

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATO ITAMAR DUARTE FONSECA

PERFIL METABOLÔMICO BASEADO EM RMN ¹H DE AMOSTRAS PLASMÁTICAS
DE PACIENTES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

CURITIBA

2022

RENATO ITAMAR DUARTE FONSECA

PERFIL METABOLÔMICO BASEADO EM RMN ¹H DE AMOSTRAS PLASMÁTICAS
DE PACIENTES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki
Coorientadora: Profa. Dra. Andréa Emília Marques Stinghen

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fonseca, Renato Itamar Duarte.

Perfil metabólico baseado em RMN 1H de amostras plasmáticas de pacientes em diferentes estágios da doença renal crônica. / Renato Itamar Duarte Fonseca. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Guilherme Lanzi Sassaki.

Coorientadora: Andréa Emília Marques Stingham.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Insuficiência Renal Crônica. 2. Uremia. 3. Metabólica. 4. Ressonância magnética nuclear. 5. Estatística – Análise. I. Título. II. Sassaki, Guilherme Lanzi. III. Stingham, Andréa Emília Marques. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **RENATO ITAMAR DUARTE FONSECA** intitulada: **Perfil metabólico baseado em RMN ¹H de amostras plasmáticas de pacientes em diferentes estágios da doença renal crônica**, sob orientação do Prof. Dr. GUILHERME LANZI SASSAKI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Maio de 2022.

Assinatura Eletrônica
21/06/2022 14:32:52.0

GUILHERME LANZI SASSAKI
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
13/06/2022 11:36:24.0

ARQUIMEDES PAIXÃO DE SANTANA FILHO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
13/06/2022 14:48:32.0

WANDERSON DUARTE DA ROCHA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
14/05/2022 17:45:33.0

MARCELA SORELLI CARNEIRO RAMOS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Deus de toda a terra, aquele que até aqui tem me ajudado. A minha linda família, minha amada esposa Kennia e minha linda filha Isabella – nosso milagre. Agradeço a todas as pessoas que cruzaram minha vida durante esta jornada e que contribuíram de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente nos momentos alegres e nos maiores momentos de dificuldade pelo qual passamos. Momentos de tristezas e alegrias, porém sempre com um propósito para a eternidade.

A minha amada esposa Kennia por estar ombro a ombro comigo durante todos os momentos difíceis pelo qual passamos. Sonhamos juntos com isso e hoje colhemos o que plantamos.

A minha linda e querida filha Isabella que chegou em nossa vida para nos dar mais cor, esperança e alegria durante nossa vida nesta terra.

Aos meus pais Iraci Nogueira da Fonseca e Maria Goreti da Fonseca por me ensinarem a batalhar e a sonhar nesta vida. Por investirem o que puderam para formar seu filho do interior.

A todos os meus familiares que contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto.

A todos os meus conhecidos e queridos amigos que nos ajudaram direta e indiretamente para a conclusão deste tão almejado sonho.

Ao meu orientador professor Dr. Guilherme Lanzi Sasaki e minha coorientadora professora Dra. Andréa Emília Marques Stinghen por todo o suporte durante a conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Roberto Flavio Silva Pecoits Filho pela confiança em fornecer as amostras plasmáticas dos pacientes envolvidos nessa pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos aos professores, técnicos e alunos de pós-graduação do departamento de Bioquímica da UFPR pela amizade e companheirismo durante essa jornada. Em especial ao Dr Leociley Rocha Alencar Menezes por toda a amizade e ajuda durante a elaboração e conclusão desta tese.

Agradeço também a todos os professores, técnicos e alunos de pós-graduação do departamento de Patologia Básica que me ajudaram na elaboração deste trabalho.

A UFPR por sua natureza pública, gratuita e de qualidade. Assim, podendo me proporcionar a oportunidade de cursar este programa de doutorado.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que me ajudaram de todas as formas durante este caminho. Que Deus possa retribuir imensamente a cada um de vocês.

