Aline Lourenço Baptista

**Análise do metaboloma como uma nova ferramenta
para avaliação do distúrbio mineral e ósseo da
doença renal crônica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Affonso Moyses

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Baptista, Aline Lourenço

Análise do metaboloma como uma nova ferramenta
para avaliação do distúrbio mineral e ósseo da doença
renal crônica / Aline Lourenço Baptista. -- São
Paulo, 2019.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Rosa Maria Affonso Moyses.

Descritores: 1. Insuficiência renal crônica
2. Diálise renal 3. Doenças ósseas metabólicas
4. Remodelação óssea 5. Biópsia 6. Metabolômica

USP/FM/DBD-464/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Eduardo, que me ressignificou o amor.

Ao meu marido Thiago; seu amor, dedicação e carinho me tornam mais segura e forte.

À minha irmã Lívia; sua luz me inspira em seguir com fé.

Aos meus pais Marilene e Décio, meus alicerces. Sem vocês, nada disso seria sequer imaginado.

AGRADECIMENTOS

À minha mestra e orientadora Prof.^a Dra. Rosa Moysés. Muito obrigada pelo tempo, ensinamentos, exemplos e paciência. Você é a minha inspiração.

À querida Prof.^a Dra. Vanda Jorgetti; sua sabedoria e carinho transbordam, nos enriquecem e unem. Muito obrigada por ter me aceitado na sua família do Osso.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Alexandre Pereira e Prof.^a Dra. Silvia Titan. Vocês nos ajudaram a criar, conduzir e finalizar este trabalho. Muito obrigada mesmo.

À toda equipe de Metabolômica do LIM 13 no InCor, principalmente à Kallyandra e Pamella. Vocês foram extremamente competentes, comprometidas, pacientes e atenciosas. Sem a imensa ajuda e os ensinamentos de vocês este trabalho não existiria. Muito obrigada.

À equipe do LIM 16, em especial à Luciene e ao Wagner. Vocês são incríveis, muito obrigada pela ajuda, dicas e pelo suporte.

Ao LNBio, em especial à Ana Zeri, por transmitir todo seu conhecimento e fornecer a estrutura necessária para a realização deste estudo.

À Dra. Janaína Martins e ao Dr. Igor Denizarde que contribuíram sempre de forma ágil e positiva, dividindo seus dados e multiplicando suas teses em vários estudos.

A todos os amigos da pós-graduação: Patrícia, Carolina, Eduardo, Maria Júlia, Janaína, Geovanna, Lucas, Cesar, Melissa, Hanna, Aline, Juliana. Foram muitos momentos divertidos, muita ajuda e conhecimentos divididos.

À equipe de Nefrologia do AC Camargo pela compreensão e apoio durante todo o projeto.

Aos pacientes que colaboraram para o estudo, fundamentais para a pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro à pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade e suporte acadêmico.

À minha família querida e ao meu marido Thiago; amo infinitamente vocês. Muito obrigada por existirem na minha vida.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	15
3. MÉTODOS	16
3.1 Pacientes – Hemodiálise (HD)	16
3.2 Pacientes – Diálise Peritoneal	17
3.3 Grupo Controle (Projeto Corações de Baependi)	18
3.4 Biópsia Óssea e Histomorfometria	19
3.5 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	20
3.5.1 Preparo das amostras	21
3.5.2 Preparo de amostras por ultrafiltração	22
3.5.3 Preparo das amostras para análise de RMN	22
3.5.4 Parâmetros para análise no espectrômetro de RMN	23
3.5.5 Ajustes no espectrômetro de RMN	23
3.5.6 Tratamento dos dados no <i>software Chenomx</i>	24
3.5.7 Determinação do perfil metabólico (<i>Chenomx Profiling</i>)	25
3.6 Análise Estatística	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Metaboloma	27

4.2 Comparação do perfil metabólico de pacientes em hemodiálise e diálise peritoneal com grupo controle	31
4.3 Associação entre metabólômica e parâmetros do TMV	45
4.3.1 Remodelação óssea (<i>Turnover</i>)	47
4.3.2 Mineralização	58
4.3.3 Volume ósseo trabecular	65
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS	83

Apêndice

LISTA DE ABREVIATURAS

AUC – *area under the ROC curve* (área sob a curva ROC)

BFR/BS – taxa de formação óssea por unidade de superfície óssea

BV/TV – volume ósseo trabecular por volume de tecido

CE-MS – eletroforese capilar / espectometria de massa

CTX – C-telopeptídeo de ligação cruzada do colágeno do tipo I

CV – cardiovascular

Dkk1 – proteína Dickkopf-1

DM – diabetes mellitus

DMO – densidade mineral e óssea

DMO-DRC – distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica

DP – diálise peritoneal

DPA – diálise peritoneal automatizada

DPAC – diálise peritoneal ambulatorial contínua

DPD – deoxipiridinolina

DRC – doença renal crônica

DRC-5D – doença renal crônica estágio 5 em hemodiálise

FA – fosfatase alcalina

FAO – fração óssea da fosfatase alcalina

FGF-23 – fator de crescimento fibroblástico 23

GC-TOF/MS – cromatografia gasosa-tempo de voo / espectometria de massa

HBMD – base de dados do metaboloma humano

HD – hemodiálise

HDL – lipoproteína de alta densidade

HMP – projeto metaboloma humano

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

IC – intervalo de confiança

IMC – índice de massa corpórea

IRA – insuficiência renal aguda

kD – kilodalton

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MLT – intervalo de mineralização

MS – espectrometria de massa

nM – nanomolar

NTX – N-telopeptídeo de ligação cruzada do colágeno tipo I

OPG – osteoprotegerina

OR – *odds ratio* (razão de chance)

P1NP – propeptídeo amino-terminal do procolágeno tipo 1

PCA – análise por componentes principais

PLS-DA – análise discriminante por mínimos quadrados parciais

PTH – paratormônio

PTHi – paratormônio intacto

RNA – ácido ribonucleico

RNM – ressonância nuclear magnética

ROC – *receiver operating characteristic* (curva de características operacionais)

Scl – esclerostina

TCA – ácidos tricarbóxicos

TFG – taxa de filtração glomerular

TMAO – trimetilamina-N-óxido

TMV – remodelamento, mineralização, volume ósseo

TRAcP 5b – fosfatase ácida resistente ao tartarato sérico 5b

tRNA – ácido ribonucléico transportador

TRS – terapia de substituição renal

UPLC-MS – Cromatografia líquida de alta performance - espectometria de massa

VIP – importância variável na projeção

μM – micromolar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mediana, percentis 25 e 75 dos 64 metabólitos dos grupos hemodiálise, diálise peritoneal e seus controles pareados	28
Tabela 2 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes dos grupos hemodiálise, diálise peritoneal e seus controles pareados	33
Tabela 3 – Metabólitos com concentrações normalizadas (mediana, percentil 25 e 75) significativamente diferentes entre 48 pacientes em HD e 37 em DP e seus controles pareados	42
Tabela 4 – Análise de vias para pacientes em HD e DP usando metabólitos com concentrações significativamente diferentes entre os grupos	44
Tabela 5 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes do grupo hemodiálise	46
Tabela 6 – Análise univariada comparando a remodelação (baixa versus alta), a mineralização (anormal versus normal) e o volume ósseo trabecular (baixo versus normal) e os dados clínicos dos 46 pacientes	49
Tabela 7 – Teste t comparando os metabólitos e a remodelação óssea	53
Tabela 8 – Regressão logística incluindo os metabólitos significativos e o PTHi na análise da remodelação óssea	56
Tabela 9 – Resultado do teste t comparando os metabólitos e o intervalo de mineralização	60
Tabela 10 – Regressão logística incluindo idade, diabetes e os metabólitos significativos na análise da mineralização	63
Tabela 11 – Resultado do teste t comparando os metabólitos e o volume ósseo trabecular	68

Tabela 12 – Regressão logística incluindo idade, fósforo e os metabólitos significativos na análise do volume ósseo trabecular	72
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Visão geral das metodologias em metabolômica	9
Figura 2 – Aparelho de RMN pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton	21
Figura 3 – Espectro e biblioteca de compostos do software <i>Chenomx NMR Suíte</i>	30
Figura 4 – Exemplo de identificação e quantificação de uma das porções do espectro da Fenilalanina pelo software <i>Chenomx NMR Suíte 7.6</i>	30
Figura 5 – Espectro com parte dos compostos identificados e quantificados pelo software <i>Chenomx NMR Suíte 7.6</i>	31
Figura 6 – Análise por PCA dos 48 pacientes em HD (em vermelho) em comparação com seus controles pareados (em verde)	36
Figura 7 – Análise por PCA dos 37 pacientes em DP (em vermelho) em comparação com seus controles pareados (em verde)	37
Figura 8 – Análise por PLS-DA dos 48 pacientes em HD (em vermelho) em comparação com seus controles pareados (em verde)	38
Figura 9 – Análise por PLS-DA dos 37 pacientes em DP (em vermelho) em comparação com seus controles pareados (em verde)	39
Figura 10 – Escore VIP do primeiro componente dos 48 pacientes em HD em comparação com seus controles pareados	40
Figura 11 – Escore VIP do primeiro componente dos 37 pacientes em DP em comparação com seus controles pareados	41
Figura 12 – Análise por PLS-DA dos 46 pacientes em HD comparando alta (em verde) com baixa remodelação (em vermelho)	51

Figura 13 – Escore VIP do primeiro componente dos 46 pacientes em HD comparando alta (representada pelo numero 1) com baixa remodelação (representada pelo zero)	52
Figura 14 – <i>Boxplot</i> mostrando a distribuição dos metabólitos glicina, n-acetilornitina, dimetil sulfona e citrato nos grupos de remodelação alta e baixa	54
Figura 15 – Curva ROC mostrando a melhora no poder de discriminação na alta remodelação óssea do PTHi quando adicionamos dimetil sulfona, o conjunto de 3 metabólitos (dimetil sulfona, glicina e citrato) e de 4 metabólitos (dimetil sulfona, glicina, citrato e N-acetilornitina)	57
Figura 16 – Análise por PLS-DA dos 46 pacientes em HD comparando intervalo de mineralização normal (em verde) com anormal (em vermelho)	58
Figura 17 – Escore VIP do primeiro componente dos 46 pacientes em HD comparando intervalo de mineralização anormal (0) com normal (1)	59
Figura 18 – <i>Boxplot</i> mostrando a distribuição dos metabólitos etanol, dimetil sulfona e malonato nos grupos de mineralização anormal e normal	61
Figura 19 – Curva ROC mostrando a melhora no poder de discriminação da idade e diabetes quando adicionamos o etanol e o conjunto de metabólitos (etanol, dimetil sulfona e malonato) na análise da mineralização	64
Figura 20 – Análise por PLS-DA dos 46 pacientes em HD comparando volume trabecular ósseo normal (em verde) com baixo (em vermelho)	65
Figura 21 – Escore VIP do primeiro componente dos 46 pacientes em HD comparando volume trabecular ósseo baixo (0) com normal (1)	67

Figura 22 – *Boxplot* mostrando a distribuição dos metabólitos carnitina, uréia, trimetilamina, O-acetilcarnitina, N,N-dimetilglicina e creatinina nos grupos de volume ósseo trabecular (BV/TV) baixo e normal 69

Figura 23 – Curva ROC mostrando a melhora no poder de discriminação da carnitina e do conjunto de metabólitos na análise do volume trabecular ósseo 73

RESUMO

Baptista AL. *Análise do metaboloma como uma nova ferramenta para avaliação do distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A biópsia óssea ainda é o padrão ouro para avaliar a remodelação (T), a mineralização (M) e o volume ósseo (V) em pacientes com doença renal crônica (DRC), e os biomarcadores séricos não são capazes de substituir a histomorfometria óssea. Recentemente, a metabolômica emergiu como uma nova técnica que permite a identificação de novos biomarcadores para o diagnóstico de doenças e a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos, mas nunca foi avaliada no cenário do distúrbio mineral e ósseo da DRC. Neste estudo, investigamos a associação entre metabólitos séricos e a classificação TMV nos pacientes com DRC. A espectroscopia por RMN sérica e a biópsia óssea foram realizadas em 51 pacientes em hemodiálise de um único centro no Brasil. Alta remodelação óssea foi identificada em 21 pacientes e foi associada aos maiores níveis de dimetil sulfona, glicina, citrato e N-acetilornitina. A curva ROC da combinação do paratormônio com estes metabólitos forneceu uma AUC de 0,86 (0,76-0,97). Mineralização anormal foi identificada em 30 pacientes e associada com menor nível de etanol. A AUC da combinação idade, diabetes mellitus e etanol foi de 0,82 (0,70-0,96). O baixo volume ósseo foi identificado em 17 pacientes e foi associado com menor nível de carnitina. A associação de idade, fósforo e carnitina forneceu uma AUC de 0,83 (0,70-0,96). Embora as diferenças entre as curvas ao adicionarmos os metabólitos selecionados aos modelos tradicionais não tenham sido estatisticamente significativas, a acurácia no diagnóstico da classificação TMV parece ter melhorado. Em conclusão, este é o primeiro estudo que avaliou o sistema de classificação TMV em relação ao metaboloma sérico realizado por espectroscopia por RMN, mostrando que metabólitos selecionados podem ajudar na avaliação de fenótipos ósseos no DMO-DRC.

Descritores: Insuficiência renal crônica; Diálise renal; Doenças ósseas metabólicas; Remodelação óssea; Biópsia; Metabolômica.

SUMMARY

Baptista AL. *Metabolome analysis as a new tool for assessment of mineral and bone disorder of chronic kidney disease* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Bone biopsy is still the gold standard to assess bone turnover (T), mineralization (M) and volume (V) in chronic kidney disease (CKD) patients, and serum biomarkers are not able to replace histomorphometry. Recently, metabolomics has emerged as a new technique that could allow for the identification of new biomarkers useful for disease diagnosis or understanding of pathophysiologic mechanisms, but it has never been assessed in the CKD-mineral and bone disorder (CKD-MBD) scenario. In this study, we investigated the association between serum metabolites and the bone TMV classification in end-stage renal disease patients. Serum NMR-spectroscopy and bone biopsy were performed on 51 hemodialysis patients from a single center in Brazil. High bone turnover was identified in 21 patients and was associated with higher levels of dimethyl sulfone, glycine, citrate and N-acetylmethionine. ROC curve for the combination of parathormone and these metabolites provided an AUC of 0,86 (0,76-0,97). Abnormal mineralization was identified in 30 patients and was associated with lower ethanol. AUC for age, diabetes mellitus and ethanol was 0,82 (0,70-0,96). Low bone volume was identified in 17 patients and was associated with lower carnitine. The association of age, phosphate and carnitine provided an AUC of 0,83 (0,70-0,96). Although differences among the curves by adding selected metabolites to traditional models were not statistically significant, the accuracy for the diagnosis of TMV classification seemed to be improved. In conclusion, this is the first study to evaluate the TMV classification system in relation to the serum metabolome assessed by NMR-spectroscopy, showing that selected metabolites may help in the evaluation of bone phenotypes in CKD-MBD.

Descriptors: Renal insufficiency, chronic; Renal dialysis; Bone diseases, metabolic; Bone remodeling; Biopsy; Metabolomics.

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) afeta aproximadamente 11% da população mundial com um amplo espectro de complicações associadas (1). Uma das principais complicações é o distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica (DMO-DRC), uma síndrome causada pelas alterações da homeostase do cálcio, fósforo e dos hormônios vitamina D e paratormônio (2). O DMO-DRC está associado à perda óssea e fraturas, doenças cardiovasculares, inflamação, função imunológica anormal e aumento da mortalidade, e ocorre de maneira progressiva em quase todos os pacientes com DRC estágios 3 a 5D (3).

A avaliação e o tratamento do DMO-DRC são de extrema importância, pois reduzem o risco de complicações como dores ósseas e fraturas, melhorando a qualidade de vida e reduzindo a mortalidade devido ao melhor controle das doenças cardiovasculares (2). Sabe-se que a calcificação vascular e o remodelamento cardíaco estão intimamente relacionados ao DMO-DRC, sendo as doenças cardiovasculares as principais causas de mortalidade destes pacientes (4).

O diagnóstico do tipo histológico de doença óssea no DMO-DRC é acessível apenas através da biópsia óssea, um método invasivo e nem sempre disponível, portanto não sendo utilizado de forma rotineira. Através da biópsia óssea é possível compreender melhor a fisiopatologia e o curso da doença óssea, relacionar os achados histológicos com sintomas clínicos como dores e fraturas, além de determinar o melhor tratamento (5, 6).

O tecido ósseo é avaliado pela análise quantitativa conhecida como histomorfometria e pelo sistema de classificação TMV (do inglês *turnover, mineralization, volume*) recomendada para os pacientes com DRC (5). Esta classificação avalia a remodelação (em baixa, normal ou alta), a mineralização (em normal ou anormal) e o volume ósseo (em baixo, normal ou aumentado).

Os tipos histológicos de doença óssea no DMO-DRC são classificados em relação a taxa de remodelação e mineralização (2). A osteíte fibrosa ou doença óssea do hiperparatireoidismo secundário apresenta alta remodelação com mineralização normal; a doença mista, alta remodelação e mineralização

anormal; a osteomalácia, baixa remodelação e mineralização anormal; e a doença óssea adinâmica, baixas remodelação e celularidade.

Embora volume e mineralização sejam componentes importantes da qualidade do tecido ósseo, até hoje o foco principal no manejo do DMO-DRC foi avaliar a doença óssea com base na sua taxa de remodelação óssea (2). Diversos estudos associam as alterações da taxa de remodelação com desfechos clínicos como aumento no risco de fraturas (7) e progressão da calcificação vascular naqueles pacientes que evoluem de alta para baixa taxa de remodelação devido ao tratamento realizado (8-10). Apesar de tanto a formação como a reabsorção comporem a remodelação, esta é definida pela taxa de formação óssea (BFR/BS – taxa de formação óssea por unidade de superfície óssea).

Os marcadores séricos atualmente disponíveis não permitem diferenciar os tipos histológicos ou a taxa de remodelação com boa acurácia (11). Os mais empregados na prática clínica são o paratormônio (PTH), a fosfatase alcalina total (FA) e sua fração óssea (FAO). Em protocolos de pesquisa há estudos também com propeptídeo aminoterminal do procolágeno tipo 1 (P1NP), deoxipiridinolina (DPD), esclerostina (Scl), C-telopeptídeo de ligação cruzada do colágeno do tipo I (CTX) e N-telopeptídeo de ligação cruzada do colágeno tipo I (NTX), fosfatase ácida resistente ao tartarato 5b (TRAP 5b), osteocalcina e osteoprotegerina. Todos apresentam especificidade e sensibilidade limitadas.

O principal deles é o PTH, sendo até agora o melhor marcador sérico de remodelação óssea e o mais utilizado na prática clínica (12). O PTH intacto (PTHi ou de segunda geração) é o ensaio atualmente recomendado pela diretriz KDIGO (2), a despeito de analisar tanto a molécula intacta (a fração 1-84) como seus fragmentos, conhecidos como grandes fragmentos carboxi-terminal do PTH, que parecem ter atividade antagônica ao fragmento intacto no osso (13). Além disso, as diferenças nos padrões dos ensaios e nos intervalos de referência causam muita disparidade no uso do PTHi como marcador da remodelação (14, 15). Estudos comparando os níveis de PTHi com os achados de biópsia óssea mostram que o nível de PTHi não é capaz de discriminar a remodelação em baixa, normal ou alta, mas diferenciar os extremos da remodelação óssea (baixa de não-baixa e alta de não-alta) (12). O nível ideal de PTHi (aquele em que o

paciente apresentaria a taxa de formação óssea normal) ou o nível que deva ser atingido com as terapias de redução de PTH também são desconhecidos. A terceira geração de PTH (PTH 1-84, ensaio que detecta exclusivamente a molécula completa do PTH com seus 84 aminoácidos) não se mostrou um ensaio superior ao PTHi. Os estudos mais relevantes com este ensaio mostraram que a razão do PTH (relação entre o PTH 1-84 e os grandes fragmentos carboxi-terminal do PTH) pode diferenciar a remodelação óssea entre brancos e negros (16) e que a razão PTH1-84/PTHi pode ser um preditor útil da severidade do hiperparatireoidismo secundário (17).

A fosfatase alcalina total (FA) é uma proteína produzida pelo fígado, rins, intestino, placenta e osso. A FA é composta por 6 isoformas que podem ser detectáveis por HPLC no soro dos indivíduos saudáveis: uma óssea/intestinal (B/I), duas ósseas (B1 e B2) e três hepáticas (L1, L2 e L3) (18). Além destas, uma nova isoforma óssea, a B1x, foi identificada no soro de aproximadamente 60% dos pacientes com DRC-5D, e parece se associar negativamente com baixa remodelação óssea (19). A fração óssea da FA (FAO) é secretada pelos osteoblastos e, assim como a FA, é utilizada como marcador de formação óssea (20, 21). A FA e a FAO geralmente encontram-se aumentadas em pacientes em hemodiálise com alta remodelação óssea, tendo a FAO uma melhor correlação que a FA com a taxa de formação óssea e quando utilizada em conjunto com o PTH (19). Porém, a FAO não parece superior ao PTHi como preditora da remodelação óssea (12). Curiosamente, o aumento da FA se associou com a maior mortalidade em pacientes em hemodiálise de maneira mais consistente do que o próprio PTHi (22).

O P1NP (propeptídeo amino-terminal do procólgeno tipo 1) é um marcador de formação óssea de metabolismo hepático, portanto, não é afetado pela função renal (23). Este marcador é diretamente proporcional à quantidade de colágeno novo depositado durante a formação óssea e parece ter relação direta com a FAO e o PTH (24). Porém, um estudo mais recente não mostrou correlação deste marcador com a remodelação óssea em pacientes em hemodiálise (12).

A esclerostina (Scl) é uma proteína codificada pelo gene SOST e altamente expressa pelos osteócitos (25). Ela inibe uma importante via de sinalização

celular usada pelos osteoblastos, a via Wnt/ β -catenina, diminuindo sua proliferação e aumentando a apoptose, sendo portanto, um potente inibidor da formação óssea (26). Seu nível sérico está aumentado nos pacientes em hemodiálise e apresenta uma correlação negativa com o PTHi e a FAO (27). Em um estudo com pacientes em hemodiálise, a Scl sérica baixa mostrou-se superior ao PTHi como preditora do aumento da remodelação nos pacientes com doença óssea de alta remodelação (28), o mesmo observado em pacientes em diálise peritoneal, em que os níveis de Scl sérica e sua expressão óssea se associaram negativamente à taxa de remodelação óssea (29). No entanto, estudo mais recente em pacientes com DRC estágio 2 a 5D, tanto a Scl como o PTHi e o fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23), não se mostraram bons preditores da remodelação óssea (30). Além da Scl, a proteína Dickkopf-1 (Dkk1) também é um inibidor da via Wnt (31); porém, os níveis séricos de Dkk1 não se correlacionaram com PTH ou com parâmetros histomorfométricos das biópsias ósseas (28, 31). O FGF-23, uma proteína da família dos fatores de crescimento dos fibroblastos secretada principalmente pelos osteoblastos e osteócitos e considerada uma fosfatona por inibir a reabsorção tubular de fósforo, parece atuar diretamente sobre o osso através da inibição da diferenciação dos osteoblastos e da mineralização da matriz óssea (32); porém, não apresenta relação com a remodelação óssea (30).

A deoxipiridinolina (DPD), juntamente com a piridinolina, é um produto de degradação do colágeno que pode ser usada como marcador de reabsorção óssea (21, 33). Poucos estudos avaliaram a relação da DPD com a remodelação óssea em DRC avançada, mas seu aumento parece ter relação com alta taxa de remodelação e com a perda de massa óssea (avaliada por densitometria óssea do radio distal) de pacientes em hemodiálise (34). Além disso, um estudo prospectivo que avaliou o impacto das mudanças na remodelação óssea na calcificação coronariana em pacientes em hemodiálise mostrou que os pacientes que apresentaram menor progressão na calcificação coronariana também apresentaram maiores níveis de DPD e FAO (8). Neste estudo, a maior parte dos pacientes apresentava doença de baixa remodelação; portanto, maiores níveis de DPD e FAO indicariam melhor remodelação óssea.

Outros marcadores de reabsorção óssea são o C-telopeptídeo de ligação

cruzada do colágeno do tipo I (CTX) e N-telopeptídeo de ligação cruzada do colágeno tipo I (NTX) (34). O aumento do nível sérico de CTX e NTX parece ter relação com alta taxa de remodelação e com a perda de massa óssea (avaliada por densitometria óssea do radio distal) de pacientes em hemodiálise, além de estar associado a uma taxa de perda óssea mais rápida no terço distal do radio durante o período de 2 anos nesta população (34). Porém, há poucos estudos comparando estes marcadores com alterações nas biópsias ósseas de pacientes com DRC.

A fosfatase ácida resistente ao tartarato 5b (TRAP 5b) é um marcador de reabsorção óssea e atividade osteoclástica que está aumentado em pacientes com DRC-5D e provável alta taxa de remodelação (35), porém seu uso ainda é limitado pela pouca disponibilidade de ensaios automatizados (36).

A osteocalcina e a osteoprotegerina também foram avaliadas como possíveis marcadores de remodelação óssea (37), porém há poucas publicações relacionando-as com achados em biópsia óssea.

A despeito dos diversos marcadores de formação e reabsorção supracitados, não há marcador sérico isolado capaz de avaliar a taxa de remodelação óssea (11, 12), possibilitando o diagnóstico e manejo adequado das doenças ósseas. Além disso, seria interessante também termos marcadores de mineralização e volume ósseos. Dessa forma, faz-se necessário ampliar as formas de avaliação do DMO-DRC. Como diversas proteínas, metabólitos e vias metabólicas estão envolvidas na remodelação óssea, com interações sabidamente complexas, a avaliação do metaboloma ósseo é uma ferramenta nova que pode fornecer informações capazes de avaliar o tipo de doença óssea, a taxa de remodelação ou auxiliar na compreensão da sua fisiopatologia.

