
Acetofenona	HMDB33910	Benzeno e derivados substituídos	Acetofenonas
4-metil-fenol (p-cresol)	HMDB01858	Benzeno e derivados substituídos	Fenóis e derivados
2-metoxi-fenol	HMDB01398	Benzeno e derivados substituídos	Fenóis e derivados
Uréia,	HMDB00294	ácidos orgânicos e derivados	Uréias
Ciclohexanol, 5-metil-2-(1-metiletil)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-(./-.)-	HMDB03352	Lipídio prenol	Monoterpenóides
Metilsalicilato	HMDB34172	Benzeno e derivados substituídos	Ácidos benzoicos e derivados
Indol	HMDB04094	Indóis e derivados	Hidroxiindóis
Benzamida	HMDB04461	Benzamida	
ácido 5-hidroxipecólico	HMDB00070	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e derivados
Glicina	HMDB00123	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e derivados
1H-Indol-3-ácido acético	HMDB29738	Ácidos carboxílicos e derivados	Ácidos carboxílicos indóis e derivados
Ácido hexadecanóico	HMDB61859	Ácidos graxos acilas	Ácidos graxos ésteres
Xantina	HMDB00292		
L-Glutamina	HMDB06344	Ácidos carboxílicos e derivados	
Ácido tetradecanóico	HMDB00806	Ácidos graxos acilas	Ácidos graxos e conjugados
1-Undeceno, 7-metil	HMDB29551	Olefinas	Olefinas acíclicas
Ácido octadecanóico	HMDB34154	Ácidos graxos acilas	Ácidos graxos ésteres
Megestrol Acetato	HMDB14495	Esteróides e derivados	Esteróides pregnanos
Gliiyl-l-tryptofil-glicina	HMDB29083		
Eicosano	HMDB59909	Alcanos	Alcanos acíclicos
Cyclohexane	HMDB29597	Alcanos	Cicloalcanos
Ciclopentano, metil	HMDB31542	Alcanos	Cicloalcanos
Metil benzoato, 2-metoxi-3-nitro-	HMDB33968	Benzeno e derivados substituídos	Ácido benzoico e derivados
3,7,11,15,18-Pentaoxa-2,19-disilaeicosano, 2,2,19,19-tetrametil-			
4-Morfolineetanol			

Benzeneethanol, 4-metil

2-Oxabiciclo[2.2.2]octan-6-ol, 1,3,3-trimetil-

Ciclopropane, 1-metil-2-(1-metililet)-3-(1-metiletilideno)-, cis-

2-Metoxi-4-vinilfenol

Ciclohexasiloxane, dodecametil-

1-Deoxi-2,4-metileno-3,5-anhydro-d-xilitol

Ciclohexan-1,3-dione dioxime

Benzamidinium
clorídrico

2,7-Dioxabiciclo[4.1.0]heptan-3-one, 5,5-dimetil-

fenol, 2,5-bis(1,1-dimetilet)-

Cicloheptasiloxano, tetradecametil-

2H-Indol-2-ona, 3-diazo-1,3-dihidro-

4-Hidroxi-1,8-naftiridina

Ciclooctasiloxano, hexadecametil-

Cafeina

3-Etoxibenzidrazida

Ciclononasiloxano, octadecametil-

7,9-Di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diono

Ciclopentano, metil-

2-Piperidinone

Hipoclorito de glicinamida

Ciclobutanocarbonitrila, 1-fenil-

Cclodecasiloxano, eicosametil-

Ciclohexanocarboxilico acido, 4-(1,1-dimetilet)-, trans-

Tetracosametil-ciclododecasiloxane

Di-n-octil fitalato

6-Trimetilsililoxipentadecano

APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado(a) Senhor(a):

Você / seu filho (a) está sendo convidado(a) a participar de forma **voluntária** da pesquisa **"Estudo do metaboloma de biofluidos em pacientes pediátricos nefropatas, e sua associação com a doença periodontal"**, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Lídia Ciamponi da Faculdade de Odontologia de São Paulo, e seu orientado, Dr. Levy Anderson César Alves, aluno de doutorado da Faculdade de Odontologia de São Paulo, o qual realizará a pesquisa na Clínica Odontológica e na Clínica do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da FOUSP.

O objetivo desta pesquisa é analisar a urina, placa bacteriana e fluido crevicular de adolescentes e adultos jovens com insuficiência renal crônica, estabelecer uma possível associação com a presença de doença periodontal, e compará-los à de crianças e adolescentes sem a patologia.

O exame clínico e coleta será realizado no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais (CAPE) da FOUSP. Para a coleta de urina, no dia do exame clínico, o paciente receberá o recipiente estéril para fazer a coleta em ambiente domiciliar e trazê-la no dia da realização do tratamento profilático.