A metabolômica é a área da ciência responsável pelo estudo do metaboloma, o conjunto de todos os metabólitos produzidos ou alterados por um organismo (38). A metabolômica faz parte do grupo das "ômicas", que inclui a genômica (o mapeamento completo do genoma), a transcriptômica (identificação dos RNA mensageiros envolvidos na transcrição gênica) e a proteômica (identificação das proteínas resultantes dessas transcrições). A metabolômica é a via final comum destas "ômicas", representando as mudanças ocorridas a jusante no genoma, transcriptoma e proteoma (39, 40).

O metaboloma humano pode ser definido como a coleção completa de pequenas moléculas encontradas no corpo. Estas pequenas moléculas incluem peptídeos, lipídios, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, aditivos alimentares, drogas, toxinas, poluentes e qualquer outro produto químico, desde que apresente um peso molecular menor que 2.000 daltons (41). Juntamente com o genoma e o proteoma, o metaboloma humano define essencialmente quem e o que somos. No entanto, em contraste com o genoma e o proteoma, o próprio metaboloma não é facilmente definido. Isso ocorre porque o metaboloma humano não é ditado apenas por nossos genes. Nosso ambiente e nossa microflora (as bactérias que vivem em nosso trato intestinal responsáveis pelo microbioma) também contribuem para o metaboloma. Dessa forma, o metaboloma humano consiste em uma mistura de compostos endógenos e exógenos. Os metabólitos endógenos são pequenas moléculas sintetizadas pelas enzimas codificadas pelo nosso genoma ou pelo genoma da nossa microflora (microbioma), e os metabólitos exógenos são substâncias químicas "externas" ou xenobióticos como alimentos, bebidas e medicamentos (41).

Na metabolômica, além das moléculas estudadas serem menores, elas estão presentes em menor quantidade se comparado com a genômica e a proteômica, o que torna os perfis metabólicos um pouco menos desafiadores para análise e interpretação (40). Além disso, um outro fator importante é que as amostras experimentais para metabolômica são obtidas geralmente a partir de fluidos corporais (como soro e urina), amostras geralmente acessíveis e coletadas de forma não invasiva (41).

Existem diversos bancos de dados *on-line* que catalogam o crescente compêndio de metabólitos observado em amostras biológicas. Um dos principais é o Projeto Metaboloma Humano (*Human Metabolome Project*, HMP), que começou em 2005 e utiliza uma variedade de estudos em combinação com levantamentos bibliográficos para compilar o máximo possível de informações sobre o metaboloma humano. Esta informação é divulgada publicamente através do *Human Metabolome Database* ou HMDB (41). Atualmente, a base de dados está na versão 4.0 e conta com 114.154 metabólitos incluindo os solúveis em água e os solúveis em lipídios, bem como metabólitos considerados abundantes

(>1 μ M) ou relativamente raros (<1nM).

É importante reconhecer que os métodos disponíveis para a análise metabolômica não são robustos e abrangentes como os das outras “ômicas”, particularmente a genômica (42). Os metabólitos abrangem uma variedade de classes de compostos com grandes diferenças de tamanho e polaridade, em uma ampla gama de concentrações. Como resultado, nenhuma técnica única é capaz de fornecer uma cobertura completa do metaboloma e, para qualquer método escolhido, haverá heterogeneidade na aferição individual dos metabólitos (42). Embora as ferramentas continuem a melhorar, a cobertura incompleta é um desafio central na medição dos metabólitos e está relacionada ao preparo da amostra, à análise de dados e à descrição na literatura (42).

Além disso, as análises metabolômicas podem ser direcionadas (*target*) ou não-direcionadas (*nontarget*). Nas análises direcionadas, o aparelho é configurado para procurar uma lista pré-especificada de metabólitos. Esta abordagem tem a vantagem de apresentar alta sensibilidade para os metabólitos de interesse e tem alto grau de confiança nas identidades dos metabólitos. Já as análises não-direcionadas tentam dosar todos os metabólitos possíveis na amostra, sendo utilizadas para compor perfis metabólicos ainda desconhecidos; porém, podem gerar uma grande quantidade de dados, além da incerteza na identificação dos compostos (42).

Sendo assim, existem duas formas básicas de avaliação metabolômica, a espectroscopia por ressonância nuclear magnética (RNM) e a espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) (38).

A RMN utiliza as propriedades magnéticas de núcleos atômicos selecionados (por exemplo, ^1H , ^{13}C ou ^{31}P) para determinar a estrutura e a quantidade do metabólito na amostra biológica. O núcleo do átomo de ^1H é o candidato preferencial desta técnica devido a sua abundância nos compostos orgânicos. Não necessita de um pré-processamento da amostra, não utiliza radiação ionizante, sendo em grande parte automatizada e não-destrutiva, ou seja, não promove qualquer tipo de reação química, preservando as amostras escassas ou raras, além de quantificar cada metabólito de forma absoluta na faixa de micro-molar. Sua sensibilidade é limitada à detecção de componentes relativamente abundantes, geralmente menos de 100 metabólitos por amostra,

o que gera menor variabilidade entre os perfis metabólicos dos indivíduos analisados (43, 44).

A MS é geralmente aplicada para a determinação de metabólitos a partir de sua razão massa-carga e perfil de fragmentação. É uma técnica que apresenta alta sensibilidade com análise rápida dos metabólitos, sendo recomendada para caracterização de compostos desconhecidos. Apesar da MS ter sensibilidade muito superior à RNM, ela depende de separação cromatográfica (gasosa ou líquida, por exemplo) ou eletroforética (eletroforese capilar) para reduzir a complexidade da amostra antes da análise, com possível perda de metabólitos nesta fase (como perda dos compostos termolábeis na cromatografia gasosa, por exemplo) (45). Além disso, muitos laboratórios utilizam mais de uma combinação de cromatografia, necessitando a injeção de alíquotas diferentes da mesma amostra em cada método (42). Após a cromatografia, os metabólitos entram na MS e sofrem ionização, e a MS então separa os metabólitos com base na sua razão massa-carga. Diferentes tipos de técnicas de ionização das MSs, incluindo, mas não limitados a, triplo-quadruplo (*triple quadrupole*), tempo de voo (*time-of-flight*) e captura de íons (*ion-trap*), usam métodos distintos para resolver os índices massa-carga, cada um com diferentes pontos fortes, fracos e aplicações (42). Na figura 1, encontra-se um panorama das técnicas acima descritas.

Figura 1 – Visão geral das metodologias em metabolômica.

A ressonância magnética nuclear (RMN) é robusta, requer pouco preparo das amostras e não necessita de separação cromatográfica. No entanto, devido à sensibilidade limitada e à alta complexidade dos dados, a identificação inequívoca é tipicamente limitada a menos de 100 metabólitos. As abordagens baseadas em espectrometria de massa (MS) têm uma maior sensibilidade e dependem de uma combinação de resolução cromatográfica e resolução de massa-carga (m/z) para a identificação dos metabólitos. Em plataformas baseadas em MS, os instrumentos triplos quadrupolos geralmente são usados para análises direcionadas, nas quais são medidas aproximadamente centenas de metabólitos de identidade conhecida, enquanto o tempo de voo e a captura de íons são freqüentemente usados para análises não direcionadas de aproximadamente milhares de picos de metabólitos (mas apenas um subconjunto deles são conhecidos). Vantagens relativas (+) e desvantagens (-) das diferentes abordagens são mostradas. Fonte: Adaptado de Kalim S, Rhee EP. *Kidney Int* 2017 (42).

Dado o interesse de longa data no metabolismo das doenças renais, as abordagens metabolômicas foram incorporadas rapidamente nas pesquisas nefrológicas (39, 42). Uma característica exclusiva das doenças do rim e do trato urinário é que a maioria dos componentes deste sistema são expostos à urina,

um fluido facilmente obtido e com possibilidade de utilizá-lo para detecção de biomarcadores, sem contar com a facilidade de abordar o sangue (soro) e, se necessário, os tecidos para estas análises (39).

Diversos estudos em metabolômica foram dedicados à descoberta e quantificação das toxinas urêmicas na DRC. A metabolômica é uma boa técnica para estes estudos, pois a maioria das toxinas urêmicas são metabolitos pequenos (<1kD) presentes no metaboloma (42). Apesar da base bioquímica da síndrome urêmica ter sido amplamente estudada nos últimos anos, ainda não está claro quais dos compostos retidos no sangue como resultado da progressão da DRC estão relacionados com a síndrome e suas complicações, apesar de numerosas hipóteses. Os metabolitos da via do Triptofano são um dos grupos que estão em estudo para predição da DRC (42). O aumento no nível sérico destes metabolitos em indivíduos com DRC avançada já é conhecido por muitos anos, com especial interesse no indoxil sulfato como possível toxina urêmica. Com o avanço em metabolômica, diversos estudos testaram a associação entre os perfis metabólicos de base e o subsequente desenvolvimento de DRC nos pacientes, definido como a redução da taxa de filtração glomerular estimada (TGF) abaixo de 60 ml/min/1.73m². Em um estudo, os pesquisadores avaliaram as concentrações plasmáticas basais dos metabolitos de 80 pacientes com nefropatia diabética, sendo que 40 deles posteriormente evoluíram para DRC terminal. O sinal compartilhado mais forte nestes indivíduos ocorreu na via da quinurenina (que faz parte dos metabolitos do Triptofano) (46). Outra pesquisa que avaliou os pacientes do estudo de coorte Framingham (*Framingham Heart Study*), também destacou a quinurenina e o ácido quinurênico como marcadores de risco para o desenvolvimento de DRC nesses indivíduos (47).

Outra toxina urêmica em destaque atualmente é a Trimetilamina-N-óxido (TMAO) devido à sua associação com o aumento de risco cardiovascular (48). Os níveis sanguíneos de TMAO são determinados por uma combinação da conversão microbiana intestinal de colina e L-carnitina dietéticas em trimetilamina, com a oxidação hepática da trimetilamina em TMAO. Como a TMAO é excretada principalmente pelo rim e está aumentada em indivíduos com TFG diminuída, sendo muito elevada em pacientes em diálise (49), vários grupos examinaram a associação entre TMAO e doenças cardiovasculares (CV) em

pacientes com DRC (49, 50). Em estudos de coorte de indivíduos não portadores de DRC, a TMAO, além da betaína e colina (metabólitos da mesma via), foram associadas com desfechos CV maiores como infarto, acidente vascular cerebral e morte (48). Em indivíduos com DRC, os níveis séricos de TMAO foram correlacionados com o grau de aterosclerose naqueles submetidos a angiografia coronariana, além de também estarem associados ao aumento de mortalidade e maior risco de eventos CV (49, 50).

A metabolômica tem sido usada para demonstrar o impacto do microbioma no perfil de outras toxinas urêmicas além da TMAO, e algumas análises direcionadas identificaram a associação desses metabólitos com desfechos cardiovasculares. Como exemplo, em um estudo com 400 pacientes incidentes em hemodiálise, o sulfato de p-cresol foi associado a um risco 62% maior de mortalidade CV, além de um risco 60% maior de apresentar o primeiro evento CV, e a fenilacetilglutamina plasmática foi associada a um risco 37% maior de apresentar o primeiro evento CV por cada 1 desvio-padrão de aumento na sua concentração (51).

Até o momento, existe apenas um trabalho publicado em metabolômica que comparou as duas principais modalidades de terapia renal substitutiva (TRS), a hemodiálise intermitente (HDI) e a diálise peritoneal (DP), através da espectroscopia por RNM (52). Este estudo comparou o perfil metabólico entre os pacientes em DP, HDI e com função renal normal (18 indivíduos por grupo), sendo que todos os pacientes em TRS eram anúricos e não-diabéticos. Porém, 66,7% dos pacientes do grupo DP utilizavam dialisato com icodextrina, o que interferiu na análise do metaboloma. Mesmo assim, foram encontradas diferenças aparentes nos perfis de metabólitos séricos entre HDI e PD (relacionados à modalidade de diálise), e os metabólitos inosina e hipoxantina estavam presentes apenas nos pacientes em HD, podendo estar relacionadas ao maior estresse hipóxico e oxidativo deste método.

A metabolômica também tem sido amplamente utilizada em estudos em nefropatia diabética e insuficiência renal aguda (IRA), pois ambas estão relacionadas aos distúrbios do metabolismo oxidativo renal. Como existe uma alta densidade de mitocôndrias em células tubulares renais, particularmente no túbulo proximal e no segmento espesso da alça de Henle, diversos estudos já

mostraram o papel central destas organelas no desenvolvimento dessas patologias (53, 54). Um estudo metabolômico em urina realizado em uma coorte de adultos saudáveis e portadores de DM com e sem DRC, mostrou que um grupo de metabólitos urinários eram biomarcadores potenciais da diminuição da função mitocondrial renal que ocorre na nefropatia diabética (55). Outro estudo em insuficiência renal aguda utilizando um modelo suíno de isquemia e reperfusão (I/R) renal, identificou diversos metabólicos séricos e urinários relacionados ao período de isquemia, sendo todos eles relacionados com a fisiopatologia da IRA (alteração de vias energéticas e estresse oxidativo). Além disso, um grupo de metabólitos urinários estava aumentado durante a fase de reperfusão precoce, refletindo o rim isquêmico e diferenciando os períodos de pré-isquemia e pós-I/R, além da descoberta de uma possível via implicada na IRA por I/R que foi a via da Huntingtina (56). Estes estudos são exemplos de como a metabolômica têm a capacidade de identificar potenciais biomarcadores que podem ser mediadores causais e/ou terapeuticamente modificáveis no curso das doenças.

Existem estudos em metabolômica em outras áreas da nefrologia, como na doença renal policística autossômica dominante, no transplante renal e nas neoplasias renais.

Da mesma forma, a metabolômica também tem sido empregada em estudos em doenças ósseas, principalmente em osteoporose. Em modelos animais, um estudo utilizando análise por GC-TOF/MS em um modelo de osteoporose pós-menopausa em ratas ovariectomizadas mostrou que o perfil metabolômico foi mais sensível do que os critérios convencionais (densidade mineral óssea, FAO e NTx) durante a progressão da osteoporose, com um perfil significativamente diferente entre os grupos do estudo (57). Um outro estudo utilizando espectroscopia por RNM neste mesmo modelo de osteoporose em ratas, porém agora tratadas com alendronato, mostrou que o uso de alendronato afetava principalmente o metabolismo energético, aumentando os níveis séricos de glicose, 3-hidroxibutirato e taurina (com relação positiva com a saúde óssea e aumento de peso das ratas tratadas), mas também aumentava significativamente as concentrações de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), sugerindo que a função mitocondrial também poderia ser

afetada pela droga (58). Um estudo transversal em mulheres taiwanesas de 40 a 55 anos pós-menopausa foi um dos primeiros a identificar, utilizando espectroscopia por RNM, que a elevação de glutamina estava significativamente associada à baixa densidade mineral óssea, enquanto o aumento de lactato, acetona, lipídios e lipoproteínas de baixa densidade eram metabólitos protetores (59). Outro estudo realizado no Japão com mulheres no período pós-menopausa de 39 a 64 anos com baixa densidade mineral óssea versus densidade mineral óssea normal, mostrou através da CE-MS que os níveis de hidroxiprolina, Gly-Gly e cistina diferiram significativamente entre os grupos, com Gly-Gly e cistina significativamente menores no grupo de baixa densidade mineral óssea e hidroxiprolina (marcador de osteoporose) significativamente maior, sugerindo um novo perfil metabolômico em mulheres na pós-menopausa com baixa densidade mineral óssea (60).

Existem poucos estudos que avaliaram a influência dos metabólitos considerados toxinas urêmicas no DMO-DRC. Estes estudos foram realizados com a quantificação direta do metabólito indoxil sulfato. O indoxil sulfato é derivado do metabolismo do triptofano dietético e é excretado pelos rins por secreção tubular proximal, dessa forma, acumulando de forma importante nos pacientes com insuficiência renal. Além disso, a alta afinidade de ligação do indoxil sulfato pela albumina faz com que ele não possa ser eficientemente removido pela hemodiálise convencional (61). Alguns estudos com culturas celulares e modelos animais com DRC mostraram que esse metabólito inibe a função dos osteoblastos e osteoclastos, possivelmente contribuindo para resistência óssea ao PTH (62, 63). Um estudo em pacientes em hemodiálise mostrou que o indoxil sulfato se correlacionou negativamente com a FA e a FAO (marcadores de formação óssea), independentemente do PTHi (64). Porém, um estudo mais recente em pacientes portadores de DRC estágios 2 a 5 com biópsia óssea mostrou que o aumento do indoxil sulfato estava associado positivamente com a formação óssea (BFR/BS, volume osteóide, superfície dos osteoblastos e volume de fibrose), possivelmente pelo aumento da secreção de PTH nesses pacientes (um possível fator de confusão), pelo aumento na resistência esquelética ao PTH ou pela inibição do calcitriol pelo indoxil sulfato (65).

Apenas um estudo publicado até o momento com análise proteômica tentou avaliar a relação entre a taxa de remodelação óssea em pacientes portadores de DMO-DRC com as células-tronco (coletadas do tecido adiposo) (66). Este estudo demonstrou alguns padrões distintos de expressão de proteínas em relação à taxa de remodelação, indicando uma possível ligação entre as células-tronco e a remodelação no DMO-DRC. Porém, não há estudos em metabolômica com pacientes portadores de DMO-DRC até o momento.

2. OBJETIVOS

Primários

Avaliar o perfil metabólico sérico realizado por espectroscopia por RNM dos pacientes portadores de DRC em hemodiálise e compará-lo com as alterações ósseas encontradas nas biópsias ósseas relacionadas ao sistema de classificação TMV.

Secundários

Avaliar o perfil metabólico sérico realizado por espectroscopia por RNM dos pacientes portadores de DRC em hemodiálise e diálise peritoneal em comparação com um grupo controle com função renal normal pareados por sexo, idade e presença de diabetes.

Avaliar as vias metabólicas relacionadas com os perfis metabólicos encontrados e os possíveis mecanismos patofisiológicos associados.

3. MÉTODOS

3.1 Pacientes – Hemodiálise (HD)

Entre julho de 2011 e novembro de 2012, 51 pacientes em seguimento no Ambulatório de Distúrbios Mineral e Ósseo e em hemodiálise no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, foram convidados a participar do estudo intitulado “A Osteodistrofia Renal na Era da Obesidade: Papel da Leptina e da Síndrome Metabólica” (67).

Os critérios de inclusão foram: pacientes em seguimento no mínimo há seis meses no ambulatório, maiores de 18 anos, e que concordaram com a realização de biópsia óssea após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Todos realizavam 4 horas de sessão de hemodiálise, 3 vezes por semana, por no mínimo 6 meses.

Os critérios de exclusão foram: presença de neoplasia, hepatopatia avançada, uso de glicocorticóides, drogas imunomoduladoras ou antirretrovirais no mínimo há seis meses. Posteriormente, foram excluídos os pacientes em que o fragmento ósseo obtido através da biópsia não fornecia condições adequadas para avaliação histomorfométrica.

Os dados epidemiológicos (idade, raça, gênero), dados clínicos (doença renal de base, comorbidades, medicações e outros), avaliação antropométrica (peso e altura), bioquímica e hormonal, e a biópsia óssea foram realizados em um único momento do estudo.

As amostras de plasma e soro foram coletadas no momento da biópsia óssea realizada no dia livre de diálise e eram estocadas em alíquotas a -80°C. Foram dosados fósforo, cálcio total, paratormônio intacto (PTHi), fosfatase alcalina (FA), albumina, colesterol total e frações, triglicérides, glicemia e 25-hidroxivitamina D no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp em 2010 e registrado no Sistema Nacional de Ética em Pesquisas (SISNEP) com o número 3445-2010.

3.2 Pacientes – Diálise Peritoneal

Entre agosto de 2010 e setembro de 2012, 41 pacientes provenientes de um estudo transversal realizado pelo grupo foram submetidos à biópsia óssea e coleta de sangue (29).

Os critérios de inclusão foram: adultos entre 18 e 65 anos em tratamento dialítico [diálise peritoneal ambulatorial contínua (DPAC) ou diálise peritoneal automatizada (DPA)] há pelo menos 6 meses.

Os critérios de exclusão foram: pacientes tratados previamente com HD ou transplantados; paratireoidectomizados; acamados; usuários de imunossupressores, anticonvulsivantes ou drogas ilícitas; portadores de neoplasias malignas, síndrome da imunodeficiência humana adquirida, sarcoidose ou tuberculose.

Os parâmetros clínicos avaliados foram idade, sexo, raça, etiologia da doença renal, tempo em diálise, função renal residual e medicamentos em uso. Além disso, os dados antropométricos peso e altura (para cálculo do IMC) foram adquiridos através da análise de prontuários na ocasião da biópsia óssea.

Os parâmetros laboratoriais foram analisados em amostras de sangue, com um intervalo máximo de 2 semanas precedendo a biópsia de crista ilíaca. Parte da amostra coletada foi centrifugada e armazenada em alíquotas a -80°C. Os níveis séricos de cálcio total e iônico, fósforo, FA e albumina foram obtidos através de aparelho automatizado Sinnova SX400. O PTHi foi analisado pela técnica de quimioluminescência (Medlab, USA, valor de referência: 16-87pg/mL), assim como a 25-hidroxivitamina D (quimioluminescência, Dia-SorinTM, USA, valor de referência: 30-100ng/mL). Os níveis séricos da glicemia de jejum, colesterol total e frações e triglicerídeos foram obtidos através de técnicas padronizadas.

Os perfis metabólicos (descritos a seguir) foram realizados utilizando as alíquotas armazenadas a -80°C; porém, não foi possível obter o perfil de 1 paciente (por amostra insuficiente para a análise), totalizando dessa forma 40 metabolomas.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HCFMUSP sob número 0046/08.

3.3 Grupo Controle (Projeto Corações de Baependi)

Os indivíduos escolhidos para o grupo controle foram selecionados do projeto Herdabilidade de fenótipos metabólicos em uma população brasileira (68), um estudo metabolômico desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, vinculado ao Projeto Corações de Baependi. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP (processo 3759/12/015) e teve apoio da FAPESP (2012/12042-7).

O Projeto Corações de Baependi é um estudo epidemiológico genético de caráter longitudinal para analisar os fatores de risco da doença cardiovascular. Todos os participantes moram em Baependi, uma cidade localizada no estado de Minas Gerais, Brasil. Os primeiros participantes foram randomicamente selecionados e, em seguida, todos os parentes destes primeiros (pais, irmãos, avós, bisavós, netos, tios, sobrinhos, primos de primeiro e segundo graus) foram convidados a participarem do estudo. Atualmente, participam deste projeto 2.279 indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos e que estão distribuídos em 125 famílias. No posto de atendimento, os participantes foram recebidos por técnicos devidamente treinados, responderam um questionário para coleta de informações sobre histórico familiar, características sociodemográficas, histórico médico (incluindo presença ou ausência de diabetes mellitus) e de hábitos de vida como tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, atividades físicas, uso de medicamentos e dieta alimentar. Também foram realizados exame físico (pressão arterial sistólica e diastólica, altura, peso, circunferência de pescoço e abdominal), coleta de fenótipos cardiovasculares complexos, dosagens de colesterol total e frações, triglicérides, glicemia, creatinina e hemoglobina glicosilada. As amostras de soro coletadas foram devidamente processadas e armazenadas a -80°C.

Para o estudo Herdabilidade de fenótipos metabólicos em uma população brasileira foram utilizadas aproximadamente 1.500 amostras de indivíduos com idade superior a 18 anos participantes do Projeto Corações de Baependi. Para a determinação do perfil metabólico através de RMN, foram utilizadas as

amostras de soro em jejum armazenadas a -80°C no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor, após transporte em condições ideais, durante o período de fevereiro de 2011 a dezembro de 2011. Os participantes foram separados em dois grupos: diabéticos e não diabéticos. A classificação foi realizada baseando-se em informações obtidas via questionário e mensuração de glicose (teste bioquímico), sendo classificados como diabéticos aqueles indivíduos com concentração de glicose superior a 126mg/dL , diabetes auto relatada e/ou uso de medicamento hipoglicemiante. Os demais participantes foram classificados como não diabéticos.

Selecionamos 91 perfis metabólicos de indivíduos com função renal normal (definida pela TFG estimada acima de 60mL/min/1,73m^2), pareados 1 a 1 por sexo, idade e presença de diabetes, com os pacientes do grupo hemodiálise “Protocolo Regulação óssea pela Leptina” (51 indivíduos) e do grupo diálise peritoneal (40 indivíduos). Porém, não foi possível parear 2 pacientes diabéticos no grupo HD e 3 pacientes diabéticos no grupo DP por discrepância de sexo, sendo então estes indivíduos excluídos das análises pareadas.

3.4 Biópsia Óssea e Histomorfometria

A biópsia óssea foi realizada na crista ilíaca com trefina elétrica com diâmetro interno de 7 mm, sob anestesia local com lidocaína 2% e sedação com midazolam (5 a 15mg intramuscular). Os pacientes receberam previamente 2 cursos de tetraciclina, na dose de 500mg de 12h/12h por 3 dias, separados por 10 dias livres de medicamento; a biópsia foi realizada de 2 a 5 dias após o término do antibiótico. A biópsia óssea foi processada com técnica padronizada que permite analisar o tecido sem descalcificação prévia (69).

A análise histomorfométrica foi realizada empregando-se método semi-automatizado com o *software Osteomeasure* (Osteometrics Inc., Atlanta, GA, USA).

Os resultados da histomorfometria óssea foram analisados quanto à remodelação, mineralização e ao volume ósseo [classificação TMV (T = *turnover* = remodelação, M = mineralização, V = volume)] de acordo com a descrição de Moe et al. (5). Considerou-se a remodelação normal quando a taxa de formação

óssea (BFR/BS) era de $0,07 \pm 0,03 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$ para mulheres e $0,13 \pm 0,07 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$ para homens. Níveis mais baixos (menor que -1 desvio padrão da média do valor de referência) caracterizaram baixa remodelação e valores mais elevados (maior que +1 desvio padrão), alta remodelação óssea (70). O intervalo de mineralização (MLT) acima de 50 dias caracterizou defeito de mineralização. Considerou-se baixo volume ósseo os valores de BV/TV (volume ósseo trabecular por volume de tecido) inferiores a -1 desvio padrão da média do valor de referência ($21.8 \pm 7.2\%$ para mulheres e $24.0 \pm 6.1\%$ para homens) (71).

3.5 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para caracterização do perfil metabólico dos participantes, utilizou-se o Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Agilent, Inova AS de 600MHz com sonda criogênica, pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, o qual colaborou para o desenvolvimento deste estudo (figura 2). As aquisições e análises de dados foram realizadas em colaboração com os pesquisadores do Laboratório de Ressonância Magnética do Laboratório Nacional de Luz Sincontron.

Figura 2: Aparelho de RMN pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton.

Fonte: Foto do arquivo pessoal.

3.5.1 Preparo das amostras

As amostras de soro selecionadas passaram por um processo de desproteíntização para redução de proteínas de alto peso molecular e lipoproteínas existentes que geram interferência na análise pela espectroscopia

por RMN. Para isso, as amostras foram submetidas à técnica de ultrafiltração, procedimento considerado de alta reprodutibilidade e rápida execução que impede a produção de picos indesejados e proporciona a aquisição de espectros de alta qualidade para identificação e quantificação de metabólitos (72).

3.5.2 Preparo de amostras por ultrafiltração

Para a técnica de ultrafiltração foram utilizados dispositivos de ultrafiltração Amicon Ultra 0,5, membrana de celulose regenerada de 3000 Daltons, Millipore.

Para a preparação dos filtros e ultrafiltração das amostras adaptamos o protocolo descrito por Psychogios et al. (72). As membranas de filtro contendo cada uma 0,5mL de água milli-Q foram centrifugadas durante 30 minutos à 14000 rpm (4°C). Este processo foi repetido 4 vezes para que o glicerol residual ligado a membrana fosse removido. Após retirar a água residual da membrana, foram adicionados 350µL de amostra devidamente descongelada à 4°C, seguido de 2 horas de centrifugação refrigerada (4°C) à 12000 rpm.

Após ultrafiltração, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da análise por RMN.

3.5.3 Preparo das amostras para análise de RMN

Para análise pela técnica de RMN, foram utilizados 200µL de amostra ultrafiltrada (descongelada sob refrigeração à 4°C), 60µL de D₂O (água deuterada), 60µL de tampão de fosfato (1M de NaH₂PO₄ e 1M de Na₂HPO₄) com de TSP (5mM) e 280µL de água Milli-Q. Os 600µL resultantes foram adicionados em tubos de 5mm (Sigma-Aldrich, Wildmad® NMR tubes). Antes da inserção no aparelho, as amostras foram submetidas à centrifugação manual para a retirada de possíveis bolhas que poderiam causar dificuldades durante os ajustes no espectrômetro.

Mudanças nos valores de pH não acarretam problemas relacionados à aquisição do espectro em si. Porém, o pH está relacionado com o fenômeno de

deslocamento químico nos compostos analisados, o que pode tornar a identificação de metabólitos confusa ou enganosa.

O *software Chenomx* (utilizado na identificação e quantificação dos metabólitos) opera com duas bibliotecas de metabólitos dependentes do pH da amostra: uma ideal para amostras com pH entre 6-8 e outra para pH entre 4-9. A diferença fundamental entre elas é que esta última dá ao usuário uma maior liberdade no ajuste dos picos ao longo do espectro, podendo contribuir para qualificações e quantificações incorretas (“*mismatches*”). Optamos neste estudo por utilizar esta biblioteca de compostos de pH 4-9 para poder detectar o maior número de metabólitos possível.

Para manter o pH das amostras em aproximadamente 7,4, utilizamos o tampão fosfato com TSP como composto de referência de concentração durante a quantificação dos metabólitos.

3.5.4 Parâmetros para análise no espectrômetro de RMN

Os espectros foram adquiridos utilizando-se a sequência de pulsos “1Dpresat”, a 599,844 MHz. Foram realizados 256 *scans*, com intervalos entre *scans* (“*delays*”) de 1,5 segundos, janela de leitura de 13.3ppm, tempo de aquisição de 4 segundos e 298K de temperatura.

3.5.5 Ajustes no espectrômetro de RMN

Após a amostra ter sido inserida no espectrômetro, foi realizado um processo denominado *tunning* ou sintonia para ajustar a impedância do *probe*. Este processo é necessário para que não haja reflexão da energia aplicada pelo *probe* (The Australian National University NMR Centre, 2007 - <http://bloch.anu.edu.au/basics.html>).

Na sequência, realizou-se o *locking*, um mecanismo que utiliza bobinas do aparelho de RMN para tentar compensar eventuais flutuações na geração de seu campo magnético, deixando-o mais estável. O ajuste foi feito manualmente, tendo como referência a resposta do sinal de deutério proveniente da D₂O (ocorre o ajuste da força do campo magnético mantendo assim o sinal do

Deutério na frequência de referência). Posteriormente, procedeu-se ao ajuste do *shimming* com um conjunto de bobinas que envolvem a amostra a ser analisada. Neste passo, ocorre o ajuste do campo magnético para produzir um campo homogêneo através da amostra. Seu ajuste foi realizado parte manual e parte automaticamente.

A supressão do sinal da água foi necessária uma vez que este pode comprometer seriamente o espectro ao seu redor (73). Para determinar a frequência de saturação da água na sequência de pulsos “1Dpresat”, realizou-se uma série de experimentos de saturação concatenados, onde várias frequências são testadas até determinação daquela para qual o sinal da água seja o menor possível, sendo esta, a frequência de saturação da água mais apropriada para o experimento.

3.5.6 Tratamento dos dados no *software Chenomx*

Na primeira etapa de tratamento dos dados (*Chenomx processor*), todos os dados obtidos foram faseados, as linhas de base corrigidas e os metabólitos identificados e quantificados manualmente em cada amostra de soro utilizando-se o *software Chenomx NMR Suite 7.6* (Chenomx Inc, Edmonton, Alberta, Canadá), um *software* de ajuste espectral comercial contendo uma biblioteca de referência do espectro de RMN de 312 compostos.

Primeiramente, observou-se a linha de base do espectro, a qual deveria encontrar-se achatada e simetricamente disposta nas bases dos picos. Em caso negativo, procedeu-se ao ajuste de fase do espectro. Seguiu-se ao ajuste da linha de base, o qual é necessário para que a mesma fique o mais próximo possível de uma reta horizontal, não “invadindo” quaisquer picos do espectro, evitando assim, eventuais sub ou superestimativas das concentrações dos compostos.

Em seguida, realizou-se a deconvolução da referência, ou seja, o ajuste do sinal da referência do espectro (neste caso do TSP), aprimorando sua resolução e simetria, sendo então utilizado como referência na quantificação dos outros compostos.

3.5.7 Determinação do perfil metabólico (*Chenomx Profiling*)

Nesta segunda etapa de tratamento dos dados, realizou-se a análise qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes na amostra.

Após escolha da biblioteca de compostos (neste caso a de pH 4-9), encaixamos os espectros dos metabólitos da biblioteca de compostos um a um ao espectro de RMN obtido da amostra. Ao ajustar o espectro de um metabólito para “encaixá-lo” adequadamente, o *software* calcula de modo automático a sua concentração na amostra a partir da área do pico de referência interna (neste caso do TSP), cuja concentração é conhecida.

3.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e desvios padrão ou mediana e percentil 25 e 75 para variáveis com distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente. A distribuição normal foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

A análise estatística foi realizada no *software* SPSS versão 25.0. Os parâmetros clínicos e bioquímicos foram comparados utilizando o chi-quadrado, teste t ou teste de Mann-Whitney. Todos os testes eram bi-caudais e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Na análise dos pacientes em hemodiálise e diálise peritoneal pareados com um grupo controle com função renal normal, as análises metabólicas foram realizadas utilizando o *MetaboAnalyst* 3.0 (www.metaboanalyst.ca). Os valores dos metabólitos devem ser números não negativos e todos os valores faltantes ou zeros foram substituídos por valores pequenos (metade do valor positivo mínimo para cada metabolito), o que ocorreu em 4,1% das amostras no grupo HD e 4,4% no grupo DP. O pressuposto desta abordagem é que a maioria dos valores faltantes são causados por metabólitos de baixa abundância e não por metabólitos ausentes. Os metabólitos foram então log-transformados e pareto escalonados (médio-centrado e dividido pela raiz quadrada do desvio padrão de cada variável). Diferentes metabólitos entre os grupos (HD versus controles e DP versus controles) foram identificados através do teste de Wilcoxon após o

ajuste para comparação múltipla com FDR (taxa de descoberta falsa) menor que 0,05. As análises multivariadas foram feitas utilizando a Análise por Componentes Principais (PCA) e a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). Por fim, a análise das vias metabólicas foi realizada usando metabólitos selecionados com aplicação do teste hipergeométrico.

Na análise do perfil metabólico dos pacientes em hemodiálise comparada com as alterações ósseas encontradas nas biópsias ósseas, as análises metabólicas também foram realizadas utilizando o *MetaboAnalyst* 3.0 com 0,7% de valores ausentes que foram substituídos pela metade do valor positivo mínimo da distribuição da amostra. Os metabólitos foram transformados em log (transformação de log generalizada) e avaliados primeiro por meio da Análise por Componentes Principais (PCA) que mostrou 5 *outliers* extremos. Estes foram excluídos, restando 46 participantes para a análise remanescente. Em seguida, realizamos a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e teste t de acordo com a classificação TMV supracitada. Os metabólitos selecionados foram então reavaliados em modelos de regressão logística univariáveis e multivariáveis. As curvas de características operacionais (curvas ROC) foram construídas para avaliar o desempenho dos metabólitos selecionados na identificação da classificação do TMV em comparação com os modelos baseados em variáveis clínicas e/ou laboratoriais relacionadas ao fenótipo ósseo utilizando estatística C. Todos os testes foram bi-caudais e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes, sem ajuste para comparações múltiplas. Os testes PCA, PLS-DA e teste t foram realizados usando o *MetaboAnalyst* 3.0. A análise descritiva do dados clínicos e dos modelos de regressão logística foi realizada no programa SPSS 25.0. As plotagens de caixa e as curvas ROC foram feitas usando o R (*packages ggplot2, pROC*).

4. RESULTADOS

4.1 Metaboloma

Neste estudo foram identificados e quantificados 64 metabólitos em cada indivíduo através do *software Chenomx NMR Suíte 7.6*: 2-Aminobutirato, 2-Hidroxibutirato, 2-Hidroxi-isobutirato, 2-Hidroxi-isovalerato, 2-Hidroxivalerato, 3-Hidroxibutirato, 3-Hidroxi-isovalerato, 5-Aminolevulinato, Acetato, Acetona, Alanina, Asparagina, Betaina, Cafeína, Carnitina, Colina, Citrato, Creatina, Creatina-fosfato, Creatinina, Dimetil Sulfona, Dimetilamina, Etanol, Fenilalanina, Formato, Fucose, Glicose, Glutamina, Glicerol, Glicina, Glicolato, Guanidoacetato, Histidina, Isobutirato, Isoleucina, Lactato, Leucina, Lisina, Malonato, Metanol, Metionina, Metilamina, Mio-Inositol, N-Acetilornitina, N-Isovalerilglicina, N-Metil-hidantoína, N,N-Dimetilglicina, O-Acetilcarnitina, Ornitina, Oxipurinol, Prolina, Propilenoglicol, Piruvato, Succinato, Treonato, Treonina, Trigonelina, Trimetilamina, Trimetilamina N-Óxido, Tirosina, Uréia, Valina, Xantina, π -Metil-histidina (ou 1-Metil-histidina).

Na tabela 1 encontram-se as medianas e os percentis 25 e 75 dos 64 metabólitos dosados dos 3 grupos avaliados.

Tabela 1: Mediana, percentis 25 e 75 dos 64 metabólitos em cada grupo analisado.

Metabólitos (mg/dL)	Hemodiálise	Diálise Peritoneal	Controles
2-Aminobutirato	0,05 (0,0407 - 0,0613)	0,03635 (0,0302 - 0,047)	0,0634 (0,0523 - 0,0745)
2-Hidroxibutirato	0,122 (0,104 - 0,173)	0,0838 (0,0627 - 0,1031)	0,1417 (0,1114 - 0,1744)
2-Hidroxi-isobutirato	0,0117 (0,0093 - 0,0159)	0,0173 (0,0154 - 0,022)	0,0064 (0,0041 - 0,008)
2-Hidroxi-isovalerato	0,0249 (0,0175 - 0,0391)	0,02155 (0,0164 - 0,031)	0,0378 (0,0292 - 0,0573)
2-Hidroxivalerato	0,1379 (0,1042 - 0,1663)	0,0974 (0,0707 - 0,1186)	0,0319 (0,0263 - 0,0418)
3-Hidroxibutirato	0,2098 (0,1119 - 0,448)	0,11 (0,0724 - 0,1764)	0,1539 (0,0949 - 0,2402)
3-Hidroxi-isovalerato	0,0152 (0,0123 - 0,0189)	0,01165 (0,0093 - 0,014)	0,0082 (0,0068 - 0,0105)
5-Aminolevulinato	0,1396 (0,0989 - 0,1689)	0,1603 (0,1199 - 0,2256)	0
Acetato	0,1326 (0,0956 - 0,189)	0,0699 (0,0602 - 0,0895)	0,098 (0,0742 - 0,1212)
Acetona	0,0105 (0,0067 - 0,0178)	0,0054 (0,0046 - 0,0069)	0,0091 (0,0069 - 0,0171)
Alanina	1,2806 (0,9727 - 1,4731)	1,2814 (1,0968 - 1,5835)	1,6363 (1,3592 - 1,8303)
Asparagina	0,2735 (0,2269 - 0,312)	0,2514 (0,206 - 0,289)	0,2631 (0,2225 - 0,2981)
Betaina	0,2983 (0,2431 - 0,3946)	0,2652 (0,2204 - 0,3115)	0,1909 (0,1532 - 0,2391)
Cafeína	0,0805 (0,0628 - 0,104)	0,07415 (0,0503 - 0,1023)	0
Carnitina	0,1537 (0,1234 - 0,1867)	0,21455 (0,1786 - 0,251)	0,2589 (0,2074 - 0,2951)
Colina	0,1297 (0,0986 - 0,1556)	0,1049 (0,0777 - 0,1394)	0,056 (0,0475 - 0,0681)
Citrato	1,3065 (0,9855 - 1,7321)	1,1297 (0,8669 - 1,272)	1,2189 (1,0659 - 1,4435)
Creatina	0,1299 (0,0961 - 0,2274)	0,08615 (0,0607 - 0,1949)	0,1232 (0,0843 - 0,2042)
Creatina-fosfato	0,272 (0,2346 - 0,334)	0,2448 (0,1981 - 0,3172)	0,057 (0,0408 - 0,071)
Creatinina	3,1384 (2,2119 - 3,7222)	2,358 (1,5129 - 4,0447)	0,3012 (0,266 - 0,3348)
Dimetil Sulfona	0,0315 (0,0246 - 0,0459)	0,0396 (0,0244 - 0,0568)	0,0237 (0,0171 - 0,0332)
Dimetilamina	0,042 (0,0369 - 0,0494)	0,028 (0,0188 - 0,0474)	0,003 (0,0026 - 0,0036)
Etanol	0,6919 (0,538 - 0,8806)	0,25565 (0,2143 - 0,2773)	0,6986 (0,3939 - 1,178)
Fenilalanina	0,5136 (0,3948 - 0,5775)	0,37705 (0,2974 - 0,5169)	0,3974 (0,3488 - 0,4719)
Formato	0,0632 (0,0537 - 0,073)	0,0491 (0,0437 - 0,0567)	0,0247 (0,0197 - 0,0296)
Fucose	0,1279 (0,1138 - 0,1572)	0,11625 (0,0792 - 0,1409)	0,0247 (0,0195 - 0,0348)
Glicose	37,77 (31,48 - 50,34)	35,46 (33,09 - 51,58)	34,28 (30,40 - 40,97)
Glutamina	3,0173 (2,4951 - 3,4252)	2,723 (2,4381 - 3,0455)	2,7125 (2,4154 - 3,1656)
Glicerol	0,6588 (0,5514 - 0,8027)	0,61095 (0,5429 - 0,706)	1,2527 (0,7822 - 1,7583)
Glicina	1,0926 (0,7407 - 1,3308)	0,9374 (0,7393 - 1,1747)	0,9483 (0,7629 - 1,0997)
Glicolato	0,0772 (0,0636 - 0,1001)	0,06045 (0,044 - 0,0749)	0,0418 (0,0329 - 0,0518)
Guanidoacetato	0,1955 (0,1504 - 0,3434)	0,1654 (0,1358 - 0,2288)	0,0633 (0,0526 - 0,0905)
Histidina	0,4607 (0,3823 - 0,4994)	0,40685 (0,3719 - 0,4906)	0,5215 (0,4734 - 0,5836)
Isobutirato	0,0207 (0,0174 - 0,028)	0,0177 (0,014 - 0,0229)	0,0185 (0,0149 - 0,0238)
Isoleucina	0,2823 (0,2335 - 0,3663)	0,26675 (0,2069 - 0,3225)	0,3645 (0,3048 - 0,4295)

Lactato	5,9518 (4,6195 - 7,7714)	4,98765 (3,4381 - 6,9151)	9,0579 (7,2152 - 11,1501)
Leucina	0,5134 (0,4044 - 0,5998)	0,3912 (0,3305 - 0,4454)	0,73 (0,6234 - 0,8185)
Lisina	0,6788 (0,5805 - 0,8083)	0,7131 (0,6148 - 0,8089)	0,9838 (0,8355 - 1,0634)
Malonato	0,1102 (0,0837 - 0,1224)	0,10315 (0,0883 - 0,114)	0,0381 (0,0332 - 0,0458)
Metanol	0,1938 (0,1615 - 0,2477)	0,2371 (0,2074 - 0,3141)	0,1008 (0,0701 - 0,2147)
Metionina	0,1238 (0,1049 - 0,1405)	0,11245 (0,0872 - 0,131)	0,1512 (0,1296 - 0,164)
Metilamina	0,0033 (0 - 0,0046)	0 (0 - 0,0029)	0,0037 (0,003 - 0,0048)
N,N-Dimetilglicina	0,0277 (0,0230 - 0,0364)	0,0266 (0,017 - 0,0338)	0,0109 (0,0084 - 0,0135)
N-Acetilornitina	0,1724 (0,1495 - 0,192)	0,11205 (0,0968 - 0,1349)	0,0534 (0,0471 - 0,0642)
N-Isovalerylglucina	0,0561 (0,0499 - 0,0687)	0,0537 (0,0467 - 0,0638)	0,0627 (0,0537 - 0,0736)
N-Metil-hidantoina	0,019 (0,0145 - 0,0229)	0,0216 (0,0154 - 0,0413)	0
O-Acetilcarnitina	0,0814 (0,059 - 0,0942)	0,08145 (0,0744 - 0,1018)	0,0542 (0,0446 - 0,0645)
Ornitina	0,2916 (0,2308 - 0,3565)	0,23275 (0,1939 - 0,2854)	0,3491 (0,2801 - 0,4239)
Oxipurinol	0,4772 (0,3467 - 0,5798)	0,48225 (0,3104 - 0,6819)	0,2521 (0,045 - 0,4201)
Prolina	1,1534 (0,8749 - 1,4629)	0,96185 (0,7592 - 1,2657)	0,7484 (0,6195 - 0,908)
Propilenoglicol	0,0357 (0,0289 - 0,0426)	0,02885 (0,0242 - 0,034)	0,0506 (0,0455 - 0,0614)
Piruvato	0,1978 (0,1439 - 0,258)	0,14175 (0,073 - 0,2549)	0,1424 (0,09 - 0,2219)
Succinato	0,0422 (0,0376 - 0,0546)	0,03725 (0,031 - 0,045)	0,0504 (0,0466 - 0,0558)
Treonato	0,3618 (0,2566 - 0,4541)	0,265 (0,1716 - 0,3483)	0,092 (0,0707 - 0,1305)
Treonina	0,6741 (0,5546 - 0,8288)	0,61335 (0,5101 - 0,7937)	0,6022 (0,5301 - 0,7348)
Trigonelina	0,1012 (0,0629 - 0,1335)	0,08545 (0,0475 - 0,1039)	0
Trimetilamina	0,0033 (0,0029 - 0,0039)	0,0035 (0,0029 - 0,0049)	0,002 (0,0014 - 0,0037)
Trimetilamina N-Óxido	0,1893 (0,1221 - 0,251)	0,1517 (0,0976 - 0,2138)	0,0375 (0,0290 - 0,0526)
Tirosina	0,3408 (0,2981 - 0,4154)	0,291 (0,2507 - 0,3322)	0,5239 (0,4606 - 0,6288)
Uréia	6,8877 (5,0578 - 8,5679)	7,37135 (5,2193 - 9,7454)	2,045 (1,7749 - 2,3977)
Valina	0,8491 (0,6487 - 1,0137)	0,68245 (0,594 - 0,8377)	1,1781 (1,0271 - 1,3437)
Xantina	0,1542 (0,0912 - 0,2437)	0,138 (0,0803 - 0,2619)	0,0417 (0,0289 - 0,0553)
Mio-Inositol	2,0235 (1,4541 - 2,8517)	1,46965 (1,0082 - 2,3082)	0,1941 (0,1669 - 0,2234)
τ-Metil-histidina	0,1771 (0,1366 - 0,2032)	0,1806 (0,1347 - 0,2268)	0

Na figura 3, encontra-se parte do espectro de um paciente. A análise e quantificação de cada metabólito foi feita manualmente, como mostram as figuras 4 e 5.

Figura 3: Parte do espectro (antes da quantificação) e da biblioteca de compostos do software *Chenomx NMR Suíte 7.6*.

Fonte: software *Chenomx NMR Suíte 7.6*.

Figura 4: Exemplo de identificação e quantificação do espectro do composto fenilalanina (de uma das suas porções) pelo software *Chenomx NMR Suíte 7.6*.

Fonte: software *Chenomx NMR Suíte 7.6*.

Figura 5: espectro com parte dos compostos identificados e quantificados neste estudo utilizando o *software Chenomx NMR Suíte 7.6*.

Fonte:

software Chenomx NMR

Suíte

7.6.

4.2 Comparação do perfil metabólico de pacientes em hemodiálise e diálise peritoneal com grupo controle

A tabela 2 mostra os dados descritivos das duas populações em diálise e seus respectivos controles pareados. Além da exclusão das análises pareadas de 2 pacientes diabéticos no grupo HD e 3 pacientes diabéticos no grupo DP por discrepância de sexo citada anteriormente, foi excluído mais 1 paciente do grupo HD (*outlier* extremo), totalizando 48 pacientes no grupo HD, 37 pacientes no grupo DP e 85 pacientes do grupo controle.

Tabela 2: características clínicas e laboratoriais dos pacientes dos grupos hemodiálise, diálise peritoneal e seus controles pareados.

	Hemodiálise (HD)			Diálise Peritoneal (DP)		
	48 casos	48 controles	<i>p</i>	37 casos	37 controles	<i>p</i>
Idade (anos)	54 (14)	54 (14)	0,98	50 (10)	50 (10)	0,8
Homem	24 (50%)	24 (50%)	1,0	19 (51,4%)	19 (51,4%)	1,0
Branços	30 (62,5%)	40 (83,3%)	0,02*	9 (24,3%)	29 (78,4%)	<0,001*
Diabetes	20 (41,7%)	20 (41,7%)	1,0	14 (37,8%)	14 (37,8%)	1,0
HAS	13%			15%		
Tempo em HD (meses)	52 (25 - 99)	-		10 (7 - 24)		
IMC (kg/m ²)	27,1 (5,9)	26,7 (4,7)	0,86	26,7 (5,1)	28,7 (7,3)	0,59
Creatinina (mg/dL)		0,8 (0,2)			0,82 (0,13)	
Albumina (g/dL)	3,8 (0,5)			3,5 (0,6)		
Cálcio (mg/dL)	9,2 (1,2)			8,7 (0,7)		
Fósforo (mg/dL)	5,9 (2,1)			5,1 (1,8)		
PTHi (pg/mL)	790 (340 - 1635)			355 (241 - 594)		
Fosfatase alcalina (U/L)	175 (100 - 260)			99 (87 - 129)		
25-hidroxivitamina D (ng/mL)	29 (11)			13 (7)		
Glicemia (mg/dL)	98 (78-151)	98 (89,5 - 122)	0,69	88 (77 - 248)	95 (87 - 99)	0,95
HbA1C (%)		6,3 (1,3)		9,2 (2,7)	6,3 (1,2)	0,01*
Colesterol total (mg/dL)	139 (31)	196 (42)	<0,001*	178 (53)	193 (33)	0,03*
LDL-colesterol (mg/dL)	66 (26)	122 (32)	<0,001*	96 (42)	121 (28)	0,005*
HDL-colesterol (mg/dL)	44 (17)	46 (11)	0,19	44 (17)	43 (10)	0,48
Triglicérides (mg/dL)	116 (92-204)	119 (89-171)	0,75	208 (144 - 264)	123 (101 - 150)	0,01*
std KtV	1,4 (0,3)			2,45 (0,78)		

HAS, hipertensão arterial sistêmica; IMC, índice de massa corporal; PTHi, paratormônio intacto; HbA1C, hemoglobina glicosilada; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; std KtV, *standard* Kt/V. Valores apresentados em números absolutos e porcentagem, média e desvio padrão e mediana e percentil 25 e 75. **p*< 0.05

Como esperado, com exceção dos critérios de pareamento, os pacientes em diálise eram muito diferentes de seus controles pareados. Além disso, é importante notar que a população em DP era relativamente recente no tratamento de diálise, enquanto os pacientes em HD tinham tempo em diálise mais longo (mediana de 4,3 anos).