O exame dos dentes e gengiva será realizado em uma cadeira odontológica com uso de instrumentos de rotina. Os riscos são mínimos, uma vez que os procedimentos de coleta não são invasivos, não havendo evidências de danos permanentes aos pacientes.

Esta pesquisa poderá ajudar a conhecer melhor a saúde periodontal do paciente. Individualmente, será examinado para identificar algum tipo de alteração periodontal. Nos casos em que for identificada alguma alteração que envolva a saúde dos dentes e gengiva, será encaminhado para atendimento.

As informações fornecidas serão confidenciais, bem como os resultados dos exames, sendo de conhecimento apenas dos pesquisadores envolvidos. Os participantes da pesquisa não serão identificados em nenhum momento.

Quanto a utilização dos dados, você / responsável poderá optar em:

- () SIM, autorizo a utilização dos dados para publicação em revistas científicas.
- () Não autorizo a utilização dos dados para a publicação em revistas científicas.

Quanto a utilização dos dados em outra pesquisa, você /responsável poderá optar em:

- () NÃO autorizo a utilização dos dados em outra pesquisa.
- () SIM, autorizo a utilização dos dados em outra pesquisa .
- () NÃO quero ser consultado da utilização dos dados em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.
- () SIM quero ser consultado da utilização dos dados em outra pesquisa.

Contatos:

Orientado: Levy Anderson C. Alves (levyanderson@usp.br) - Fone: (11)5081-3724

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lídia Ciamponi - Fone : (11)3091-7835

Local: Faculdade de Odontologia de São Paulo Universidade de São Paulo

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, Fone: 3091-7960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br).

“Após ter sido informado e ter todas as minhas dúvidas esclarecidas pelo pesquisador, participarei de forma voluntária desta pesquisa, sem prejuízo na continuidade do tratamento que se tem direito, podendo a qualquer momento interromper este consentimento sem nenhum prejuízo. Estou recebendo uma cópia deste termo”.

São Paulo, ____ de _____ de 2014.

Nome do participante : _____

Assinatura do participante (maior de 18 anos): _____

Número do RG: _____

Nome do responsável (LEGAL) : _____
(por extenso)

Assinatura do responsável (LEGAL): _____

Número do RG (do responsável LEGAL) : _____

Orientado : Levy Anderson César Alves – CRO/SP 93575

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Ciamponi - CRO 57861

APÊNDICE D - Ficha Clínica

FICHA CLÍNICA

n: _____ grupo: _____

Nome: _____ Idade: _____ Gênero: M () F ()

Nome do Responsável: _____ Vínculo: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

Telefone: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Instituição: _____

Estágio de doença renal: _____

Medicamentos em uso: _____

_____ Sofre de

alguma outra doença? Qual? _____

Exame Clínico Extra-oral: _____

CPOD: _____**Índice de Placa:**

1ºMSD	1ºMSE	ICSD	1ºMID	1ºMIE	ICIE	TOTAL

Índice de Cálculo:

1ºMSD	1ºMSE	ICSD	1ºMID	1ºMIE	ICIE	TOTAL

Avaliação Periodontal:

Índice de Sangramento: _____ % Classificação da DP (IPS): _____

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
			☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐			
			☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐			
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Profundidade de sondagem:

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo do metaboloma de biofluidos em pacientes pediátricos nefropatas, e sua associação com a doença periodontal

Pesquisador: Ana Lidia Ciamponi

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 21098713.5.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 736.015

Data da Relatoria: 01/08/2014

Apresentação do Projeto:

Este estudo contará com a participação de crianças e adultos jovens (12 a 21 anos) com insuficiência renal crônica (DRC) nos estágios 1 a 5 e estabelecer uma associação com a presença da doença periodontal. Serão divididos em grupos: G1: com DRC e ausência de Doença Periodontal; G2: com DRC e Doença Periodontal; G3: Sem DRC e Doença Periodontal; G4: sem DRC e Doença Periodontal; e G5: grupo controle negativo - normoreativos.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar o metaboloma de biofluidos de crianças e adolescentes com insuficiência renal crônica nos estágios 1-5 e estabelecer uma associação com a presença da doença periodontal. Identificar e interpretar a atividade e fluxo de metabólitos endógenos na urina, biofilme e fluido crevicular; identificar biomarcadores relacionados com o desenvolvimento de doença periodontal e avaliar o efeito de fármacos utilizados no tratamento da insuficiência renal crônica no metaboloma dos biofluidos sangue e urina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ambos mensurados

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 736.015

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: Folha de Rosto, Projeto de Pesquisa, autorização da Clínica do CAPE/FOUSP, Autorização do Prof. Titular de Odontopediatria/FOUSP, Autorização do Chefe do Laboratório de Controle e Simulação de Processos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP, Autorização do Supervisor da Clínica Odontológica da FOUSP e um TCLE.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 01 de Agosto de 2014

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br