Fizemos uma análise de todo o metaboloma comparando os casos com seus controles utilizando o programa *MetaboAnalyst* 3.0. Substituímos todos os valores de metabólitos iguais a zero pela metade dos valores positivos mínimos dos dados originais (assumindo que este seria o limite de detecção da análise) e normalizamos os metabólitos (log-natural e pareto escalonados) para torná-los mais comparáveis, como descrito anteriormente. Primeiramente, fizemos a análise por PCA (análise por componentes principais), uma análise multivariada não supervisionada que reduz o número de dados em um número menor de variáveis e identifica as direções que melhor explicam a variação entre os grupos. As figuras 6 e 7 mostram a análise por PCA para as 2 populações de diálise e seus controles com uma visão geral dos vários padrões de separação entre os componentes principais mais significativos.

Figura 6: Análise por PCA dos 48 pacientes em HD (em vermelho) em comparação com seus controles pareados (em verde). A variância de cada componente principal é mostrada na célula diagonal correspondente.

O primeiro componente (PC 1) tem a maior variância e é o que melhor separa os grupos analisados.

Figura 7: Análise por PCA dos 37 pacientes em DP (em vermelho) em comparação com seus controles pareados (em verde). A variância de cada componente principal é mostrada na célula diagonal correspondente.

O primeiro componente (PC 1) tem a maior variância e é o que melhor separa os grupos analisados.

Como pode ser visto, o primeiro componente de ambas as figuras tem um bom desempenho na explicação da variabilidade e os grupos podem ser separados muito claramente. Como esperado, considerando os resultados mostrados por PCA, o primeiro componente no PLS-DA também discriminou bem os dois grupos (figuras 8 e 9). O PLS-DA (análise discriminante por mínimos quadrados parciais) é um método supervisionado que utiliza técnicas de regressão multivariada para extrair, através da combinação linear das variáveis originais, a informação que pode prever a associação das classes.

Figura 8: Análise por PLS-DA dos 48 pacientes em HD (em vermelho) em comparação com seus controles pareados (em verde). A variância de cada componente principal é mostrada na célula diagonal correspondente.

O primeiro componente (1) tem a maior variância e é o que melhor separa os grupos analisados.

Figura 9: Análise por PLS-DA dos 37 pacientes em DP (em vermelho) em comparação com seus controles pareados (em verde). A variância de cada componente principal é mostrada na célula diagonal correspondente.

O primeiro componente (1) tem a maior variância e é o que melhor separa os grupos analisados.

Existe uma medida de importância variável no PLS-DA chamada importância variável na projeção (VIP). A VIP é uma soma ponderada de quadrados das cargas PLS levando em consideração a quantidade de variação Y explicada em cada dimensão. As pontuações VIP são calculadas para cada componente separado e mostram o quanto cada variável contribui na separação dos grupos. Consideramos significativos os metabólitos com medidas VIP acima de 1,5. A classificação do escore VIP do primeiro componente dos grupos HD e PD é apresentada na figura 10 e a lista de metabólitos é semelhante para ambos os grupos, com 1-metil-histidina, trigonelina, 5-aminolevulinato, cafeína, N-metil-hidantoína, dimetilamina, creatinina e mio-inositol.

Figura 10: Escore VIP do primeiro componente dos 48 pacientes em HD em comparação com seus controles pareados (NL).

Figura 11: Escore VIP do primeiro componente dos 37 pacientes em DP em comparação com seus controles pareados (NL).

Em seguida, avaliamos os metabólitos que mostraram diferentes concentrações (normalizadas) entre os grupos de diálise e seus controles após o ajuste para comparações múltiplas (tabela 3). Havia 51 metabólitos significativamente diferentes no grupo HD em relação aos seus controles pareados e 56 metabólitos diferentes entre os pacientes com DP e seus controles.

Tabela 3: Metabólitos com concentrações normalizadas (mediana, percentil 25 e 75) significativamente diferentes entre 48 pacientes em HD e 37 em DP e seus controles pareados.

Metabólitos	HD	Controles	p	FDR
Creatinina	1,3552 (0,9715 a 1,544)	-1,2594 (-1,3859 a 1,1445)	3,11E-28	1,99E-26
Uréia	0,9463 (0,5152 a 1,246)	-0,8239 (-1,0782 a -0,5926)	1,24E-27	3,98E-26
Trigonelina	2,1005 (1,8046 a 2,3029)	-1,9499 (-1,9499 a -1,9499)	7,14E-19	1,52E-17
1-Metil-histidina	1,9484 (1,7716 a 2,0467)	-2,3669 (-2,3669 a -2,3669)	1,54E-18	2,46E-17
Cafeína	1,6533 (1,4569 a 1,8216)	-2,4058 (-2,4058 a -2,4058)	1,35E-17	1,73E-16
N-Metil-hidantoina	1,4576 (1,2044 a 1,6059)	-2,0827 (-2,0827 a -0,0351)	2,23E-17	2,07E-16
5-Aminolevulinato	1,7933 (1,5611 a 1,924)	-2,4657 (-2,4657 a -2,4657)	2,30E-17	2,07E-16
Dimetilamina	1,3759 (1,2454 a 1,5427)	-1,3458 (-1,5498 a -1,1473)	3,20E-17	2,07E-16
Malonato	0,8393 (0,3982 a 0,9883)	-0,8244 (-1,0501 a -0,5384)	3,23E-17	2,07E-16
mio-Inositol	1,2691 (0,9528 a 1,6382)	-1,2536 (-1,4066 a -1,1192)	3,23E-17	2,07E-16
N-Acetilornitina	0,919 (0,7173 a 1,0803)	-0,9369 (-1,0694 a -0,6164)	4,70E-17	2,74E-16
Tirosina	-0,5219 (-0,8252 a -0,2242)	0,4441 (0,2882 a 0,8225)	5,45E-17	2,91E-16
Creatino fosfato	0,9998 (0,796 a 1,253)	-1,0489 (-1,451 a -0,7576)	1,48E-16	7,27E-16
N,N-Dimetilglicina	0,6885 (0,33 a 1,1201)	-0,7089 (-1,2153 a -0,3776)	2,89E-16	1,32E-15
Trimetilamina N-óxido	1,0779 (0,5372 a 1,4258)	-0,9656 (-1,2352 a -0,564)	5,30E-16	2,26E-15
Treonato	0,9214 (0,4559 a 1,2186)	-0,8862 (-1,3157 a -0,3733)	6,95E-16	2,78E-15
Fucose	1,0157 (0,8614 a 1,2574)	-1,0507 (-1,3251 a -0,6951)	7,83E-16	2,95E-15
Colina	0,7248 (0,256 a 1,0132)	-0,7695 (-1,0059 a -0,3837)	2,35E-15	8,36E-15
Formato	0,7425 (0,4834 a 0,9779)	-0,8164 (-1,0866 a -0,4805)	2,31E-14	7,79E-14
2-Hidroxisvalerato	0,9926 (0,6219 a 1,2361)	-0,9875 (-1,2167 a -0,634)	5,11E-14	1,63E-13
Xantina	0,9593 (0,4921 a 1,3778)	-0,1786 (-0,6023 a 0,042)	7,81E-14	2,38E-13
Guanidoacetato	0,4363 (0,1067 a 1,1992)	-0,9904 (-1,1636 a -0,4596)	1,11E-13	3,24E-13
Carnitina	-0,4631 (-0,8567 a 0,0115)	0,5524 (0,1453 a 0,7427)	3,88E-13	1,08E-12
Glicolato	0,5899 (0,233 a 1,0425)	-0,5553 (-1,0678 a -0,1165)	1,05E-11	2,79E-11
Glicerol	-0,5848 (-0,8497 a -0,2103)	0,6899 (-0,0796 a 1,2403)	2,68E-11	6,86E-11
3-Hidroxi-isovalerato	0,4428 (0,0422 a 0,791)	-0,5687 (-0,912 a -0,1281)	3,84E-11	9,45E-11
Leucina	-0,3644 (-0,9383 a -0,0456)	0,426 (0,1304 a 0,6858)	7,48E-11	1,77E-10
Propileno glicol	-0,4543 (-0,9059 a -0,1485)	0,4701 (0,163 a 0,7538)	1,03E-10	2,34E-10
Valina	-0,3694 (-0,9624 a 0,0576)	0,4407 (0,1678 a 0,6995)	1,25E-10	2,75E-10
Lisina	-0,3791 (-0,7293 a 0,016)	0,4423 (0,0465 a 0,5821)	5,54E-10	1,18E-09
Lactato	-0,3813 (-0,8919 a 0,1788)	0,4258 (0,0736 a 0,7336)	2,28E-08	4,70E-08
2-Hidroxi-isobutirato	0,5067 (0,2016 a 0,9168)	-0,3523 (-0,6979 a -0,0395)	1,52E-07	3,03E-07
Betaina	0,4436 (0,0151 a 0,9337)	-0,3673 (-0,8029 a 0,0636)	1,96E-07	3,81E-07
Alanina	-0,1500 (-0,7328 a 0,1703)	0,3769 (0,0879 a 0,652)	5,49E-07	1,03E-06
Prolina	0,3935 (-0,1616 a 0,8527)	-0,3303 (-0,6488 a -0,0173)	7,24E-07	1,32E-06
Histidina	-0,0998 (-0,5783 a 0,0998)	0,247 (0,0179 a 0,5229)	4,57E-06	8,13E-06
O-Acetilcarnitina	0,4479 (-0,1966 a 0,7609)	-0,279 (-0,7187 a 0,0491)	1,49E-05	2,57E-05
Isoleucina	-0,3121 (-0,7466 a 0,0852)	0,3082 (-0,074 a 0,6787)	2,36E-05	3,97E-05
Metanol	0,3125 (-0,0199 a 0,713)	-0,6591 (-1,1328 a 0,2235)	4,40E-05	7,23E-05
Acetato	0,2739 (-0,3115 a 0,967)	-0,3458 (-0,7237 a 0,1391)	7,83E-05	0,0001
Metionina	-0,1715 (-0,5607 a 0,0882)	0,2927 (-0,1278 a 0,4913)	8,07E-05	0,0001
2-Hidroxi-isovalerato	-0,4609 (-1,0368 a 0,1827)	0,1117 (-0,2242 a 0,8098)	0,0002	0,0003
Fenilalanina	0,2747 (-0,3307 a 0,6458)	-0,2755 (-0,5416 a 0,2704)	0,0005	0,0007
Dimetil sulfona	0,1988 (-0,2559 a 0,8363)	-0,3508 (-0,8868 a 0,4053)	0,002	0,003

2-Aminobutirato	-0,225 (-0,7424 a 0,2269)	0,1968 (-0,2121 a 0,5892)	0,003	0,004
Ornitina	-0,2106 (-0,6825 a 0,2583)	0,2498 (-0,22 a 0,7471)	0,003	0,005
Succinato	-0,2236 (-0,4992 a 0,3482)	0,1619 (-0,0986 a 0,426)	0,006	0,008
Oxipurinol	0,8093 (0,6138 a 0,9521)	0,3985 (-2,4613 a 1,0564)	0,008	0,01
3-Hidroxibutirato	0,0341 (-0,7724 a 0,9974)	-0,5561 (-1,0065 a 0,2225)	0,02	0,02
N-Isovaleroilglicina	-0,2168 (-0,5549 a 0,2445)	0,1685 (-0,2487 a 0,4444)	0,03	0,04
Trimetilamina	0,2622 (0,0044 a 0,5252)	-0,2069 (-1,0641 a 0,6797)	0,03	0,03

Metabólitos	DP	Controles	p	FDR
Uréia	0,9403 (0,4616 a 1,3639)	-0,8152 (-0,9956 a -0,6895)	1,59E-19	1,02E-17
Leucina	-0,5705 (-0,9979 a -0,229)	0,6244 (0,3134 a 0,7927)	2,47E-16	7,89E-15
Trigonelina	2,1778 (1,7057 a 2,2958)	-2,0418 (-2,0418 a -2,0418)	2,68E-15	5,72E-14
1-Metil-histidina	2,0973 (1,871 a 2,2492)	-2,3554 (-2,3554 a -2,3554)	7,18E-15	1,15E-13
N-Metil-hidantoina	1,6151 (1,2037 a 2,0585)	-2,1258 (-2,1258 a -2,1258)	3,58E-14	4,29E-13
5-Aminolevulinato	1,6984 (1,5047 a 1,9289)	-2,823 (-2,823 a 0,583)	4,03E-14	4,29E-13
Dimetilamina	1,1188 (0,6761 a 1,7634)	-1,1735 (-1,3241 a -1,0418)	1,40E-13	1,01E-12
Creatinina	1,1065 (0,6052 a 1,7576)	-1,2151 (-1,3361 a -1,0585)	1,42E-13	1,01E-12
mio-Inositol	1,0669 (0,6809 a 1,7027)	-1,1603 (-1,3932 a -0,9979)	1,42E-13	1,01E-12
Malonato	0,679 (0,4493 a 0,8309)	-0,7582 (-0,9869 a -0,4776)	1,81E-13	1,16E-12
Trimetilamina N-óxido	0,8458 (0,2817 a 1,3243)	-0,9274 (-1,2593 a -0,434)	2,93E-13	1,71E-12
Cafeína	1,7528 (1,4426 a 1,9489)	-2,4368 (-2,4368 a -2,4368)	9,40E-13	4,76E-12
Creatino fosfato	0,9306 (0,6483 a 1,2645)	-0,8902 (-1,4064 a -0,662)	9,66E-13	4,76E-12
Fucose	0,9897 (0,589 a 1,2016)	-0,6324 (-0,992 a -0,3143)	1,05E-12	4,78E-12
2-Hidroxi-isobutirato	0,7841 (0,622 a 1,083)	-0,5485 (-1,2154 a -0,3362)	2,97E-12	1,27E-11
N-Acetilornitina	0,6161 (0,3654 a 0,9705)	-0,6342 (-0,8748 a -0,3587)	6,40E-12	2,56E-11
Valina	-0,485 (-0,9246 a -0,0562)	0,4778 (0,1997 a 0,9189)	2,12E-11	7,99E-11
Formato	0,524 (0,3286 a 0,7632)	-0,5639 (-1,146 a -0,382)	6,93E-10	2,46E-09
Colina	0,4878 (-0,0256 a 1,2014)	-0,5825 (-0,8374 a -0,3059)	1,40E-09	4,70E-09
Propileno glicol	-0,5161 (-0,8465 a -0,1976)	0,4379 (0,2942 a 0,6721)	1,61E-09	5,16E-09
Guanidoacetato	0,521 (0,2803 a 1,0095)	-0,7818 (-1,0104 a -0,3212)	2,49E-09	7,58E-09
Treonato	0,7592 (0,142 a 1,1759)	-0,7217 (-1,0205 a -0,264)	4,07E-09	1,19E-08
Xantina	0,7656 (0,2896 a 1,4165)	-0,1888 (-0,5177 a -0,0538)	6,40E-09	1,78E-08
Tirosina	-0,6601 (-0,8608 a -0,295)	0,477 (0,1745 a 0,8847)	6,85E-09	1,83E-08
Lisina	-0,3264 (-0,5757 a -0,0434)	0,3685 (0,0879 a 0,6049)	8,37E-09	2,14E-08
Succinato	-0,3891 (-0,8343 a -0,0092)	0,3781 (0,1675 a 0,4943)	1,04E-08	2,55E-08
Acetona	-0,7765 (-0,9717 a -0,413)	0,338 (-0,1419 a 1,3443)	4,07E-08	9,64E-08
2-Aminobutirato	-0,3416 (-0,6845 a 0,0156)	0,4623 (0,2116 a 0,6362)	4,23E-08	9,65E-08
Glicerol	-0,5382 (-0,8045 a -0,2384)	0,3084 (-0,1826 a 1,1483)	4,37E-08	9,65E-08
O-Acetilcarnitina	0,3633 (0,2248 a 0,8263)	-0,4575 (-0,7974 a -0,0853)	4,92E-08	1,05E-07
N,N-Dimetilglicina	0,7360 (0,0393 a 1,1208)	-0,6028 (-0,9729 a -0,341)	6,46E-08	1,33E-07
Metionina	-0,0597 (-0,4204 a 0,1365)	0,355 (0,2364 a 0,4833)	1,88E-07	3,76E-07
Trimetilamina	0,4904 (0,1292 a 0,9368)	-0,7524 (-1,1788 a -0,0327)	2,48E-07	4,81E-07
2-Hidroxibutirato	-0,3937 (-0,876 a -0,0546)	0,5528 (0,026 a 1,1194)	4,58E-07	8,61E-07
Lactato	-0,5267 (-1,1921 a 0,0386)	0,4193 (0,0419 a 0,8947)	6,44E-07	1,18E-06
Histidina	-0,3282 (-0,6052 a -0,0301)	0,2348 (0,0599 a 0,5113)	8,38E-07	1,49E-06
2-Hidroxivalerato	0,7343 (0,3168 a 1,0222)	-0,7409 (-1,0987 a -0,3377)	4,22E-06	7,30E-06
Betaina	0,4534 (0,0576 a 0,6847)	-0,3058 (-0,9121 a -0,0365)	5,76E-06	9,69E-06
Etanol	-0,4861 (-0,7387 a -0,3894)	0,6582 (-0,2066 a 1,3943)	1,08E-05	1,77E-05
Oxipurinol	0,8542 (0,5373 a 1,1292)	0,3129 (-0,3752 a 0,5385)	1,43E-05	2,29E-05

Metanol	0,4718 (0,2871 a 0,8543)	-0,7939 (-1,4758 a 0,5333)	2,09E-05	3,27E-05
Isoleucina	-0,2248 (-0,8014 a 0,1774)	0,388 (-0,0374 a 0,6446)	2,33E-05	3,56E-05
3-Hidroxi-isovalerato	0,3892 (-0,0201 a 0,7231)	-0,2542 (-0,6036 a 0,058)	2,86E-05	4,26E-05
Metilamine	-1,6953 (-1,6953 a -1,6953)	1,1172 (0,8724 a 1,3345)	3,84E-05	5,59E-05
Ornitina	-0,4102 (-0,7973 a 0,012)	0,3005 (-0,081 a 0,6198)	0,0001	0,0002
Prolina	0,2727 (-0,1686 a 0,7896)	-0,4491 (-0,6654 a -0,1357)	0,0002	0,0003
2-Hidroxi-isovalerato	-0,4826 (-0,7363 a 0,0583)	0,2539 (-0,1531 a 0,9616)	0,0003	0,0004
Glicolato	0,4147 (-0,1547 a 0,8802)	-0,1948 (-0,6158 a 0,0779)	0,0004	0,0006
Dimetil sulfona	0,3571 (-0,417 a 0,7485)	-0,2624 (-0,8755 a 0,0795)	0,001	0,001
Alanina	-0,306 (-0,556 a 0,2446)	0,3382 (-0,1614 a 0,5826)	0,002	0,002
Acetato	-0,4248 (-0,6499 a 0,0955)	0,2607 (-0,3387 a 0,6088)	0,008	0,01
N-Isovaleroilglicina	-0,1529 (-0,4293 a 0,1881)	0,1114 (-0,1114 a 0,3739)	0,01	0,02
3-Hidroxibutirato	-0,5958 (-0,9597 a 0,2287)	0,1966 (-0,5524 a 0,674)	0,02	0,03
Creatina	-0,5692 (-0,9791 a 0,6055)	0,2777 (-0,1454 a 0,8049)	0,02	0,03
Citrato	-0,0681 (-0,6593 a 0,2629)	0,191 (-0,1522 a 0,5366)	0,03	0,04
Carnitina	-0,1037 (-0,502 a 0,2263)	0,1699 (-0,2387 a 0,4414)	0,04	0,05

Estes metabólitos selecionados foram utilizados para análise de vias, mostrada na tabela 4. As vias significativamente representadas após ajuste para comparação múltipla foram semelhantes para as duas populações de diálise: biossíntese do aminoacil-RNA transportador, metabolismo de arginina e prolina, metabolismo de metano, metabolismo de glicina, serina e treonina e metabolismo de piruvato. Além disso, a via do metabolismo do propanoato também foi representada no grupo DP.

Tabela 4: Análise de vias para pacientes em HD e DP usando metabólitos com concentrações significativamente diferentes entre os grupos.

HD versus controles				
	Total	Hits	Raw p	FDR
Biossíntese do aminoacil-tRNA	75	10	6,24E-07	4,99E-05
Metabolismo da arginina e prolina	77	8	6,30E-05	0,003
Metabolismo do metano	34	5	0,0003	0,009
Metabolismo da glicina, serina e treonina	48	5	0,002	0,03
Metabolismo do piruvato	32	4	0,003	0,04
Metabolismo do nitrogênio	39	4	0,005	0,07
Biossíntese da valina, leucina e isoleucina	27	3	0,01	0,15
Metabolismo do propanoato	35	3	0,03	0,26
Degradação da valina, leucina e isoleucina	40	3	0,04	0,33

Metabolismo da fenilalanina	45	3	0,05	0,37
Metabolismo da taurina e hipotaurina	20	2	0,05	0,37

DP versus controles				
	Total	Hits	Raw p	FDR
Biossíntese do aminoacil-tRNA	75	9	1,53E-05	0,0008
Metabolismo da arginina e prolina	77	9	1,90E-05	0,0008
Metabolismo do metano	34	6	5,11E-05	0,001
Metabolismo da glicina, serina e treonina	48	6	0,0004	0,007
Metabolismo do propanoato	35	5	0,0006	0,01
Metabolismo do piruvato	32	4	0,004	0,05
Síntese e degradação de corpos cetônicos	6	2	0,006	0,07
Biossíntese da valina, leucina e isoleucina	27	3	0,02	0,17
Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato	50	4	0,02	0,17
Glicólise ou gliconeogênese	31	3	0,03	0,20
Metabolismo do nitrogênio	39	3	0,05	0,32
Degradação da valina, leucina e isoleucina	40	3	0,05	0,32

O total refere-se ao número total de metabólitos presentes na via em questão. Os *hits* referem-se ao número de metabólitos entre os 51 selecionados no grupo HD e 56 no grupo DP que coincidem com os metabólitos de cada via analisada.

4.3 Associação entre metabolômica e parâmetros do TMV

Realizamos uma análise metabolômica pelo PCA com os dados dos 51 pacientes do grupo hemodiálise (HD) e encontramos 5 *outliers* extremos. Sendo assim, esses *outliers* foram excluídos e os dados clínicos e laboratoriais de 46 pacientes foram analisados (tabela 5).

Tabela 5: características clínicas e laboratoriais dos pacientes do grupo hemodiálise.

Hemodiálise	
Idade (anos)	58 (44-64)
Homens	25 (54,3%)
Branco	29 (83%)
Diabetes	18 (39,1%)
Tempo em HD (meses)	52 (27-108)
IMC (kg/m²)	25,7 (22,7-28,8)
Albumina (g/dL)	3,8 (3,5-4,1)
Cálcio total (mg/dL)	9,3 (8,4-10,0)
Fósforo (mg/dL)	5,65 (5,10-6,8)
PTHi (pg/mL)	866 (320-1628)
Fosfatase alcalina total (U/L)	171 (100-254)
25-hidroxivitamina D (ng/mL)	29 (20-36)
Glicose (mg/dL)	95 (78-149)
Colesterol total (mg/dL)	135 (114-164)
HDL-colesterol (mg/dL)	40 (31-48)
LDL-colesterol (mg/dL)	59 (39-84)
Triglicérides (mg/dL)	122 (94-206)
KTV	1,30 (1,17-1,54)

PTHi: paratormônio intacto; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; IMC, índice de massa corporal. Valores descritos em número absoluto e porcentagem e mediana e percentil 25 e 75. Havia 14 valores ausentes para KTV, 11 para raça e 2 para HDL e LDL-colesterol.

Os 46 pacientes eram relativamente jovens, 54% do sexo masculino e na maioria brancos (83%). Uma proporção significativa deles tinha diabetes (39%) e realizava hemodiálise há mais de 4 anos. O PTHi sérico era elevado na maioria deles (mediana de 866 pg/mL).

Identificamos e quantificamos 64 metabólitos em cada indivíduo através do *software Chenomx NMR Suíte 7.6* (vide tabela 1).

4.3.1 Remodelação óssea (*Turnover*)

A alta remodelação óssea foi identificada em 21 indivíduos que apresentavam níveis séricos de cálcio, fósforo e PTHi mais elevados do que aqueles com baixa remodelação óssea, como mostra a tabela 6.

Tabela 6: Análise univariada comparando a remodelação (baixa versus alta), a mineralização (anormal versus normal) e o volume ósseo trabecular (baixo versus normal) e os dados clínicos dos 46 pacientes.

	Remodelação (<i>Turnover</i>)			Mineralização (MLT)			Volume ósseo trabecular (BV/TV)		
	Baixa (N=25)	Alta (N=21)	<i>p</i>	Anormal (N=30)	Normal (N=16)	<i>p</i>	Baixo (N=17)	Normal (N=29)	<i>p</i>
Idade (anos)	57 (44-62)	61 (49-65)	0,544	55,5 (44-62)	63 (49-66)	0,248	59 (56-69)	53 (44-62)	0,158
Homem	15 (60%)	10 (47,6%)	0,401	16 (53,3%)	9 (56,3%)	0,85	9 (52,9%)	16 (55,2%)	0,883
Branco	16 (89%)	13 (77%)	0,33	19 (91%)	10 (71%)	0,143	13 (87%)	16 (80%)	0,605
Diabetes	12 (48%)	6 (28,6%)	0,179	14 (46,7%)	4 (25%)	0,86	8 (47,1%)	10 (34,5%)	0,399
Tempo em HD (meses)	40 (24-84)	72 (33-120)	0,408	44,5 (24-84)	78 (35-120)	0,278	72 (36-84)	36 (24-120)	0,161
IMC (kg/m ²)	25,9 (23,8-28,4)	25 (22,1-28,8)	0,825	26,4 (23,8-29,5)	24,5 (20,8-27,9)	0,426	23,8 (20,6-27,4)	26,9 (24,1-31)	0,026*
Albumina (g/dL)	3,8 (3,5-4,0)	4 (3,6-4,1)	0,407	3,8 (3,5-4,1)	3,8 (3,6-4)	0,808	3,7 (3,5-4,1)	3,8 (3,6-4)	0,855
Cálcio (mg/dL)	8,7 (8,2-9,5)	9,7 (9,2-10,2)	0,01*	8,95 (8,3-9,7)	9,75 (8,9-10,1)	0,137	8,8 (8,3-9,5)	9,7 (8,6-10,2)	0,053
Fósforo (mg/dL)	5,4 (4,2-6,4)	6,6 (5,4-7,4)	0,025*	5,7 (4,7-6,9)	5,6 (5,1-6,8)	0,782	5,1 (4,2-5,6)	6,1 (5,4-7,7)	0,008*
PTHi (pg/mL)	506,7 (191-1232,7)	1374 (391,8-2315,3)	0,021*	866,4 (316,4-1479)	859,7 (382,5-2274,5)	0,393	383 (320,8-1374)	1163,8 (391,8-1643,3)	0,381
FA (U/L)	159 (93-196)	185 (131-186)	0,107	175 (104-241)	144 (110-376)	0,954	185 (114-218,8)	159 (100-254)	0,439
25-vitamina D (ng/mL)	25,9 (19,6-33,3)	31,8 (21-36,1)	0,541	27,2 (19,7-35,3)	30,2 (20,3-36,7)	0,714	28,4 (21-37,3)	29,6 (19,6-33,3)	0,656
Glicose (mg/dL)	99 (78-149)	89 (76-121)	0,635	91 (77-160)	95 (82-112)	0,917	99 (83-160)	82 (77-120)	0,119
CT (mg/dL)	136 (111-161)	133 (122-164)	0,467	139 (114,2-164)	136 (113-168)	0,661	129 (111-169)	146 (119-163)	0,502
HDL (mg/dL)	40 (30-46,4)	40 (35-49)	0,672	41 (34-48,2)	35 (30-47)	0,299	42 (36-57)	37 (30-46)	0,078
LDL (mg/dL)	56,4 (37,8-84,8)	64,8 (48-83)	0,418	56,8 (39-82,5)	64 (43-90)	0,414	57 (39-82)	65 (39-85)	0,392
Triglicérides (mg/dL)	126 (97-200)	119 (94-206)	0,947	122,5 (95,3-202)	123 (86-208)	0,936	95,3 (86-186)	137 (105-234)	0,035*
KTV	1,47 (1,16-1,61)	1,26 (1,18-1,46)	0,602	1,31 (1,16-1,61)	1,28 (1,2-1,51)	0,791	1,38 (1,16-1,51)	1,27 (1,18-1,56)	1

IMC, índice de massa corporal; PTHi: paratormônio intacto; FA: fosfatase alcalina; CT: colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade. Valores descritos em número absoluto e porcentagem, média e desvio padrão e mediana e percentil 25 e 75. Havia 14 valores ausentes para KTV, 11 para raça e 2 para HDL e LDL-colesterol. * $p < 0.05$.

Primeiramente, realizamos uma análise pelo PLS-DA comparando os grupos de alta versus baixa remodelação, como mostrado na Figura 12.

Figura 12: Análise por PLS-DA dos 46 pacientes em HD comparando alta (em verde) com baixa remodelação (em vermelho). A variância de cada componente principal é mostrada na célula diagonal correspondente.

O primeiro componente (1) tem a maior variância e é o que melhor separa os grupos analisados.

Os principais metabolitos (aqueles com VIP acima de 1,5) encontrados foram acetona, dimetil sulfona, glicina, etanol, citrato, 2-hidroxi-isobutirato, acetato e 3-hidroxi-isovalerato (figura 13).

Figura 13: Escore VIP do primeiro componente dos 46 pacientes em HD comparando alta (representada pelo numero 1) com baixa remodelação (representada pelo zero).

Quando avaliamos os metabólitos individualmente pelo teste t, apenas glicina ($p = 0,004$), n-acetilornitina ($p = 0,01$), dimetil sulfona ($p = 0,012$) e citrato ($p = 0,02$) foram diferentes entre os dois grupos, sendo maior nos pacientes com alta remodelação óssea em comparação com os de baixa remodelação óssea (tabela 7 e figura 14).

Tabela 7: Teste t comparando os metabólitos e a remodelação óssea.

Metabólitos	t.stat	p.valor	-log10(p)	FDR
Glicina	-3,007	0,0043497	2,3615	0,25982
N-Acetilornitina	-2,6688	0,010619	1,9739	0,25982
Dimetil sulfona	-2,6149	0,012179	1,9144	0,25982
Citrato	-2,4387	0,018846	1,7248	0,30154
Etanol	-1,8769	0,067179	1,1728	0,74571
2-Aminobutirato	-1,8388	0,072707	1,1384	0,74571

A concentração sérica de glicina, n-acetilornitina, dimetil sulfona e citrato foi maior nos pacientes com alta do que nos pacientes com baixa remodelação óssea.

Figura 14: *Boxplot* mostrando a distribuição dos metabólitos glicina, n-acetilornitina, dimetil sulfona e citrato nos grupos de remodelação alta e baixa.

Realizamos uma análise de regressão logística que revelou associação dos 4 metabólitos com alta remodelação nos modelos univariados (tabela 8). No entanto, apenas a dimetil sulfona e o citrato permaneceram significativamente associados à remodelação óssea após ajuste para os outros metabólitos (modelo 1). Após a adição do PTHi ao modelo (modelo 2), apenas a dimetil sulfona manteve esta relação.

Tabela 8: Regressão logística incluindo os metabólitos significativos e o PTHi na análise da remodelação óssea.

Metabólitos (log)	Modelo não ajustado			Modelo 1*			Modelo 2**		
	OR	95% IC	p	OR	95% IC	p	OR	95% IC	p
Glicina	6,94	(1,59 - 30,24)	0,01	6,31	(0,78 - 50,7)	0,08	6,18	(0,77 - 49,53)	0,09
N-Acetilornitina	15,79	(1,52 - 164,4)	0,02	5,46	(0,18-162,93)	0,33	4,78	(0,15 - 156,56)	0,38
Dimetil sulfona	3,98	(1,24 - 12,71)	0,02	4,88	(1,1 - 21,64)	0,04	4,89	(1,1 - 21,84)	0,04
Citrato	4,26	(1,17 - 15,6)	0,03	6,81	(1,16 - 39,96)	0,03	6,24	(0,95 - 41,08)	0,06

*Modelo com glicina, N-acetilornitina, dimetil sulfona e citrato. **Igual ao modelo 1 + PTHi. OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança.

As curvas ROC foram construídas usando valores estimados previstos dos modelos de regressão logística para a remodelação óssea. Foram criados 4 modelos: modelo 1 (PTHi), modelo 2 (PTHi e dimetil sulfona), modelo 3 (PTHi, dimetil sulfona, glicina e citrato) e modelo 4 (PTHi, dimetil sulfona, glicina, citrato e N-acetilornitina). A adição dos metabólitos ao PTHi (modelo 1) aumentou a AUC (do inglês *area under the ROC curve* - área sob a curva ROC) na curva ROC, porém sem significância estatística (figura 15).

Figura 15: Curva ROC mostrando a melhora no poder de discriminação na alta remodelação óssea do PTHi quando adicionamos dimetil sulfona, o conjunto de 3 metabólitos (dimetil sulfona, glicina e citrato) e de 4 metabólitos (dimetil sulfona, glicina, citrato e N-acetilornitina).

As covariáveis nos modelos para remodelação óssea foram: modelo 1, PTHi; modelo 2, PTHi e dimetil sulfona (DMS); modelo 3, PTHi, dimetil sulfona (DMS), glicina e citrato; modelo 4, igual ao modelo 3 mais N-acetilornitina. A AUC do modelo 1 foi de 0,70, no modelo 2 de 0,75, no modelo 3 de 0,85 e no modelo 4 de 0,86 sob a hipótese não paramétrica; a hipótese nula era que a área verdadeira era igual a 0,5. As estatísticas C em comparação ao modelo 1 não foram significativas ($p = 0,64$ para o modelo 2, $p = 0,12$ para o modelo 3 e $p = 0,10$ para o modelo 4).

4.3.2 Mineralização

A mineralização anormal foi identificada em 30 pacientes. Porém, estes não apresentavam diferença clínica ou laboratorial em relação aos pacientes com mineralização normal, como mostrado na tabela 6.

Realizamos a análise pelo PLS-DA comparando mineralização normal com anormal como mostrado na figura 16.

Figura 16: Análise por PLS-DA dos 46 pacientes em HD comparando mineralização normal (em verde) com anormal (em vermelho). A variância de cada componente principal é mostrada na célula diagonal correspondente.

O primeiro componente (1) tem a maior variância e é o que melhor separa os grupos analisados.

Os principais metabolitos encontrados nesta análise foram acetona, etanol, dimetil sulfona, 2-hidroxicvalerato, xantina, malonato, 3-hidroxiisovalerato, glicina e acetato (figura 17).

Figura 17: Escore VIP do primeiro componente dos 46 pacientes em HD comparando mineralização anormal (0) com normal (1).

No entanto, na análise pelo teste t, verificamos que a concentração sérica de etanol, dimetil sulfona e malonato era maior nos pacientes com mineralização normal do que naqueles com mineralização anormal, como mostrado na tabela 9 e na figura 18.

Tabela 9: Resultado do teste t comparando os metabólitos e o intervalo de mineralização.

Metabólitos	t.stat	p.valor	-log10(p)	FDR
Etanol	-2,4712	0,017408	1,7592	0,72036
Dimetil sulfona	-2,2315	0,03079	1,5116	0,72036
Malonato	-2,1539	0,036766	1,4346	0,72036
Acetona	1,9241	0,060826	1,2159	0,72036

A concentração sérica de etanol, dimetil sulfona e malonato foi maior nos pacientes com mineralização normal do que nos pacientes mineralização anormal.

Figura 18: *Boxplot* mostrando a distribuição dos metabólitos etanol, dimetil sulfona e malonato nos grupos de mineralização anormal e normal.

Modelos de regressão logística mostraram que apenas o etanol permaneceu significativamente associado à mineralização após ajuste para os metabólitos significativos e parâmetros clínicos idade e diabetes (tabela 10).

Tabela 10: Regressão logística incluindo idade, diabetes e os metabólitos significativos na análise da mineralização.

Metabólitos (log)	Modelo não ajustado			Modelo 1*			Modelo 2**		
	OR	95% IC	p	OR	95% IC	p	OR	95% IC	p
Etanol	0,33	(0,12 - 0,89)	0,03	0,33	(0,11 - 0,99)	0,05	4,33	(1,23 - 15,3)	0,02
Dimetil sulfona	0,3	(0,1 - 0,95)	0,04	0,39	(0,08 - 1,77)	0,22	1,77	(0,33 - 9,51)	0,5
Malonato	0,2	(0,04 - 1,11)	0,07	0,61	(0,09 - 4,21)	0,61	2,05	(0,24 - 17,71)	0,52

*Modelo com etanol, dimetil sulfona e malonato. **Igual ao modelo 1 + idade e diabetes. OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança.

As curvas ROC foram construídas usando valores previstos estimados de modelos de regressão logística para mineralização. O metabólito etanol acrescentou algum desempenho para o diagnóstico de mineralização anormal (de 0,68 a 0,82), embora as diferenças nas AUCs não tenham alcançado significância estatística (figura 19).

Figura 19: Curva ROC mostrando a melhora no poder de discriminação da idade e diabetes quando adicionamos o etanol e o conjunto de metabólitos (etanol, dimetil sulfona e malonato) na análise da mineralização.

As covariáveis nos modelos para mineralização foram: modelo 1, idade e diabetes; modelo 2, idade, diabetes e etanol; modelo 3, igual ao modelo 2 mais dimetil sulfona e malonato. A AUC do modelo 1 foi 0,68, do modelo 2 foi 0,82 e do modelo 3 foi de 0,83 sob a hipótese não paramétrica; a hipótese nula era que a área verdadeira era igual a 0,5. As estatísticas C em comparação ao modelo 1 não foram significativas ($p = 0,16$ para o modelo 2 e $p = 0,21$ para o modelo 3).

4.3.3 Volume ósseo trabecular

O volume ósseo trabecular (BV/TV) baixo foi encontrado em 17 pacientes que apresentavam menor IMC, fósforo e triglicerídeos (e tendência a menor cálcio e HDL) em comparação com aqueles com volume ósseo normal (tabela 6).

Realizamos a análise PLS-DA comparando volume ósseo trabecular normal com volume ósseo baixo como mostrado na figura 20.

Figura 20: Análise por PLS-DA dos 46 pacientes em HD comparando volume ósseo trabecular normal (em verde) com baixo (em vermelho). A variância de cada componente principal é mostrada na célula diagonal correspondente.

O primeiro componente (1) tem a maior variância e é o que melhor separa os grupos analisados.

Os principais metabolitos encontrados nesta análise foram creatina, carnitina, uréia, metilamina, 2-hidroxi-isovalerato, guanidoacetato, 3-hidroxi-isovalerato, N,N-dimetilglicina, glicose, O-acetilcarnitina e creatinina (figura 21).

Figura 21: Escore VIP do primeiro componente dos 46 pacientes em HD comparando volume trabecular ósseo baixo (0) com normal (1).

Na análise pelo teste t, as concentrações séricas de carnitina, uréia, trimetilamina, O-acetilcarnitina, N,N-dimetilglicina e creatinina foram menores nos pacientes com baixo volume trabecular ósseo do que naqueles com volume ósseo normal, como mostrado na tabela 11 e na figura 22.

Tabela 11: Resultado do teste t comparando os metabólitos e o volume ósseo trabecular.

Metabólitos	t.stat	p.valor	-log10(p)	FDR
Carnitina	-3,4355	0,0013019	2,8854	0,083319
Uréia	-2,4954	0,016407	1,785	0,51263
Trimetilamina	-2,1177	0,039888	1,3992	0,51263
O-Acetilcarnitina	-2,0965	0,041824	1,3786	0,51263
N,N-Dimetilglicina	-2,0494	0,04641	1,3334	0,51263
Creatinina	-2,0335	0,048059	1,3182	0,51263
Creatina	-1,8148	0,076375	1,117	0,58528

A concentração sérica de carnitina, uréia, trimetilamina, o-acetilcarnitina, N,N-dimetilglicina e creatinina foi menor nos pacientes com baixo volume ósseo.

Figura 22: *Boxplot* mostrando a distribuição dos metabólitos carnitina, uréia, trimetilamina, O-acetilcarnitina, N,N-dimetilglicina e creatinina nos grupos de volume ósseo trabecular (BV/TV) baixo e normal.

Nos modelos de regressão logística (tabela 12), os metabólitos carnitina, uréia e o-acetilcarnitina foram relacionados ao volume ósseo trabecular no modelo não ajustado. Porém, apenas a carnitina permaneceu significativamente relacionada ao volume ósseo trabecular após o ajuste para os outros metabólitos (modelo 1) e para fósforo e idade (modelo 2).

Tabela 12: Regressão logística incluindo idade, fósforo e os metabólitos significativos na análise do volume ósseo trabecular.

Metabólitos (log)	Modelo não ajustado			Modelo 1*			Modelo 2**		
	OR	95% IC	p	OR	95% IC	p	OR	95% IC	p
Carnitina	0,06	(0,01 - 0,43)	0,005	0,06	(0 - 0,76)	0,03	0,07	(0,01 - 0,56)	0,01
Uréia	0,18	(0,04 - 0,81)	0,02	0,37	(0,05 - 2,81)	0,34	0,25	(0,05 - 1,17)	0,08
Trimetilamina	0,13	(0,02 - 1)	0,05	0,63	(0,04 - 11,03)	0,75	0,14	(0,01 - 1,44)	0,1
O-Acetilcarnitina	0,22	(0,05 - 0,99)	0,05	1,32	(0,1 - 16,53)	0,83	0,21	(0,04 - 1,14)	0,07
N,N-Dimetilglicina	0,24	(0,06 - 1,03)	0,05	0,16	(0,02 - 1,18)	0,07	0,25	(0,05 - 1,38)	0,11
Creatinina	0,23	(0,05 - 1,03)	0,05	2,07	(0,17 - 25,06)	0,57	0,19	(0,03 - 1,09)	0,06
Creatina	0,52	(0,25 - 1,1)	0,09	-	-	-	0,69	(0,34 - 1,4)	0,3

*Modelo com carnitina, uréia, trimetilamina, o-acetilcarnitina, n,n-dimetilglicina e creatinina. **Igual ao modelo 1 + creatina, idade e fósforo. OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança.

A análise ROC mostrou que a adição de carnitina ao modelo baseado na idade e fósforo melhorou a AUC (de 0,72 a 0,83), embora isso não tenha sido estatisticamente significativo (Figura 23). A adição dos outros 5 metabólitos (uréia, trimetilamina, O-acetilcarnitina, N,N-dimetilglicina e creatinina) não melhorou o modelo.

Figura 23: Curva ROC mostrando a melhora no poder de discriminação da carnitina e do conjunto de metabólitos na análise do volume ósseo trabecular .

As covariáveis nos modelos para o volume ósseo foram: modelo 1, idade e fósforo (P); modelo 2, idade, fósforo e carnitina; modelo 3, igual ao modelo 2 mais ureia, trimetilamina, O-acetilcarnitina, N,N-dimetilglicina e creatinina. A AUC do modelo 1 foi 0,72, do modelo 2 foi 0,83 e do modelo 3 foi de 0,84 sob a hipótese não paramétrica; a hipótese nula era que a área verdadeira era igual a 0,5. As estatísticas C em comparação ao modelo 1 não foram significativas ($p = 0,3$ para o modelo 2 e $p = 0,25$ para o modelo 3).

5. DISCUSSÃO

Na análise do perfil metabólico de pacientes em hemodiálise e diálise peritoneal, exploramos a assinatura do metaboloma da população em diálise em comparação com controles pareados por idade, sexo e diabetes. Nossos achados mostram que, como esperado, tanto a população em HD quanto em DP apresentam assinaturas metabolômicas muito distintas em comparação com as não-DRC; após aplicar técnicas de redução de dimensionalidade, encontramos os principais metabólitos relacionados a essas assinaturas e as vias metabólicas significativamente enriquecidas nessas populações de diálise.

Não são muitos os estudos que avaliaram o metaboloma como um todo, particularmente aplicando técnicas de redução de dimensionalidade, uma abordagem interessante para avaliar o metaboloma considerando a presença de variáveis redundantes e altamente correlacionadas. Choi et al. compararam 18 pacientes em DP, 18 em HD e 18 pacientes controles por RMN e relataram metabólitos diferenciais entre os grupos (52). Um dos principais achados foi a detecção de hipoxantina e inosina, compostos da família das purinas encontrados apenas no grupo HD, que foram atribuídas ao potencial de hipóxia e estresse oxidativo gerado durante o processo de HD. Porém, em nosso estudo não encontramos nenhum metabólito pertencente a esta família. Além disso, 66,7% dos pacientes em DP deste estudo utilizaram banho com icodextrina, o que interferiu na análise do metaboloma, e as vias metabólicas não foram analisadas.

Os resultados variam amplamente entre os estudos, provavelmente como um reflexo de diferentes populações, desenhos de estudo e plataformas utilizadas. Em nosso estudo, as assinaturas metabolômicas dos grupos de diálise eram muito diferentes daquelas da população normal, considerando indivíduos do mesmo sexo, idade e status de diabetes. Optamos por não comparar os grupos HD e PD, uma vez que esses participantes eram muito diferentes em muitos aspectos clínicos e laboratoriais. Os metabólitos que mostraram a melhor relação na análise PLS-DA foram τ -metil-histidina ou 1-metil-histidina, trigonelina, 5-aminolevulinato ou ácido 5-aminolevulínico, cafeína, N-metil-hidantoína, dimetilamina, creatinina e mio-inositol.

A 1-Metil-histidina é um produto da síntese da ligação peptídica e da metilação da actina e da miosina, e sua medição fornece um índice da taxa de degradação da proteína muscular (74, 75). Também pode ser considerada uma toxina urêmica, com vários estudos demonstrando aumento da concentração desse metabólito nos estágios 3-4 da DRC e na diálise (52, 76, 77).

A Trigonelina é um produto do metabolismo da niacina (vitamina B3) que é excretada na urina (78). É encontrada em plantas (sementes de feno-grego, ervilhas de jardim, sementes de cânhamo, aveia e batata) e também é utilizada como biomarcador do consumo de café (78-84). Sua reposição melhora a homeostase da glicose e dos lipídios no diabetes, retarda a digestão e a absorção de carboidratos e lipídios e aumenta a ação da insulina, ações que levaram ao seu estudo como agente antidiabético oral (79, 85-87). Nas doenças renais, dois estudos constataram que a redução da trigonelina foi um marcador urinário de dano renal pela cisplatina em ratos (88) e por isquemia e reperfusão renal em modelo suíno (56).

O aumento do metabólito da Cafeína nos dois grupos em diálise foi um achado interessante, pois não há estudos mostrando associação da cafeína à DRC, mas alguns estudos observacionais mostram que o consumo diário de café pode prevenir o desenvolvimento da DRC (89). A cafeína é metabolizada principalmente no fígado e excretada via renal em indivíduos saudáveis, mas em pequena quantidade, uma vez que 98% do café filtrado pelos glomérulos é reabsorvido (90). A presença de cafeína no soro dos pacientes neste estudo pode ser um fator de confusão com o uso de analgésicos com cafeína em sua composição, dado o uso frequente de analgésicos nessa população (91).

O Ácido 5-aminolevulínico (ALA), que está elevado nos grupos dialíticos em nosso estudo, é um metabólito intermediário na síntese do heme e já foi mostrado o seu acúmulo em pacientes em hemodiálise, possivelmente favorecendo o estresse oxidativo (92) e a anemia (93). ALA está elevado em ambos os grupos DP e HD em nossos resultados, achado compatível com o estresse oxidativo aumentado nesta população.

A Dimetilamina (DMA) é uma amina secundária orgânica abundantemente presente na urina humana e descrita como uma toxina urêmica sérica em vários estudos (94-97). Suas principais fontes são o N-óxido

de trimetilamina (TMAO) (97) e a dimetilarginina assimétrica (ADMA) (98), metabólitos conhecidos por estarem associados a um aumento do risco de doença cardiovascular na DRC (98-100).

O Mio-inositol é um poliol presente nos alimentos e produzido endogenamente a partir da glicose-6-fosfato. Há relatos de associação com função renal (101, 102), além do que a mio-inositol oxigenase (MIOX) é uma proteína específica do rim expressa no túbulo proximal (103).

A N-metil-hidantoína (ou 1-metil-hidantoína) resulta da degradação bacteriana da creatinina no intestino (pela creatinina desaminase) (104). Este metabólito parece ser tóxico para as células tubulares renais proximais *in vitro* (104) e seus níveis aumentados estão relacionados à aterosclerose em modelo experimental (105).

Por fim, realizamos análise de vias usando metabólitos significativamente diferentes entre os grupos de diálise e seus controles. Cinco vias foram identificadas como enriquecidas. Sabe-se que o metabolismo de arginina e prolina está alterado na DRC, já que o rim está relacionado à biossíntese da L-arginina (106) e o aumento da síntese de prolina pode ser resultado do acúmulo de ornitina (um intermediário no ciclo da uréia) na DRC avançada (107). O metabolismo do metano pode estar envolvido devido à ação do microbioma intestinal na DRC (108). O metabolismo da glicina, serina e treonina pode estar relacionado aos perfis alterados de aminoácidos essenciais e não essenciais já demonstrados em pacientes com DRC em comparação com indivíduos saudáveis, provavelmente devido ao mau estado nutricional e aos distúrbios metabólicos que levam a deficiências de aminoácidos (107). A deficiência de tiamina ocorre na DRC avançada e pode levar ao acúmulo de piruvato (109, 110). Já a via do metabolismo do propanoato foi representada apenas no grupo DP. Esta via está intimamente relacionada com a via de fosforilação oxidativa e produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial em resposta à hiperglicemia, demonstrada em um estudo com pacientes diabéticos tipo 1 com nefropatia diabética (111). Nesse aspecto, um estudo experimental demonstrou que a solução de DP à base de glicose pode contribuir para a produção de ROS (112) e pacientes em DP manifestam estresse oxidativo excessivo em alguns estudos (113).

Nosso estudo tem um ponto forte e algumas limitações. Utilizamos espectroscopia por RNM que possui sensibilidade limitada em relação ao GC ou LC, mas, por outro lado, detecta componentes abundantes, gerando menor variabilidade entre os perfis metabólicos dos indivíduos. Infelizmente, não tínhamos os parâmetros de eficiência na diálise e por isso, não pudemos explorar as relações dos metabólitos com diferentes doses de diálise. A análise das vias pode ser confundida pelas propriedades de filtração dos metabólitos.

Após identificarmos o perfil de metabólitos nos pacientes em terapia renal substitutiva, realizamos a análise da possível associação entre o perfil metabolômico destes pacientes e os parâmetros ósseos encontrados na classificação TMV.

O diagnóstico e o manejo do DMO-DRC ainda são desafiadores e qualquer nova ferramenta que possa nos ajudar a tratar os pacientes com DRC é bem-vinda. Este foi o primeiro estudo que empregou a técnica metabolômica tentando melhorar a precisão dos biomarcadores atuais para o diagnóstico de remodelação óssea. Além disso, tentamos procurar potenciais marcadores metabolômicos de mineralização e volume trabecular ósseo que, embora sejam peças importantes do TMV, são pouco estudados. Infelizmente, provavelmente pelo tamanho da amostra, não foi possível demonstrar que os metabólitos que estão associados à discriminação da remodelação, mineralização e volume ósseos melhoraram significativamente a curva ROC. No entanto, fomos capazes de identificar alguns potenciais novos marcadores ainda não descritos neste campo, como glicina, dimetil sulfona, citrato, etanol e carnitina.

O PTHi é um marcador de alta remodelação óssea, como demonstrado em estudos anteriores (12, 114) e isso não foi diferente em nosso estudo. Entretanto, foi interessante notar que os metabólitos avaliados pela espectroscopia por RMN parecem aumentar sua acurácia, principalmente glicina, dimetil sulfona e citrato, todos maiores nos pacientes com alta remodelação óssea.

O aminoácido Glicina é um aminoácido não essencial obtido a partir de fontes dietéticas e síntese endógena. Ele está relacionado às várias vias metabólicas e é crucial para vários processos fisiológicos humanos como

citoproteção, resposta imune, crescimento, desenvolvimento, metabolismo e sobrevivência (115). Em estudos em humanos com DRC, a glicina urinária baixa foi associada à DRC incidente (116) e à nefropatia diabética (117). A glicina é um importante componente do colágeno e um resíduo fundamental para formar qualquer tipo de estrutura de colágeno saudável no corpo humano. Pacientes diabéticos têm deficiência de glicina plasmática e isso pode levar à formação defeituosa de colágeno na parede dos vasos, promovendo assim a calcificação arterial (118). O metabolismo da glicina também é profundamente alterado em pacientes com DRC e a calcificação medial arterial e o risco cardiovascular elevado também são características típicas desses pacientes (118). Como diversos marcadores ligados à quebra do colágeno estão alterados nos pacientes renais com alta remodelação óssea (como por exemplo, P1NP, DPD e piridinolina anteriormente citados), o aumento da glicina em nosso estudo pode estar relacionado à maior reabsorção do colágeno na doença óssea de alta remodelação.

A Dimetil sulfona ou o Metilsulfonilmetano (MSM) é um composto orgânico de enxofre que pertence às sulfonas e é derivado de fontes alimentares, do metabolismo bacteriano intestinal e do metabolismo endógeno do metanotiol (119). O MSM é um suplemento dietético usado para artrite e uma série de outras condições relacionadas à inflamação e função física, e pode auxiliar no tratamento de vários tipos de câncer ou síndromes metabólicas relacionadas à obesidade (120), como diabetes tipo 2 e esteatose hepática (121). Usando espectroscopia por RMN em humanos, o MSM foi retido como outras toxinas urêmicas na análise do plasma em pacientes com DRC estágios 3-4 (76), e a diminuição da sua concentração urinária em indivíduos com DRC pode ser consequência da depuração reduzida sem secreção tubular compensatória (122). Em estudos *in vitro* com células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs), o tratamento com MSM ativou a sinalização do hormônio de crescimento através da via Jak2 / STAT5b em CTMs e em células osteoblasto-*like* e promoveu a diferenciação osteogênica das CTMs através da ativação da STAT5b (o MSM imitou o papel de hormônio do crescimento e intensificou o aumento da mineralização e da diferenciação dos osteoblastos) (123). Assim, o aumento sérico de MSM em pacientes com alta remodelação óssea encontrado em nosso estudo pode estar relacionado

às alterações na atividade dos osteoblastos já observadas nessa condição. Por outro lado, outro estudo *in vitro* com macrófagos derivados da medula óssea demonstrou que o MSM atenuou a osteoclastogênese induzida pela via do RANKL, pois bloqueou a atividade da NF- κ B e do STAT3 (124).

O Citrato (ácido cítrico) é um ácido fraco formado no ciclo do ácido tricarboxílico e o principal metabólito no metabolismo energético. Um estudo metabolômico utilizando espectroscopia por RMN em ratos mostrou que os níveis de citrato estavam significativamente aumentados no plasma de ratos com DRC (125). Outros estudos em pacientes com DRC encontraram redução dos níveis de citrato na urina (122, 126) e isto pode estar relacionado aos distúrbios metabólicos como a acidose metabólica nos pacientes com DRC (127). Outro estudo metabolômico randomizado com pacientes não diabéticos portadores de DRC estágios 3-4 avaliou que o nível de citrato estava reduzido na urina, mas com um aumento da sua excreção urinária durante o tratamento com um agonista do receptor de vitamina D (paricalcitol oral), sugerindo que a DRC era um estado de disfunção mitocondrial (128). Não há estudos até o momento mostrando aumento sérico de citrato em indivíduos com alterações ósseas, e seu aumento nos pacientes com alta remodelação óssea em nosso estudo pode estar relacionado ao estado energético metabólico alterado encontrado no estado de alta remodelação. Um estudo que poderia corroborar esta hipótese foi feito usando UPLC-MS para analisar amostras de soro de 19 pacientes com PTHi entre 150-300 pg/mL em comparação com 19 pacientes com PTHi acima de 300 pg/mL. No grupo com maior iPTH, houve um aumento de 4 metabólitos que são substratos dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, sugerindo que o metabolismo anormal do ciclo de ácido tricarboxílico e o mau funcionamento mitocondrial podem estar associados a um aumento no nível de PTHi e, conseqüentemente, à alta remodelação óssea (129).

Não existem marcadores séricos capazes de discriminar a mineralização ou o volume ósseo trabecular. Idade e diabetes são fatores conhecidos que afetam a saúde óssea (130). Entretanto, ambos tiveram um desempenho ruim para o diagnóstico de mineralização nesta amostra, mas a adição de etanol, dimetil sulfona e malonato ao modelo ajudou a melhorar a discriminação, embora não significativamente. O Etanol é um biomarcador do consumo de

álcool e pode ser produzido em pequenas quantidades pela microflora intestinal através da fermentação anaeróbica (131). O consumo leve a moderado de álcool tem sido associado à maior densidade mineral óssea, enquanto o consumo pesado parece ter o efeito oposto (132). No entanto, o significado de níveis reduzidos de etanol na DRC não foi estudado e não se sabe se o etanol está relacionado às alterações no microbioma na DRC.

O Malonato ou Ácido malônico é um ácido dicarboxílico e pode ser uma toxina urêmica em pacientes em hemodiálise (133). O malonato inibe a succinato desidrogenase na cadeia respiratória mitocondrial e seu aumento plasmático pode refletir alguma disfunção mitocondrial em pacientes com DRC avançada (133). Em nosso estudo, o malonato estava diminuído nos pacientes com mineralização anormal e isso pode estar relacionado aos distúrbios mitocondriais nestes indivíduos.

Em relação ao volume ósseo trabecular, vários dos principais metabólitos identificados pela análise por PLS-DA estavam relacionados com algumas vias comuns, como a via da arginina (guanidoacetato, creatina, creatinina e ureia) e a via do metano (trimetilamina e metilamina), além de carnitina e O-acetilcarnitina. A carnitina foi o único metabólito que permaneceu significativamente associado ao volume ósseo nos modelos ajustados, mostrando desempenho moderado para prever o baixo volume ósseo quando combinada à idade e ao fósforo.

A Carnitina é um aminoácido não essencial obtido a partir de fontes alimentares (principalmente carne vermelha e pouco menos em produtos lácteos) e da biossíntese endógena de lisina e metionina nos rins e fígado (134). Ela é um cofator essencial na oxidação de ácidos graxos (135). Sua deficiência é comum em pacientes em hemodiálise, podendo ter efeitos deletérios sobre a função cardiovascular (136, 137), e em outras doenças crônicas, como câncer e na caquexia pelo câncer (138). Entretanto, o benefício de sua suplementação nesses pacientes ainda é incerto (138, 139). Além disso, a microbiota intestinal pode metabolizar a carnitina em trimetilamina (TMA), que é então oxidada pelas enzimas hepáticas para formar N-óxido de trimetilamina (TMAO), um preditor de risco cardiovascular em pacientes com DRC quando aumentado (134). Já em estudos experimentais, foi demonstrado que a suplementação com carnitina e derivados de carnitina melhora o volume

ósseo e a proliferação e diferenciação de osteoblastos (140, 141). Em nosso estudo, a carnitina sérica foi maior nos pacientes com volume ósseo normal, sugerindo que existe uma assinatura metabólica específica associada ao volume ósseo baixo nos pacientes com DRC, e a carnitina pode ter um papel importante nisso.

Nosso estudo apresenta várias limitações. Primeiro, o pequeno número de pacientes que limita nosso poder estatístico e pode levar ao sobreajuste dos modelos de regressão. Além disso, não usamos valores de p ajustados por FDR, fato que aumenta consideravelmente a probabilidade de resultados falso-positivos. Em segundo lugar, não conseguimos ajustar a função renal residual nem as métricas de dose de diálise, uma vez que parte destas informações não estavam disponíveis. No entanto, o KTV estava disponível para a maioria dos participantes e não era diferente entre os grupos de TMV. Terceiro, usamos espectroscopia por RMN, um método que traz a vantagem de uma medida quantitativa mais confiável de metabólitos, mas limitada em termos de número de metabólitos capturados em comparação com GC ou LC. Além disso, nos diversos estudos anteriormente citados, foi mostrado que parte dos metabólitos encontrados em nosso estudo (glicina, dimetil sulfona, citrato, carnitina, malonato) estaria associada à DRC e/ou à TFG e, portanto, outros determinantes podem confundir as associações aqui observadas. Todas essas limitações implicam que nossos resultados são mais geradores de hipóteses do que conclusivos, com necessidade de replicação e validação. No entanto, este é o primeiro estudo que avaliou a metabolômica na osteodistrofia renal.

6. CONCLUSÕES

A análise que fizemos do perfil metabólico de pacientes em hemodiálise e diálise peritoneal é um dos poucos estudos que avaliaram o metaboloma dos pacientes em TRS em relação aos indivíduos saudáveis até o momento. Neste estudo, apresentamos assinaturas metabolômicas distintas, descrevemos os principais metabólitos relacionados a essas assinaturas após a aplicação de uma técnica de redução de dimensionalidade e mostramos as vias identificadas como anormais considerando o perfil metabolômico dos pacientes em HD e DP. Podemos concluir que, a despeito da técnica de substituição renal empregada, o perfil metabólico dos pacientes portadores de DRC é muito distinto dos indivíduos com função renal preservada, sendo que estes metabólitos e vias anormais podem estar associados ao aumento de mortalidade geral e cardiovascular destes pacientes.

Ao avaliarmos as associações do perfil metabolômico com a classificação TMV das biópsias ósseas, nossos resultados sugerem que alguns metabólitos possam estar relacionados à remodelação, mineralização e volume ósseo trabecular em pacientes com DRC em hemodiálise. Mais estudos avaliando o metaboloma no DMO-DRC são necessários e podem levar à exploração de metabólitos como biomarcadores do fenótipo ósseo, assim como explorar as vias metabólicas nas diferentes doenças ósseas observadas na DRC.

7. REFERENCIAS

1. Mills KT, Xu Y, Zhang W, Bundy JD, Chen CS, Kelly TN, et al. A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney Int.* 2015;88(5):950-7.
2. Group. KDIGO KCMW. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease—mineral and bone disorder (CKD—MBD). *Kidney Int.* 2009;76(Suppl 113):S1–S130.
3. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, Gillespie BW, Kerr PG, Bommer J, et al. Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis.* 2008;52(3):519-30.
4. Asci G, Ok E, Savas R, Ozkahya M, Duman S, Toz H, et al. The link between bone and coronary calcifications in CKD-5 patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(3):1010-5.
5. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006;69(11):1945-53.
6. Malluche HH, Monier-Faugere MC. Renal osteodystrophy: what's in a name? Presentation of a clinically useful new model to interpret bone histologic findings. *Clin Nephrol.* 2006;65(4):235-42.
7. Araujo SM, Ambrosoni P, Lobao RR, Caorsi H, Moyses RM, Barreto FC, et al. The renal osteodystrophy pattern in Brazil and Uruguay: an overview. *Kidney Int Suppl.* 2003(85):S54-6.
8. Barreto DV, Barreto Fde C, Carvalho AB, Cuppari L, Draibe SA, Dalboni MA, et al. Association of changes in bone remodeling and coronary calcification in hemodialysis patients: a prospective study. *Am J Kidney Dis.* 2008;52(6):1139-50.
9. Hernandez FR, Canziani ME, Barreto FC, Santos RO, Moreira VM, Rochitte CE, et al. The shift from high to low turnover bone disease after parathyroidectomy is associated with the progression of vascular calcification

in hemodialysis patients: A 12-month follow-up study. *PLoS One*. 2017;12(4):e0174811.

10. London GM, Marty C, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, de Vernejoul MC. Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(7):1943-51.

11. Covic A, Voroneanu L, Apetriu M. PTH and/or Bone Histology: Are We Still Waiting for a Verdict From the CKD-MBD Grand Jury? *Am J Kidney Dis*. 2016;67(4):535-8.

12. Sprague SM, Bellorin-Font E, Jorgetti V, Carvalho AB, Malluche HH, Ferreira A, et al. Diagnostic Accuracy of Bone Turnover Markers and Bone Histology in Patients With CKD Treated by Dialysis. *Am J Kidney Dis*. 2016;67(4):559-66.

13. Langub MC, Monier-Faugere MC, Wang G, Williams JP, Koszewski NJ, Malluche HH. Administration of PTH-(7-84) antagonizes the effects of PTH-(1-84) on bone in rats with moderate renal failure. *Endocrinology*. 2003;144(4):1135-8.

14. Gardham C, Stevens PE, Delaney MP, LeRoux M, Coleman A, Lamb EJ. Variability of parathyroid hormone and other markers of bone mineral metabolism in patients receiving hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(7):1261-7.

15. Souberbielle JC, Boutten A, Carlier MC, Chevenne D, Coumaros G, Lawson-Body E, et al. Inter-method variability in PTH measurement: implication for the care of CKD patients. *Kidney Int*. 2006;70(2):345-50.

16. Herberth J, Branscum AJ, Mawad H, Cantor T, Monier-Faugere MC, Malluche HH. Intact PTH combined with the PTH ratio for diagnosis of bone turnover in dialysis patients: a diagnostic test study. *Am J Kidney Dis*. 2010;55(5):897-906.

17. Tanaka M, Komaba H, Itoh K, Matsushita K, Matsushita K, Hamada Y, et al. The whole-PTH/intact-PTH ratio is a useful predictor of severity of secondary hyperparathyroidism. *NDT Plus*. 2008;1(Suppl 3):iii59-iii62.

18. Magnusson P, Sharp CA, Magnusson M, Risteli J, Davie MW, Larsson L. Effect of chronic renal failure on bone turnover and bone alkaline phosphatase isoforms. *Kidney Int*. 2001;60(1):257-65.

19. Haarhaus M, Monier-Faugere MC, Magnusson P, Malluche HH. Bone alkaline phosphatase isoforms in hemodialysis patients with low versus non-low bone turnover: a diagnostic test study. *Am J Kidney Dis.* 2015;66(1):99-105.
20. Couttenye MM, D'Haese PC, Van Hoof VO, Lemoniatou E, Goodman W, Verpooten GA, et al. Low serum levels of alkaline phosphatase of bone origin: a good marker of adynamic bone disease in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11(6):1065-72.
21. Urena P, De Vernejoul MC. Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney Int.* 1999;55(6):2141-56.
22. Wang M, Obi Y, Streja E, Rhee CM, Lau WL, Chen J, et al. Association of Parameters of Mineral Bone Disorder with Mortality in Patients on Hemodialysis according to Level of Residual Kidney Function. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(7):1118-27.
23. Ueda M, Inaba M, Okuno S, Nagasue K, Kitatani K, Ishimura E, et al. Clinical usefulness of the serum N-terminal propeptide of type I collagen as a marker of bone formation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2002;40(4):802-9.
24. Cavalier E, Delanaye P, Collette J, Krzesinski JM, Chapelle JP. Evaluation of different bone markers in hemodialyzed patients. *Clin Chim Acta.* 2006;371(1-2):107-11.
25. Veverka V, Henry AJ, Slocombe PM, Ventom A, Mulloy B, Muskett FW, et al. Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular insight into a key regulator of Wnt-mediated bone formation. *J Biol Chem.* 2009;284(16):10890-900.
26. Drueke TB, Lafage-Proust MH. Sclerostin: just one more player in renal bone disease? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(4):700-3.
27. Delanaye P, Krzesinski JM, Warling X, Moonen M, Smelten N, Medart L, et al. Clinical and biological determinants of sclerostin plasma concentration in hemodialysis patients. *Nephron Clin Pract.* 2014;128(1-2):127-34.
28. Cejka D, Herberth J, Branscum AJ, Fardo DW, Monier-Faugere MC, Diarra D, et al. Sclerostin and Dickkopf-1 in renal osteodystrophy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(4):877-82.

29. de Oliveira RA, Barreto FC, Mendes M, dos Reis LM, Castro JH, Britto ZM, et al. Peritoneal dialysis per se is a risk factor for sclerostin-associated adynamic bone disease. *Kidney Int.* 2015;87(5):1039-45.
30. Graciolli FG, Neves KR, Barreto F, Barreto DV, Dos Reis LM, Canziani ME, et al. The complexity of chronic kidney disease-mineral and bone disorder across stages of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2017;91(6):1436-46.
31. Behets GJ, Viaene L, Meijers B, Blocki F, Brandenburg VM, Verhulst A, et al. Circulating levels of sclerostin but not DKK1 associate with laboratory parameters of CKD-MBD. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176411.
32. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, et al. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res.* 2008;23(6):939-48.
33. Urena P, Ferreira A, Kung VT, Morieux C, Simon P, Ang KS, et al. Serum pyridinoline as a specific marker of collagen breakdown and bone metabolism in hemodialysis patients. *J Bone Miner Res.* 1995;10(6):932-9.
34. Maeno Y, Inaba M, Okuno S, Yamakawa T, Ishimura E, Nishizawa Y. Serum concentrations of cross-linked N-telopeptides of type I collagen: new marker for bone resorption in hemodialysis patients. *Clin Chem.* 2005;51(12):2312-7.
35. Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem.* 2001;47(1):74-80.
36. Chiang C. The use of bone turnover markers in chronic kidney disease-mineral and bone disorders. *Nephrology (Carlton).* 2017;22 Suppl 2:11-3.
37. Confavreux CB. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney Int.* 2011;79(121):S14-9.
38. Villas-Bôas SG. Metabolome analysis : an introduction. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience; 2007. xv, 311 p. p.
39. Weiss RH, Kim K. Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2011;8(1):22-33.
40. Matthiesen R. Bioinformatics methods in clinical research. New York, NY London: Humana Press ;

Springer distributor; 2010. x, 387 p. p.

41. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D801-7.
42. Kalim S, Rhee EP. An overview of renal metabolomics. *Kidney Int.* 2017;91(1):61-9.
43. Malet-Martino M, Holzgrabe U. NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(1):1-15.
44. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst.* 2012;137(2):293-300.
45. Lei Z, Huhman DV, Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J Biol Chem.* 2011;286(29):25435-42.
46. Niewczas MA, Sirich TL, Mathew AV, Skupien J, Mohny RP, Warram JH, et al. Uremic solutes and risk of end-stage renal disease in type 2 diabetes: metabolomic study. *Kidney Int.* 2014;85(5):1214-24.
47. Rhee EP, Clish CB, Ghorbani A, Larson MG, Elmariah S, McCabe E, et al. A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(8):1330-8.
48. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011;472(7341):57-63.
49. Stubbs JR, House JA, Ocque AJ, Zhang S, Johnson C, Kimber C, et al. Serum Trimethylamine-N-Oxide is Elevated in CKD and Correlates with Coronary Atherosclerosis Burden. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):305-13.
50. Missailidis C, Hallqvist J, Qureshi AR, Barany P, Heimbürger O, Lindholm B, et al. Serum Trimethylamine-N-Oxide Is Strongly Related to Renal Function and Predicts Outcome in Chronic Kidney Disease. *PLoS One.* 2016;11(1):e0141738.
51. Shafi T, Meyer TW, Hostetter TH, Melamed ML, Parekh RS, Hwang S, et al. Free Levels of Selected Organic Solutes and Cardiovascular Morbidity and Mortality in Hemodialysis Patients: Results from the Retained Organic Solutes and Clinical Outcomes (ROSCO) Investigators. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126048.

52. Choi JY, Yoon YJ, Choi HJ, Park SH, Kim CD, Kim IS, et al. Dialysis modality-dependent changes in serum metabolites: accumulation of inosine and hypoxanthine in patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(4):1304-13.
53. Hallan S, Sharma K. The Role of Mitochondria in Diabetic Kidney Disease. *Curr Diab Rep*. 2016;16(7):61.
54. Ralto KM, Parikh SM. Mitochondria in Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol*. 2016;36(1):8-16.
55. 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;24(11):1901-12.
56. Malagrino PA, Venturini G, Yogi PS, Dariolli R, Padilha K, Kiers B, et al. Metabolomic characterization of renal ischemia and reperfusion in a swine model. *Life Sci*. 2016;156:57-67.
57. Ma B, Liu J, Zhang Q, Ying H, A J, Sun J, et al. Metabolomic profiles delineate signature metabolic shifts during estrogen deficiency-induced bone loss in rat by GC-TOF/MS. *PLoS One*. 2013;8(2):e54965.
58. Chen SY, Yu HT, Kao JP, Yang CC, Chiang SS, Mishchuk DO, et al. An NMR metabolomic study on the effect of alendronate in ovariectomized mice. *PLoS One*. 2014;9(9):e106559.
59. You YS, Lin CY, Liang HJ, Lee SH, Tsai KS, Chiou JM, et al. Association between the metabolome and low bone mineral density in Taiwanese women determined by (1)H NMR spectroscopy. *J Bone Miner Res*. 2014;29(1):212-22.
60. Miyamoto T, Hirayama A, Sato Y, Koboyashi T, Katsuyama E, Kanagawa H, et al. A serum metabolomics-based profile in low bone mineral density postmenopausal women. *Bone*. 2017;95:1-4.
61. Niwa T, Takeda N, Tatematsu A, Maeda K. Accumulation of indoxyl sulfate, an inhibitor of drug-binding, in uremic serum as demonstrated by internal-surface reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem*. 1988;34(11):2264-7.
62. Mozar A, Louvet L, Godin C, Mentaverri R, Brazier M, Kamel S, et al. Indoxyl sulphate inhibits osteoclast differentiation and function. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(6):2176-81.

63. Nii-Kono T, Iwasaki Y, Uchida M, Fujieda A, Hosokawa A, Motojima M, et al. Indoxyl sulfate induces skeletal resistance to parathyroid hormone in cultured osteoblastic cells. *Kidney Int.* 2007;71(8):738-43.
64. Goto S, Fujii H, Hamada Y, Yoshiya K, Fukagawa M. Association between indoxyl sulfate and skeletal resistance in hemodialysis patients. *Ther Apher Dial.* 2010;14(4):417-23.
65. Barreto FC, Barreto DV, Canziani ME, Tomiyama C, Higa A, Mozar A, et al. Association between indoxyl sulfate and bone histomorphometry in pre-dialysis chronic kidney disease patients. *J Bras Nefrol.* 2014;36(3):289-96.
66. Kasap M, Yegenaga I, Akpinar G, Tuncay M, Aksoy A, Karaoz E. Comparative Proteome Analysis of hAT-MSCs Isolated from Chronic Renal Failure Patients with Differences in Their Bone Turnover Status. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142934.
67. Da Silva Martins J, Castro JH, Sainz Rueda NA, Dos Reis LM, Jorgetti V, Affonso Moyses RM, et al. Renal osteodystrophy in the obesity era: Is metabolic syndrome relevant? *PLoS One.* 2017;12(7):e0180387.
68. Padilha K, Venturini, G., de Farias Pires, T. et al. Serum metabolomics profile of type 2 diabetes mellitus in a Brazilian rural population. *Metabolomics.* 2016;12(156):11.
69. Hernandez JD, Wesseling K, Pereira R, Gales B, Harrison R, Salusky IB. Technical approach to iliac crest biopsy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3 Suppl 3:S164-9.
70. Melsen F, Mosekilde L. Tetracycline double-labeling of iliac trabecular bone in 41 normal adults. *Calcif Tissue Res.* 1978;26(2):99-102.
71. Dos Reis LM, Batalha JR, Munoz DR, Borelli A, Correa PH, Carvalho AB, et al. Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex, and race. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(6):400-6.
72. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The human serum metabolome. *PLoS One.* 2011;6(2):e16957.
73. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. The handbook of metabonomics and metabolomics. 1st ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier; 2007. x, 561 p. p.
74. Young VR, Munro HN. Ntau-methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: an overview. *Fed Proc.* 1978;37(9):2291-300.

75. Aranibar N, Vassallo JD, Rathmacher J, Stryker S, Zhang Y, Dai J, et al. Identification of 1- and 3-methylhistidine as biomarkers of skeletal muscle toxicity by nuclear magnetic resonance-based metabolic profiling. *Anal Biochem.* 2011;410(1):84-91.
76. 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;8(8):e71199.
77. Zhang ZH, Chen H, Vaziri ND, Mao JR, Zhang L, Bai X, et al. Metabolomic Signatures of Chronic Kidney Disease of Diverse Etiologies in the Rats and Humans. *J Proteome Res.* 2016;15(10):3802-12.
78. Allred KF, Yackley KM, Vanamala J, Allred CD. Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee beans. *J Nutr.* 2009;139(10):1833-8.
79. Al-Habori M, Raman A, Lawrence MJ, Skett P. In vitro effect of fenugreek extracts on intestinal sodium-dependent glucose uptake and hepatic glycogen phosphorylase A. *Int J Exp Diabetes Res.* 2001;2(2):91-9.
80. Corol DI, Ravel C, Raksegi M, Bedo Z, Charmet G, Beale MH, et al. Effects of genotype and environment on the contents of betaine, choline, and trigonelline in cereal grains. *J Agric Food Chem.* 2012;60(21):5471-81.
81. Defernez M, Gunning YM, Parr AJ, Shepherd LV, Davies HV, Colquhoun IJ. NMR and HPLC-UV profiling of potatoes with genetic modifications to metabolic pathways. *J Agric Food Chem.* 2004;52(20):6075-85.
82. Guertin KA, Moore SC, Sampson JN, Huang WY, Xiao Q, Stolzenberg-Solomon RZ, et al. Metabolomics in nutritional epidemiology: identifying metabolites associated with diet and quantifying their potential to uncover diet-disease relations in populations. *Am J Clin Nutr.* 2014;100(1):208-17.
83. Guertin KA, Lofffield E, Boca SM, Sampson JN, Moore SC, Xiao Q, et al. Serum biomarkers of habitual coffee consumption may provide insight into the mechanism underlying the association between coffee consumption and colorectal cancer. *Am J Clin Nutr.* 2015;101(5):1000-11.
84. Rothwell JA, Fillatre Y, Martin JF, Lyan B, Pujos-Guillot E, Fezeu L, et al. New biomarkers of coffee consumption identified by the non-targeted metabolomic profiling of cohort study subjects. *PLoS One.* 2014;9(4):e93474.

85. Zhou J, Chan L, Zhou S. Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease. *Curr Med Chem*. 2012;19(21):3523-31.
86. Rios JL, Francini F, Schinella GR. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Planta Med*. 2015;81(12-13):975-94.
87. Hamden K, Mnafigui K, Amri Z, Aloulou A, Elfeki A. Inhibition of key digestive enzymes related to diabetes and hyperlipidemia and protection of liver-kidney functions by trigonelline in diabetic rats. *Sci Pharm*. 2013;81(1):233-46.
88. Won AJ, Kim S, Kim YG, Kim KB, Choi WS, Kacew S, et al. Discovery of urinary metabolomic biomarkers for early detection of acute kidney injury. *Mol Biosyst*. 2016;12(1):133-44.
89. Jhee JH, Nam KH, An SY, Cha MU, Lee M, Park S, et al. Effects of Coffee Intake on Incident Chronic Kidney Disease: Community-Based Prospective Cohort Study. *Am J Med*. 2018.
90. Nehlig A. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. *Pharmacol Rev*. 2018;70(2):384-411.
91. Derry CJ, Derry S, Moore RA. Caffeine as an analgesic adjuvant for acute pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(12):CD009281.
92. Hasuike Y, Nonoguchi H, Tokuyama M, Hata R, Kitamura R, Hori K, et al. Pathological role of aminolevulinate in uremic patients. *Ther Apher Dial*. 2011;15(1):28-33.
93. da Silva AC, Rocha JB, Morsch AL, Zanin RF, Kaizer R, Maldonado PA, et al. Oxidative stress and delta-ALA-D activity in chronic renal failure patients. *Biomed Pharmacother*. 2007;61(2-3):180-5.
94. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(7):1258-70.
95. Teerlink T, Hennekes MW, Mulder C, Brulez HF. Determination of dimethylamine in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;691(2):269-76.
96. Aronov PA, Luo FJ, Plummer NS, Quan Z, Holmes S, Hostetter TH, et al. Colonic contribution to uremic solutes. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(9):1769-76.

97. Zhang AQ, Mitchell SC, Ayesh R, Smith RL. Dimethylamine formation in man. *Biochem Pharmacol*. 1993;45(11):2185-8.
98. Kielstein JT, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: a novel marker of risk and a potential target for therapy in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(6):609-15.
99. Shafi T, Powe NR, Meyer TW, Hwang S, Hai X, Melamed ML, et al. Trimethylamine N-Oxide and Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(1):321-31.
100. Koyama K, Ito A, Yamamoto J, Nishio T, Kajikuri J, Dohi Y, et al. Randomized controlled trial of the effect of short-term coadministration of methylcobalamin and folate on serum ADMA concentration in patients receiving long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 2010;55(6):1069-78.
101. Sekula P, Goek ON, Quaye L, Barrios C, Levey AS, Romisch-Margl W, et al. A Metabolome-Wide Association Study of Kidney Function and Disease in the General Population. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(4):1175-88.
102. Titan SM, Venturini G, Padilha K, Tavares G, Zatz R, Bensenor I, et al. Metabolites related to eGFR: Evaluation of candidate molecules for GFR estimation using untargeted metabolomics. *Clin Chim Acta*. 2018.
103. Gaut JP, Crimmins DL, Ohlendorf MF, Lockwood CM, Griest TA, Brada NA, et al. Development of an immunoassay for the kidney-specific protein myo-inositol oxygenase, a potential biomarker of acute kidney injury. *Clin Chem*. 2014;60(5):747-57.
104. Yang B, Liu D, Li CZ, Liu FY, Peng YM, Jiang YS. 1-Methylhydantoin cytotoxicity on renal proximal tubular cells in vitro. *Ren Fail*. 2007;29(8):1025-9.
105. Martin-Lorenzo M, Zubiri I, Maroto AS, Gonzalez-Calero L, Posada-Ayala M, de la Cuesta F, et al. KLK1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery. *Metabolomics*. 2015;11(5):1056-67.
106. Baylis C. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006;2(4):209-20.
107. Duranton F, Lundin U, Gayrard 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;9(1):37-45.

108. Felizardo RJ, Castoldi A, Andrade-Oliveira V, Camara NO. The microbiota and chronic kidney diseases: a double-edged sword. *Clin Transl Immunology*. 2016;5(6):e86.
109. Zhang F, Masania J, Anwar A, Xue M, Zehnder D, Kanji H, et al. The uremic toxin oxythiamine causes functional thiamine deficiency in end-stage renal disease by inhibiting transketolase activity. *Kidney Int*. 2016;90(2):396-403.
110. Moradi H, Said HM. Functional thiamine deficiency in end-stage renal disease: malnutrition despite ample nutrients. *Kidney Int*. 2016;90(2):252-4.
111. Huang C, Kim Y, Caramori ML, Moore JH, Rich SS, Mychaleckyj JC, et al. Diabetic nephropathy is associated with gene expression levels of oxidative phosphorylation and related pathways. *Diabetes*. 2006;55(6):1826-31.
112. Noh H, Kim JS, Han KH, Lee GT, Song JS, Chung SH, et al. Oxidative stress during peritoneal dialysis: implications in functional and structural changes in the membrane. *Kidney Int*. 2006;69(11):2022-8.
113. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Gorny X, Eleftheriadis T, Mertens PR. Oxidative Stress in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis: A Current Review of the Literature. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:3494867.
114. Salam S, Gallagher O, Gossiel F, Paggiosi M, Khwaja A, Eastell R. Diagnostic Accuracy of Biomarkers and Imaging for Bone Turnover in Renal Osteodystrophy. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(5):1557-65.
115. Razak MA, Begum PS, Viswanath B, Rajagopal S. Multifarious Beneficial Effect of Nonessential Amino Acid, Glycine: A Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1716701.
116. McMahon GM, Hwang SJ, Clish CB, Tin A, Yang Q, Larson MG, et al. Urinary metabolites along with common and rare genetic variations are associated with incident chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2017;91(6):1426-35.
117. Li L, Wang C, Yang H, Liu S, Lu Y, Fu P, et al. Metabolomics reveal mitochondrial and fatty acid metabolism disorders that contribute to the development of DKD in T2DM patients. *Mol Biosyst*. 2017;13(11):2392-400.
118. Adeva-Andany M, Souto-Adeva G, Ameneiros-Rodriguez E, Fernandez-Fernandez C, Donapetry-Garcia C, Dominguez-Montero A. Insulin resistance and glycine metabolism in humans. *Amino Acids*. 2018;50(1):11-27.

119. Engelke UF, Tangerman A, Willemsen MA, Moskau D, Loss S, Mudd SH, et al. Dimethyl sulfone in human cerebrospinal fluid and blood plasma confirmed by one-dimensional (1)H and two-dimensional (1)H-(13)C NMR. *NMR Biomed.* 2005;18(5):331-6.
120. Butawan M, Benjamin RL, Bloomer RJ. Methylsulfonylmethane: Applications and Safety of a Novel Dietary Supplement. *Nutrients.* 2017;9(3).
121. Sousa-Lima I, Park SY, Chung M, Jung HJ, Kang MC, Gaspar JM, et al. Methylsulfonylmethane (MSM), an organosulfur compound, is effective against obesity-induced metabolic disorders in mice. *Metabolism.* 2016;65(10):1508-21.
122. Luck M, Bertho G, Bateson M, Karras A, Yartseva A, Thervet E, et al. Rule-Mining for the Early Prediction of Chronic Kidney Disease Based on Metabolomics and Multi-Source Data. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166905.
123. Joung YH, Lim EJ, Darvin P, Chung SC, Jang JW, Do Park K, et al. MSM enhances GH signaling via the Jak2/STAT5b pathway in osteoblast-like cells and osteoblast differentiation through the activation of STAT5b in MSCs. *PLoS One.* 2012;7(10):e47477.
124. Joung YH, Darvin P, Kang DY, Sp N, Byun HJ, Lee CH, et al. Methylsulfonylmethane Inhibits RANKL-Induced Osteoclastogenesis in BMMs by Suppressing NF-kappaB and STAT3 Activities. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159891.
125. Kim JA, Choi HJ, Kwon YK, Ryu DH, Kwon TH, Hwang GS. 1H NMR-based metabolite profiling of plasma in a rat model of chronic kidney disease. *PLoS One.* 2014;9(1):e85445.
126. Posada-Ayala M, Zubiri I, Martin-Lorenzo M, Sanz-Maroto A, Molero D, Gonzalez-Calero L, et al. Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2014;85(1):103-11.
127. Phisitkul S, Khanna A, Simoni J, Broglio K, Sheather S, Rajab MH, et al. Amelioration of metabolic acidosis in patients with low GFR reduced kidney endothelin production and kidney injury, and better preserved GFR. *Kidney Int.* 2010;77(7):617-23.
128. Hallan S, Afkarian M, Zelnick LR, Kestenbaum B, Sharma S, Saito R, et al. Metabolomics and Gene Expression Analysis Reveal Down-regulation of the

Citric Acid (TCA) Cycle in Non-diabetic CKD Patients. *EBioMedicine*. 2017;26:68-77.

129. Wu Q, Lai X, Zhu Z, Hong Z, Dong X, Wang T, et al. Evidence for Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder Associated With Metabolic Pathway Changes. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(32):e1273.

130. Drueke TB, Massy ZA. Changing bone patterns with progression of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2016;89(2):289-302.

131. Elshaghabee FM, Bockelmann W, Meske D, de Vrese M, Walte HG, Schrezenmeir J, et al. Ethanol Production by Selected Intestinal Microorganisms and Lactic Acid Bacteria Growing under Different Nutritional Conditions. *Front Microbiol*. 2016;7:47.

132. Gaddini GW, Turner RT, Grant KA, Iwaniec UT. Alcohol: A Simple Nutrient with Complex Actions on Bone in the Adult Skeleton. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016;40(4):657-71.

133. Rhee EP, Souza A, Farrell L, Pollak MR, Lewis GD, Steele DJ, et al. Metabolite profiling identifies markers of uremia. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(6):1041-51.

134. Fernandez-Prado R, Esteras R, Perez-Gomez MV, Gracia-Iguacel C, Gonzalez-Parra E, Sanz AB, et al. Nutrients Turned into Toxins: Microbiota Modulation of Nutrient Properties in Chronic Kidney Disease. *Nutrients*. 2017;9(5).

135. Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(4 Suppl 4):S4-12.

136. Kalim S, Wald R, Yan AT, Goldstein MB, Kiaii M, Xu D, et al. Extended Duration Nocturnal Hemodialysis and Changes in Plasma Metabolite Profiles. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(3):436-44.

137. Hothi DK, Geary DF, Fisher L, Chan CT. Short-term effects of nocturnal haemodialysis on carnitine metabolism. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(9):2637-41.

138. Silverio R, Laviano A, Rossi Fanelli F, Seelaender M. I-carnitine and cancer cachexia: Clinical and experimental aspects. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011;2(1):37-44.

139. Wasserstein AG. L-carnitine supplementation in dialysis: treatment in quest of disease. *Semin Dial*. 2013;26(1):11-5.

140. Patano N, Mancini L, Settanni MP, Strippoli M, Brunetti G, Greco G, et al. L: -carnitine fumarate and isovaleryl-L: -carnitine fumarate accelerate the recovery of bone volume/total volume ratio after experimentally induced osteoporosis in pregnant mice. *Calcif Tissue Int.* 2008;82(3):221-8.
141. Colucci S, Mori G, Vaira S, Brunetti G, Greco G, Mancini L, et al. L-carnitine and isovaleryl L-carnitine fumarate positively affect human osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2005;76(6):458-65.

APÊNDICE

Artigo submetido à revista *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* (CJASN).

Serum metabolomics might improve the diagnosis of renal osteodystrophy

Aline L. Baptista, MD¹, Kallyandra Padilha², Pamella A. Malagrino², Gabriela V. da Silva², Ana C. de M. Zeri³, Luciene M. dos Reis¹, Janaina da S. Martins, MD, PhD⁴, Vanda Jorgetti, MD, PhD¹, Silvia M. Titan, MD, PhD¹, Alexandre da C. Pereira, MD, PhD², Rosa M. A. Moyses, MD, PhD¹.

1. Laboratório de Investigação Médica / LIM 16, Nephrology Division, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

2. Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular / LIM 13, Instituto do Coração (INCOR), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

3. Biosciences National Laboratory, LNBio, Campinas, SP, Brazil

4. Nephrology, Department of Internal Medicine, Faculdade de Medicina Botucatu Univ. Estadual Paulista-UNESP. Botucatu, Brazil; Department of Medicine, Universidade Estadual de Maringa, Maringa, Brazil

Corresponding author: Aline L. Baptista

Address: Av. Dr. Arnaldo, 455, 3rd floor, room 3342. Cerqueira César, São Paulo - SP, 01246-903.

Telephone number: +55 11 3061-7260 / 7464

E-mail: aline.baptista@hc.fm.usp.br

Word count - abstract: 255

Word count - manuscript: 2640

Abstract

Background and objectives: Bone biopsy is still the gold standard to assess bone turnover (T), mineralization (M) and volume (V) in CKD patients, and serum biomarkers are not able to replace histomorphometry. Recently, metabolomics has emerged as a new technique that could allow for the identification of new biomarkers useful for disease diagnosis or understanding of pathophysiologic mechanisms, but it has never been assessed in the CKD-MBD scenario. In this study, we investigated the association between serum metabolites and the bone TMV classification in ESRD patients.

Design, setting, participants, and measurements: Serum NMR-spectroscopy and bone biopsy among 51 hemodialysis patients from a single center in Brazil.

Results: High T was identified in 21 patients and was associated with higher levels of dimethyl sulfone, glycine, citrate and N-acetylornithine. ROC curve for the combination of parathormone and these metabolites provided an AUC of 0.86 (0.76-0.97). Abnormal M was identified in 30 patients and was associated with lower ethanol. AUC for age, diabetes mellitus and ethanol was 0.82 (0.70-0.96). Low V was identified in 17 patients and was associated with lower carnitine. The association of age, phosphate and carnitine provided an AUC of 0.83 (0.70-0.96). Although differences among the curves by adding selected metabolites to traditional models were not statistically significant, the accuracy for the diagnosis of TMV classification seemed to be improved.

Conclusions: This is the first study to evaluate the TMV classification system in relation to the serum metabolome assessed by NMR-spectroscopy, showing that selected metabolites may help in the evaluation of bone phenotypes in CKD-MBD.

Introduction

CKD-MBD is one of the main complications of CKD, universally occurring in those with CKD 3-5 (1, 2). It impacts not only bone metabolism, causing renal osteodystrophy, but has systemic effects, with increased risk of vascular calcification (3), uremic arteriopathy (4), cardiovascular disease and mortality (5).

Renal osteodystrophy is heterogeneous and complex, including several bone manifestations related to different pathophysiological mechanisms and clinical risks. KDIGO (6, 7) currently recommends use of the TMV classification (T for bone turnover, M for bone mineralization, and V for bone volume). These parameters are then combined to guide therapy (8). Renal osteodystrophy diagnosis still relies on the performance of a bone biopsy, since no serum or urinary biomarker has been shown to have an accurate performance (6, 9).

Metabolomics is a technique that allows for the simultaneous identification and quantification of metabolites, i.e, small molecules typically with a molecular weight < 900 daltons. Bone metabolome may yield new biomarkers of disease, as well as indicate molecules and paths involved in pathophysiology. So far, metabolomics studies assessing bone disease have been few, restricted to non-CKD populations with osteoporosis (10, 11).

The objective of our study was to generate preliminary data on the association of serum metabolites with bone disease defined by the TMV classification.

Sample and methods

Study population

The population sample was composed of 51 subjects with ESRD under hemodialysis (HD) therapy. The patients were recruited from a cross-sectional study that included hemodialysis patients from the Botucatu Medical School Hospital, State University of São Paulo (UNESP) that were evaluated for metabolic syndrome and bone histomorphometry (12). Exclusion criteria were being younger than 18 years, recent start of dialysis treatment (last 6 months), active cancer, advanced liver disease, or use of glucocorticoids, immunosuppressive or antiretroviral drugs in the past 6 months. Dialysis was performed 3 times a week in 4 hours-session. All patients provided written informed consent for the study and bone biopsy, and the study protocol was reviewed and approved by the local and national ethics boards (Cappesq 0046/08 and Plataforma Brasil 3445-2010, respectively).

Serum was collected after 12 hours of fasting on a non-dialysis day. Aliquots were stored at -80°C. Serum levels of total calcium, phosphorus and albumin were obtained through the automated Sinnova SX400. The intact PTH (iPTH) was analyzed by the chemiluminescence technique (Medlab, USA, reference values: 16-87 pg/mL), as well as 25-hydroxyvitamin D (chemiluminescence, DiaSorin™, USA, reference values: 30-100 ng/mL). Serum levels of creatinine, fasting glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL) and triglycerides were obtained through standardized techniques.

Bone Biopsy

Bone biopsy was performed on the iliac crest with an electric trephine, with an internal diameter of 7 mm, under local anesthesia with lidocaine 2% and sedation with intramuscular midazolam. Previously to biopsy, participants received 2 courses of tetracycline (20mg/kg/day) for 3 days, separated by 10 days off medication. The biopsy was performed 2 to 5 days after the end of the antibiotic. The undecalcified bone core was processed using a standardized technique (13).

Histomorphometric analysis was performed using a semi-automated method with Osteomeasure software (Osteometrics Inc., Atlanta, GA, USA). The results of bone histomorphometry were categorized according to TMV classification system described by Moe et al. (7). Normal turnover was considered when the bone formation rate (BFR/BS) was $0.07 \pm 0.03 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ for women and $0.13 \pm 0.07 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ for men. Participants were then classified as having low bone turnover (lower than -1 SD of the mean reference value) or high bone turnover bone (greater than +1 SD of the mean reference value) (14). Mineralization was classified as normal or abnormal (mineralization lag time over 50 days). Bone volume was classified as low or normal according to the bone trabecular volume (BV/TV) cut-off value of -1 SD of the mean reference value ($21.8 \pm 7.2\%$ for women and $24.0 \pm 6.1\%$ for men) (15).

Metabolomics protocol

Our protocol was based on previous studies performed by Beckonert et al. (16) and Malagrino et al. (17). The selected serum samples underwent deproteinization using ultrafiltration devices Amicon Ultra 0.5 (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland) to remove high molecular weight such as proteins and lipids. The filter membranes before used were washed with deionized water (30 minutes per cycle, $13,680 \times G$ at 4°C), and this process was repeated 4 times, so that the membrane bound residual glycerol was removed. After removing the residual water from the membrane, $350\mu\text{L}$ of thawed sample was added, followed by 2 hours of refrigerated centrifugation (4°C) at $13,680 \times G$. After ultrafiltration, the samples were stored in -80°C freezer until the time of NMR analysis. Thus, the serum filtrate ($200\mu\text{L}$) was diluted in $280\mu\text{L}$ of deionized water, mixed with $60\mu\text{L}$ of phosphate buffer (1M pH 7.4), 5 mM of TSP (3-Trimethylsilyl propionic acid- d_4 sodium salt (# 269913, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and $60\mu\text{L}$ of deuterium oxide (D_2O 99% Sigma; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, MA, USA). Samples were added into 5 mm proton nuclear magnetic resonance (^1H -NMR) tubes for immediate acquisition.

NMR Acquisition

One-dimensional (1D) ^1H NMR spectra were acquired using an Inova NMR AS 600 spectrometer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) equipped with a 5mm cryogenic probe, operating at 599.844 MHz frequency and constant temperature of 298 K (25°C). Standard pre-saturation pulse sequence was performed for water suppression with solvent irradiation on the relaxation delay of 1.5 s and mixing time of 100 ms. NMR spectra were acquired using 256 scans with 64 k points and a spectral width of 13.3 ppm, an acquisition time of 4 s, and a total pulse recycle delay of 5.42 s. The FIDs were multiplied by an exponential function corresponding to a 0.3 Hz line broadening prior to Fourier transformation. Spectral phase, baseline correction and metabolites identification and quantification were performed using Chenomx NMR Suite 7.6 (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canada), a commercial spectral fitting software containing an NMR spectral reference library of 304 compounds.

Statistical analysis

Univariate analysis for clinical and biochemical parameters was done using Mann-Whitney and chi-square tests. NMR Metabolomics identified 64 metabolites (Supplementary Table 1), with 0.7% missing values. Missing values were replaced by half of the minimum positive value of the sample distribution. Metabolites were log-transformed (generalized log transformation) and evaluated first through primary component analysis (PCA), which showed 5 extreme outliers. These were excluded, leaving 46 participants for the remaining analysis.

We next performed partial least square discriminant analysis (PLS-DA) and t tests according to the TMV classification, as defined above. Selected metabolites were then re-assessed in univariable and multivariable logistic regression models (using log base 2 metabolites for easiness of interpretation). Receiver operating curves (ROC) were built in order to evaluate the performance of selected metabolites in the identification of the TMV classification in comparison to models based on clinical and/or laboratorial variables related to the bone phenotype, using C statistics. All tests were bi-causal and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant, without adjustment for multiple comparisons. PCA, PLS-DA and t tests for metabolites

were done using MetaboloAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Descriptive clinical data and logistic regression models were done using SPSS 25.0. Box plots and ROC curves were done using R (packages ggplot2, pROC).

Results

Among the 46 participants, median age was 58 years, 54% of participants were male and 39% were diabetic (Table 1). Median iPTH was high (866 pg/mL), and median time on dialysis was 52 months. In terms of bone biopsy, high turnover bone disease was diagnosed in 21 (46%), abnormal mineralization in 30 (65%) and low bone volume in 17 (37%).

Table 1 also shows clinical and laboratorial characteristics according to the TMV classification. Among the 21 high turnover participants, calcium, phosphorus and iPTH were higher in comparison to those with low bone turnover. There were no differences in clinical and laboratorial characteristics when comparing those with normal and abnormal mineralization. Participants with low trabecular bone volume had lower BMI, lower calcium, lower phosphorus and triglycerides (and a trend to lower HDL) in comparison to those with normal bone volume.

Metabolites - Turnover

The PLS-DA analysis comparing those with high versus those with low bone turnover is shown in Supplementary Figure 1-A and VIP scores are shown in Figure 1-A. The top metabolites (VIP above 1.5) associated with bone turnover were acetone, dimethyl sulfone, glycine, ethanol, citrate, 2-hydroxyisobutyrate, acetate and 3-hydroxyisovalerate. When the individual metabolites were considered, only glycine ($p=0.004$), n-acetylmethionine ($p=0.01$), dimethyl sulfone ($p=0.01$) and citrate (0.02) were different between the two groups, being higher in the high turnover participants (Figure 2).

The univariable logistic regression models confirmed these findings (Table 2-A). In model 1, all 4 metabolites (glycine, n-acetylmethionine, dimethyl sulfone and citrate) were entered in the model and only dimethyl sulfone and citrate remained related to bone turnover. This result persisted after adding PTH to the model (model 2). In Figure 3-A, we show the performance of logistic regression models including 1 to 4 metabolites for bone turnover phenotype in

comparison to a model based solely on PTH. The addition of dimethyl sulfone to the PTH model did not increase considerably the AUC, but a moderate increase was observed when dimethyl sulfone, glycine and citrate were added (from 0.70 to 0.85). All these differences, however, were not statistically significant.

Metabolites – Bone Mineralization

The PLS-DA analysis comparing normal versus abnormal mineralization is shown in Supplementary Figure 1-B. The top metabolites were acetone, ethanol, dimethyl sulfone, 2-hydroxyvalerate, xanthine, malonate, 3-hydroxyisovalerate, glycine and acetate (Figure 1-B). In the univariable analysis, only ethanol, dimethyl sulfone and malonate were significantly higher in patients with normal mineralization compared with those with abnormal mineralization (Figure 2). The logistic regression models showed that only ethanol remained significantly associated with mineralization after adjustment for selected metabolites (Table 2). Ethanol added some performance to the diagnosis of abnormal mineralization in relation to age and diabetes (from 0.68 to 0.82), although this difference was not statistically significant (Figure 3-B).

Metabolites – Bone Volume

The PLS-DA is shown in Supplementary Figure 1-C and the VIP scores are shown in Figure 1-C. The top metabolites for discrimination were creatine, carnitine, urea, methylamine, 2-hydroxyisovalerate, guanidoacetate, 3-hydroxyisovalerate, NN-dimethylglycine, glucose, O-Acetylcarnitine and creatinine. In the univariate analysis, serum concentrations of carnitine, urea, trimethylamine, O-acetylcarnitine, NN-dimethylglycine and creatinine were lower in patients with low in comparison to those with normal volume (Figure 2). Again, these results were confirmed in the univariate logistic regression models (Table 2), but only carnitine remained significantly related to bone volume after adjustment for other metabolites (model 1) and for phosphorus and age (model 2). ROC analysis showed that adding carnitine to a model based on age and phosphorus improved the AUC (from 0.72 to 0.83), although this was not statistically significant (Figure 3-C). Adding the other 5 metabolites

(urea, trimethylamine, O-acetylcarnitine, NN-dimethylglycine and creatinine) did not improve the model.

Discussion

Renal osteodystrophy diagnosis is still dependent on the performance of a bone biopsy, which allows for the measurements of the TMV classification. However, for several reasons, this procedure is not widely performed, therefore limiting our ability to diagnose and follow treatment effects on the bone manifestations of CKD. In this sense, the search of serum biomarkers of disease could be of great benefit. In this study, we explored metabolomics in relation to its association to the TMV classification of bone disease in CKD. Our results point to some metabolites that could potentially have a role in the diagnosis of these conditions.

The PLS-DAs showed a reasonable ability to discriminate bone turnover, mineralization and volume, suggesting metabolomic signatures are present in these conditions. When we analyzed individual metabolites, dimethyl sulfone, citrate, glycine and N-acetylmethionine were higher in those with high turnover disease. Dimethyl sulfone was the only metabolite that showed to be related to turnover independently from the other metabolites. In the ROC curve, however, dimethyl sulfone did not considerably improve the performance in relation to a model based solely on PTH. The addition of 2 metabolites more (glycine and citrate) had the best performance, although the difference to the reference model was not statistically significant. It is interesting to note that iPTH alone did not present a good performance for diagnosing bone turnover, a finding that is in accordance with previous studies (9, 18).

In our study, mineralization was associated with lower values of ethanol. No clinical or laboratorial variables were different between participants with and without mineralization defect, and the discriminative performance of these variables for mineralization was very poor. Age and diabetes are known factors to affect bone health (19) and were chosen as the reference model for predicting mineralization. Adding ethanol to the model seemed to improve the accuracy for the diagnosis of mineralization defect, although this difference did not reach statistical significance.

For bone volume, our results showed association to several metabolites. It is of note that some of the top metabolites identified by PLS-DA are related to common pathways: the arginine pathway (for guanidoacetic acid, creatine, creatinine and urea), the methane pathway (trimethylamine and methylamine), in addition to carnitine and O-acetylcarnitine. Carnitine was the only metabolite that remained significantly associated with bone volume in adjusted models, showing a moderate performance to predict low bone volume when combined to age and phosphorus.

The mechanisms underlying the associations observed could not be addressed in our study. Hypothesis can be made but need further exploration and testing. Carnitine is derived from food sources and endogenous metabolism and has a role in fatty acid oxidation (20). It is also metabolized by the gut microbiota to trimethylamine (TMA). It is associated with sarcopenia and is commonly deficient in hemodialysis patients (21, 22) and other diseases (23). In experimental studies, it has been shown to improve bone volume and osteoblast proliferation and differentiation (24, 25). Ethanol is a biomarker of alcohol consumption and can be produced in small quantities by the intestinal microflora through anaerobic fermentation (26). Light to moderate alcohol consumption has been associated to higher bone mineral density, whereas heavy consumption seems to have the opposite effect (27). However, the meaning of decreased ethanol levels in CKD has not been studied, and it is not known whether ethanol is related to changes in the microbiome in CKD. Glycine is a major component of collagen and its association to high turnover disease could be a consequence of higher collagen reabsorption. *In vitro* studies have shown that dimethyl sulfone may promote osteogenic differentiation in primary bone marrow mesenchymal stem cells (28). Citrate is a major metabolite on energy metabolism. A study comparing patients with iPTH 150-300 pg/mL with patients with iPTH >300 pg/mL showed higher serum values of 4 intermediate metabolites of the tricarboxylic acid cycle in those with higher iPTH values (29). However, previous studies have also shown that several of these metabolites (glycine, dimethyl sulfone, citrate and carnitine) are associated with CKD and /or eGFR (30-33), and therefore other determinants may confound the associations observed.

Our study presents several limitations. First, our sample was small, which limits our statistical power and may lead to overfitting of regression models. In addition, we did not use FDR-adjusted p values, a fact that increases the likelihood of false-positive results. Second, we could not adjust for residual renal function or run models with more adjustments. However, KtV was available for most participants and was not different between TMV groups. Third, we used NMR-spectroscopy, a method that brings the advantage of a more reliable quantitative measure of metabolites, but limited in terms of numbers of metabolites being captured in comparison to GC or LC. All these limitations imply that our results are more hypothesis-generating than conclusive, with need of replication and validation. However, this is the first study to evaluate metabolomics in renal osteodystrophy.

In summary, our results suggest some potential metabolites related to turnover, bone volume and mineralization in CKD patients on hemodialysis. Further studies are needed to validate these findings and test the accuracy of these biomarkers in a larger population.

Disclosures

None.

Acknowledgments

VJ and RMAM are financially supported by CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant numbers 303684/ 2013-5 and 304249/2013-0, respectively). ALB received a personal grant from CNPq (162733/2015-1). This financial support had no role in study design; collection, analysis, and interpretation of data; writing the report; and the decision to submit the report for publication. We acknowledge the Nuclear Magnetic Resonance at Biosciences National Laboratory (LNBio), CNPEM, Campinas, Brazil for the use of the 600 MHz Agilent Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer.

References

1. Graciolli FG, Neves KR, Barreto F, Barreto DV, Dos Reis LM, Canziani ME, et al. The complexity of chronic kidney disease-mineral and bone disorder across stages of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2017;91(6):1436-46.
2. Inker LA, Grams ME, Levey AS, Coresh J, Cirillo M, Collins JF, et al. Relationship of Estimated GFR and Albuminuria to Concurrent Laboratory Abnormalities: An Individual Participant Data Meta-analysis in a Global Consortium. *Am J Kidney Dis.* 2019;73(2):206-17.
3. Malluche HH, Blomquist G, Monier-Faugere MC, Cantor TL, Davenport DL. High Parathyroid Hormone Level and Osteoporosis Predict Progression of Coronary Artery Calcification in Patients on Dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(10):2534-44.
4. Nigwekar SU, Kroshinsky D, Nazarian RM, Gorman J, Malhotra R, Jackson VA, et al. Calciphylaxis: risk factors, diagnosis, and treatment. *Am J Kidney Dis.* 2015;66(1):133-46.
5. Wang M, Obi Y, Streja E, Rhee CM, Lau WL, Chen J, et al. Association of Parameters of Mineral Bone Disorder with Mortality in Patients on Hemodialysis according to Level of Residual Kidney Function. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(7):1118-27.
6. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD-MBDWG. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney international Supplement.* 2009(113):S1-130.
7. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006;69(11):1945-53.
8. Steller Wagner Martins C, Jorgetti V, Moyses RMA. Time to rethink the use of bone biopsy to prevent fractures in patients with chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2018;27(4):243-50.

9. Sprague SM, Bellorin-Font E, Jorgetti V, Carvalho AB, Malluche HH, Ferreira A, et al. Diagnostic Accuracy of Bone Turnover Markers and Bone Histology in Patients With CKD Treated by Dialysis. *Am J Kidney Dis*. 2016;67(4):559-66.
10. You YS, Lin CY, Liang HJ, Lee SH, Tsai KS, Chiou JM, et al. Association between the metabolome and low bone mineral density in Taiwanese women determined by (1)H NMR spectroscopy. *J Bone Miner Res*. 2014;29(1):212-22.
11. Miyamoto T, Hirayama A, Sato Y, Kobayashi T, Katsuyama E, Kanagawa H, et al. A serum metabolomics-based profile in low bone mineral density postmenopausal women. *Bone*. 2017;95:1-4.
12. Da Silva Martins J, Castro JH, Sainz Rueda NA, Dos Reis LM, Jorgetti V, Affonso Moyses RM, et al. Renal osteodystrophy in the obesity era: Is metabolic syndrome relevant? *PLoS One*. 2017;12(7):e0180387.
13. Hernandez JD, Wesseling K, Pereira R, Gales B, Harrison R, Salusky IB. Technical approach to iliac crest biopsy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3:S164-9.
14. Melsen F, Mosekilde L. Tetracycline double-labeling of iliac trabecular bone in 41 normal adults. *Calcif Tissue Res*. 1978;26(2):99-102.
15. Dos Reis LM, Batalha JR, Munoz DR, Borelli A, Correa PH, Carvalho AB, et al. Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex, and race. *J Bone Miner Metab*. 2007;25(6):400-6.
16. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc*. 2007;2(11):2692-703.
17. Malagrino PA, Venturini G, Yogi PS, Dariolli R, Padilha K, Kiers B, et al. Metabolomic characterization of renal ischemia and reperfusion in a swine model. *Life Sci*. 2016;156:57-67.

18. Salam S, Gallagher O, Gossiel F, Paggiosi M, Khwaja A, Eastell R. Diagnostic Accuracy of Biomarkers and Imaging for Bone Turnover in Renal Osteodystrophy. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(5):1557-65.
19. Drueke TB, Massy ZA. Changing bone patterns with progression of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2016;89(2):289-302.
20. Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(4 Suppl 4):S4-12.
21. Hothi DK, Geary DF, Fisher L, Chan CT. Short-term effects of nocturnal haemodialysis on carnitine metabolism. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(9):2637-41.
22. Kalim S, Wald R, Yan AT, Goldstein MB, Kiaii M, Xu D, et al. Extended Duration Nocturnal Hemodialysis and Changes in Plasma Metabolite Profiles. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(3):436-44.
23. Silverio R, Laviano A, Rossi Fanelli F, Seelaender M. I-carnitine and cancer cachexia: Clinical and experimental aspects. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011;2(1):37-44.
24. Patano N, Mancini L, Settanni MP, Strippoli M, Brunetti G, Greco G, et al. L: -carnitine fumarate and isovaleryl-L: -carnitine fumarate accelerate the recovery of bone volume/total volume ratio after experimentally induced osteoporosis in pregnant mice. *Calcif Tissue Int*. 2008;82(3):221-8.
25. Colucci S, Mori G, Vaira S, Brunetti G, Greco G, Mancini L, et al. L-carnitine and isovaleryl L-carnitine fumarate positively affect human osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2005;76(6):458-65.
26. Elshaghabee FM, Bockelmann W, Meske D, de Vrese M, Walte HG, Schrezenmeir J, et al. Ethanol Production by Selected Intestinal Microorganisms and Lactic Acid Bacteria Growing under Different Nutritional Conditions. *Front Microbiol*. 2016;7:47.

27. Gaddini GW, Turner RT, Grant KA, Iwaniec UT. Alcohol: A Simple Nutrient with Complex Actions on Bone in the Adult Skeleton. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016;40(4):657-71.
28. Joung YH, Lim EJ, Darvin P, Chung SC, Jang JW, Do Park K, et al. MSM enhances GH signaling via the Jak2/STAT5b pathway in osteoblast-like cells and osteoblast differentiation through the activation of STAT5b in MSCs. *PLoS One.* 2012;7(10):e47477.
29. Wu Q, Lai X, Zhu Z, Hong Z, Dong X, Wang T, et al. Evidence for Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder Associated With Metabolic Pathway Changes. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(32):e1273.
30. Kim JA, Choi HJ, Kwon YK, Ryu DH, Kwon TH, Hwang GS. ¹H NMR-based metabolite profiling of plasma in a rat model of chronic kidney disease. *PLoS One.* 2014;9(1):e85445.
31. Li L, Wang C, Yang H, Liu S, Lu Y, Fu P, et al. Metabolomics reveal mitochondrial and fatty acid metabolism disorders that contribute to the development of DKD in T2DM patients. *Mol Biosyst.* 2017;13(11):2392-400.
32. McMahon GM, Hwang SJ, Clish CB, Tin A, Yang Q, Larson MG, et al. Urinary metabolites along with common and rare genetic variations are associated with incident chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2017;91(6):1426-35.
33. 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;8(8):e71199.

Tables and Figures

Table 1. Descriptive characteristics of all participants and according to bone biopsy TMV classification.

	All (n=46)	Turnover			Mineralization			Volume		
		Low (n=25/54%)	High (n=21/46%)	<i>p</i>	Abnormal (n=30/65%)	Normal (n=16/35%)	<i>p</i>	Low (n=17/37%)	Normal (n=29/63%)	<i>p</i>
Age (years)	58 (44 - 64)	57 (44 - 62)	61 (49 - 65)	0.54	56 (44 - 62)	63 (49 - 66)	0.25	59 (56 - 69)	53 (44 - 62)	0.16
Sex (male)	25 (54%)	15 (60%)	10 (48%)	0.40	16 (53%)	9 (56%)	0.85	9 (53%)	16 (55%)	0.88
Race (white)	29 (83%)	16 (89%)	13 (77%)	0.33	19 (91%)	10 (71%)	0.14	13 (87%)	16 (80%)	0.61
Diabetes	18 (39%)	12 (48%)	6 (29%)	0.18	14 (47%)	4 (25%)	0.86	8 (47%)	10 (35%)	0.40
Time on dialysis (mo)	52 (27 - 108)	40 (24 - 84)	72 (33 - 120)	0.41	45 (24 - 84)	78 (35 - 120)	0.28	72 (36 - 84)	36 (24 - 120)	0.16
BMI (kg/m ²)	25.7 (22.7 - 28.8)	25.9 (23.8 - 28.4)	25 (22.1 - 28.8)	0.83	26.4 (23.8 - 29.5)	24.5 (20.8 - 27.9)	0.43	23.8 (20.6 - 27.4)	26.9 (24.1 - 31.0)	0.03
Albumin (g/dL)	3.8 (3.5 - 4.1)	3.8 (3.5 - 4.0)	4.0 (3.6 - 4.1)	0.41	3.8 (3.5 - 4.1)	3.8 (3.6 - 4.0)	0.81	3.7 (3.5 - 4.1)	3.8 (3.6 - 4.0)	0.86
Calcium (mg/dL)	9.3 (8.4 - 10.0)	8.7 (8.2 - 9.5)	9.7 (9.2 - 10.2)	0.01	9.0 (8.3 - 9.7)	9.8 (8.9 - 10.1)	0.14	8.8 (8.3 - 9.5)	9.7 (8.6 - 10.2)	0.05
Phosphate (mg/dL)	5.65 (5.10 - 6.80)	5.4 (4.2 - 6.4)	6.6 (5.4 - 7.4)	0.03	5.7 (4.7 - 6.9)	5.6 (5.1 - 6.8)	0.78	5.1 (4.2 - 5.6)	6.1 (5.4 - 7.7)	0.01
iPTH (pg/mL)	866 (320 - 1628)	507 (191 - 1233)	1374 (392 - 2315)	0.02	866 (316 - 1479)	860 (383 - 2275)	0.39	383 (321 - 1374)	1164 (392 - 1643)	0.38
AP (U/L)	171 (100 - 254)	159 (93 - 196)	185 (131 - 286)	0.11	175 (104 - 241)	144 (110 - 377)	0.95	185 (114 - 219)	159 (100 - 254)	0.44
25-vit. D (ng/mL)	29 (20 - 36)	26 (20 - 33)	32 (21 - 36)	0.54	27 (20 - 35)	30 (20 - 37)	0.71	28 (21 - 37)	30 (20 - 33)	0.66
Glucose (mg/dL)	95 (78 - 149)	99 (78 - 149)	89 (76 - 121)	0.64	91 (77 - 160)	95 (82 - 112)	0.92	99 (83 - 160)	82 (77 - 120)	0.12
Total cholesterol (mg/dL)	135 (114 - 164)	136 (111 - 161)	133 (122 - 164)	0.47	139 (114 - 164)	134 (113 - 168)	0.66	129 (111 - 169)	146 (119 - 163)	0.50
HDL-cholesterol (mg/dL)	40 (31 - 48)	40 (30 - 47)	40 (35 - 49)	0.67	41 (34 - 48)	35 (30 - 47)	0.30	42 (36 - 57)	37 (30 - 46)	0.08
LDL-cholesterol (mg/dL)	59 (39 - 84)	56 (38 - 85)	65 (48 - 83)	0.42	57 (39 - 83)	64 (43 - 90)	0.41	57 (39 - 82)	65 (39 - 85)	0.39
Triglycerides (mg/dL)	122 (94 - 206)	126 (97 - 200)	119 (94 - 206)	0.95	123 (95 - 202)	123 (88 - 208)	0.94	95 (86 - 186)	137 (105 - 234)	0.04
KtV	1.30 (1.17 - 1.54)	1.47 (1.16 - 1.61)	1.26 (1.18 - 1.46)	0.60	1.31 (1.16 - 1.61)	1.28 (1.20 - 1.51)	0.79	1.38 (1.16 - 1.51)	1.27 (1.18 - 1.56)	1.00

Values described as n/% or median/P25-P75. There were 14 missing values for KtV, 11 for race and 2 for LDL and HDL-cholesterol. BMI, body mass index; iPTH, intact parathyroid hormone; AP, alkaline phosphatase; mo, months.

Table 2. Logistic regression models on the TMV classification of 46 participants.

Metabolites (log2)	Unadjusted			Model 1*			Model 2**			
	OR	95% CI	OR	p	OR	95% CI	OR	95% CI	p	
A – TURNOVER										
Glycine	6.94	1.59 - 30.24	0.01		6.31	0.78 - 50.70	0.08	6.18	0.77 - 49.53	0.09
N-Acetylornithine	15.79	1.52 - 164.40	0.02		5.46	0.18 - 162.93	0.33	4.78	0.15 - 156.56	0.38
Dimethyl sulfone	3.98	1.24 - 12.71	0.02		4.88	1.10 - 21.64	0.04	4.89	1.10 - 21.84	0.04
Citrate	4.26	1.17 - 15.60	0.03		6.81	1.16 - 39.96	0.03	6.24	0.95 - 41.08	0.06
B – MINERALIZATION										
Ethanol	0.33	0.12 - 0.89	0.03		0.33	0.11 - 0.99	0.05	0.23	0.07 - 0.82	0.02
Dimethyl sulfone	0.30	0.10 - 0.95	0.04		0.39	0.08 - 1.77	0.22	0.56	0.11 - 3.03	0.50
Malonate	0.20	0.04 - 1.11	0.07		0.61	0.09 - 4.21	0.61	0.49	0.06 - 4.23	0.52
C – VOLUME										
Carnitine	0.06	0.01 - 0.43	0.00		0.06	0.00 - 0.76	0.03	0.07	0.01 - 0.56	0.01
Urea	0.18	0.04 - 0.81	0.02		0.37	0.05 - 2.81	0.34	0.25	0.05 - 1.17	0.08
Trimethylamine	0.13	0.02 - 1.00	0.05		0.63	0.04 - 11.03	0.75	0.14	0.01 - 1.44	0.10
O-acetylcarnitine	0.22	0.05 - 0.99	0.05		1.32	0.10 - 16.53	0.83	0.21	0.04 - 1.14	0.07
NN-Dimethylglycine	0.24	0.06 - 1.03	0.05		0.16	0.02 - 1.18	0.07	0.25	0.05 - 1.38	0.11
Creatinine	0.23	0.05 - 1.03	0.05		2.07	0.17 - 25.06	0.57	0.19	0.03 - 1.09	0.06
Creatine	0.52	0.25 - 1.10	0.09		-	-	-	0.69	0.34 - 1.40	0.30

*Model 1 (adjustment for metabolites): covariates were glycine, N-acetylornithine, dimethyl sulfone and citrate for turnover; ethanol, dimethyl sulfone and malonate for mineralization; and carnitine, urea, trimethylamine, O-acetylornithine, NN-dimethylglycine and creatinine for volume.

**Model 2: for turnover, same as model 1 + PTH; for mineralization, same as model 1 + age and diabetes; for volume, same as model 1 + creatine, age and phosphorus.

Figure 1. VIP scores of metabolites from PLS-DA analysis on the TMV classification.

A - Turnover

B - Mineralization

C - Volume

Figure 2. Box plots for selected metabolites related to bone turnover, mineralization and volume.

Footnote: Boxplots are represented for log-transformed metabolites significantly related to bone turnover (A to D), bone mineralization (E to G) and bone volume (H to L, except for creatinine). Significance was tested with Student's t-test not adjusted for multiple comparisons.

Figure 3. ROC curves of logistic regression models based on selected metabolites (with and without traditional biomarkers) on the TMV classification.

Footnote: ROC curves were built using estimated predicted values of logistic regression models for bone turnover (A), mineralization (B) and bone volume (C). For turnover (A), covariates in models were: model 1, PTH; model 2, PTH, and dimethyl sulfone (DMS); model 3, PTH, dimethyl sulfone, glycine and citrate; model 4, same as model 3 plus N-acetylorcarnitine. C statistics in comparison to model 1 were non-significant ($p=0.64$ for model 2, $p=0.12$ for model 3 and $p=0.10$ for model 4). For mineralization (B), covariates

were: model 1, age and diabetes; model 2, age, diabetes and ethanol; model 3, same as model 2 plus dimethyl sulfone and malonate. C statistics in comparison to model 1 were non-significant ($p=0.16$ for model 2, $p=0.21$ for model 3). For bone volume (C), covariates in models were: model 1, age and phosphorus (P); model 2, age, phosphorus and carnitine; model 3, same as model 2 plus urea, trimethylamine, O-acetylcarnitine, NN-dimethylglycine, creatinine. C statistics in comparison to model 1 were non-significant ($p=0.30$ for model 2, $p=0.25$ for model 3).

Supplementary Material

Supplementary Table 1. List of the 64 metabolites identified through NMR-spectroscopy in the 46 participants.

Metabolites (mg/dL)	Median	P25 - P75
alpha2Aminobutyrate	0.05	(0.04 - 0.06)
alpha2Hydroxybutyrate	0.12	(0.11 - 0.17)
alpha2Hydroxyisobutyrate	0.01	(0.01 - 0.02)
alpha2Hydroxyisovalerate	0.03	(0.02 - 0.04)
alpha2Hydroxyvalerate	0.14	(0.10 - 0.16)
alpha3Hydroxybutyrate	0.21	(0.12 - 0.45)
alpha3Hydroxyisovalerate	0.02	(0.01 - 0.02)
alpha5Aminolevulinate	0.14	(0.10 - 0.17)
Acetate	0.13	(0.10 - 0.20)
Acetone	0.01	(0.01 - 0.02)
Alanine	1.32	(1.05 - 1.49)
Asparagine	0.27	(0.23 - 0.31)
Betaine	0.32	(0.25 - 0.40)
Caffeine	0.08	(0.06 - 0.11)
Carnitine	0.16	(0.13 - 0.18)
Choline	0.13	(0.10 - 0.16)
Citrate	1.34	(1.10 - 1.69)
Creatine	0.13	(0.09 - 0.20)

Metabolites (mg/dL)	Median	P25 - P75
Creatinephosphate	0.28	(0.24 - 0.33)
Creatinine	3.18	(2.29 - 3.74)
Dimethyl sulfone	0.03	(0.03 - 0.05)
Dimethylamine	0.04	(0.04 - 0.05)
Ethanol	0.72	(0.55 - 0.98)
Formate	0.06	(0.05 - 0.07)
Fucose	0.13	(0.11 - 0.16)
Glucose	36.93	(31.22 - 50.73)
Glutamine	3.11	(2.68 - 3.44)
Glycerol	0.67	(0.55 - 0.82)
Glycine	1.12	(0.82 - 1.36)
Glycolate	0.08	(0.07 - 0.10)
Guanidoacetate	0.20	(0.15 - 0.33)
Histidine	0.46	(0.38 - 0.53)
Isobutyrate	0.02	(0.02 - 0.03)
Isoleucine	0.29	(0.24 - 0.37)
Lactate	6.01	(4.65 - 7.73)
Leucine	0.51	(0.41 - 0.60)
Lysine	0.69	(0.58 - 0.82)
Malonate	0.11	(0.09 - 0.12)
Methanol	0.20	(0.17 - 0.25)
Methionine	0.13	(0.11 - 0.14)
Methylamine	0.00	(0.00 - 0.01)
NNDimethylglycine	0.03	(0.02 - 0.04)
NAcetylornithine	0.18	(0.16 - 0.20)

Metabolites (mg/dL)	Median	P25 - P75
NIsovaleroylglycine	0.06	(0.05 - 0.07)
NMethylhydantoin	0.02	(0.01 - 0.02)
OAcetylcarnitine	0.08	(0.06 - 0.09)
Ornithine	0.29	(0.23 - 0.35)
Oxypurinol	0.49	(0.41 - 0.60)
Phenylalanine	0.50	(0.39 - 0.59)
Proline	1.18	(0.99 - 1.48)
Propyleneglycol	0.04	(0.03 - 0.04)
Pyruvate	0.20	(0.14 - 0.26)
Succinate	0.04	(0.04 - 0.05)
Threonate	0.37	(0.26 - 0.48)
Threonine	0.69	(0.58 - 0.83)
Trigonelline	0.10	(0.08 - 0.14)
Trimethylamine	0.00	(0.00 - 0.00)
TrimethylamineNoxide	0.20	(0.13 - 0.26)
Tyrosine	0.34	(0.31 - 0.43)
Urea	7.05	(5.40 - 8.71)
Valine	0.87	(0.70 - 1.03)
Xanthine	0.16	(0.10 - 0.25)
myoInositol	2.12	(1.70 - 2.86)
Tau-Methylhistidine	0.18	(0.15 - 0.21)

Supplementary Figure 1. PLS-DA of metabolites according to the TMV classification in 46 participants.

A - Turnover

B - Mineralization

C - Volume