“Em Cristo estão escondidos todos os tesouros da sabedoria e do conhecimento.” Cl 2:3

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é um sério problema de saúde pública que afeta milhares de pessoas em todo o mundo. Atualmente, o diagnóstico da DRC é usualmente realizado com base nos níveis da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e na albuminúria, limitando o conhecimento dos mecanismos envolvidos na progressão desta patologia. A elucidação do comportamento metabólico da DRC pode auxiliar na prevenção e no diagnóstico desta enfermidade. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi identificar mudanças no perfil metabólico, que ocorrem à medida que a DRC progride. Para tanto, 77 amostras de plasmas de pacientes foram classificadas de acordo com seus respectivos níveis de TFGe e albuminúria. Todas as amostras foram submetidas à precipitação proteica e posteriormente à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , além de um robusto tratamento estatístico. Os espectros de RMN de ^1H 1D e 2D em 600 MHz foram determinados com o auxílio de técnicas de pré-saturação de solvente (noesypr1d) e correlação ^1H - ^{13}C editada (HSQCed), o que permitiu a identificação de 35 metabólitos, além de 12 deslocamentos químicos não determinados. Os analitos identificados foram submetidos a plataforma estatística de análise de rota metabólica (MetPA), a qual identificou 13 vias metabólicas e diversas moléculas específicas que estão envolvidas na fisiopatologia da DRC. As principais rotas metabólicas determinadas ($p < 0,05$) foram a da biossíntese de RNA ligada a aminoácidos, biossíntese, metabolismo e degradação de aminoácidos, além do metabolismo de butanoato, glioxilato e dicarboxilato. A análise de componentes principais (ACP) discriminou os pacientes do estudo em três grupos de acordo com seus respectivos comportamentos metabólicos e encontrou 8 metabólitos envolvidos na distinção entre os grupos DRC e controle. Desta forma, os pacientes foram discriminados metabolicamente pela ACP, de acordo com a TFGe, em grupo controle, estágios I – IV (G1 – G4) e estágio V (G5). A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (ADMQP), baseada na TFGe, apresentou uma calibração e validação de acurácia de 100%, além de permitir, com base nas limitações deste estudo, a criação de um modelo capaz de classificar novos pacientes de acordo com o perfil de metabólitos encontrados nos espectros de RMN de ^1H . A Análise de Variância (ANOVA) dos níveis plasmáticos dos analitos quantificáveis apresentou alterações significativas à medida que a DRC progride. Alterações metabólicas associadas à glicólise e gliconeogênese permitiram discriminar pacientes DRC e controle. A determinação de moléculas envolvidas na geração do N-óxido de trimetilamina (TMAO) sugere um importante papel desta toxina urêmica associada à DRC e a doenças cardiovasculares. Esses e outros achados demonstram que existem diferenças metabólicas na coorte de pacientes estudada, além de que várias vias metabólicas específicas estão estatisticamente correlacionadas com esta patologia. Por conseguinte, os resultados apresentados sugerem a possibilidade de avaliar a DRC de acordo com seu comportamento metabólico e não apenas por biomarcadores isolados, demonstrando assim uma nova perspectiva para o entendimento da fisiopatologia desta doença.

Palavras-chave: Doença Renal Crônica, Uremia, Metabólica, Ressonância Magnética Nuclear, Análise Estatística.

ABSTRACT

Chronic Kidney Disease (CKD) is a serious public health issue that affects thousands all over the world. Currently, the diagnosis of CKD is made usually on the levels of the estimated glomerular filtration rate (eGFR) and albuminuria, limiting the knowledge of the mechanisms involved in the progression of this pathology. The elucidation of the CKD metabolic behavior may help in the prevention and diagnose of this sickness. In this sense, the aim of the present study was to identify changes in the metabolomic profile that occur as CKD progresses. Therefore, 77 plasma samples from patients classified according to their respective levels of eGFR and albuminuria. All samples were subjected to protein precipitation and subsequently to ^1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, in addition to robust statistical treatment. The ^1H 1D and 2D NMR spectra at 600 MHz were determined with the aid of solvent pre-saturation techniques (noesypr1d) and edited ^1H - ^{13}C correlation (HSQCed), which allowed the identification of 35 metabolites, in addition to 12 undetermined chemical shifts. The identified analytes were submitted to the statistical metabolic route analysis platform (MetPA), which found 13 metabolic pathways and several specific molecules that are involved in CKD pathophysiology. The main metabolic routes determined ($p < 0.05$) were the biosynthesis of tRNA linked to amino acids, biosynthesis, metabolism and degradation of amino acids, in addition to the metabolism of butanoate, glyoxylate and dicarboxylate. Principal component analysis (PCA) discriminated the study patients into three groups according to their respective metabolomic behaviors and found 8 metabolites involved in the distinction between the CKD and control groups. Thus, the patients were metabolically discriminated by PCA, according to eGFR, in a control group, stages I – IV (G1 – G4) and stage V (G5). The Discriminant Analysis by Partial Least Squares (PLS-DA), based on eGRF, showed a 100% accuracy calibration and validation, in addition, based on the limitations of this study, to allowing the creation of a model capable of classifying new patients based on the profile of metabolites found in the ^1H NMR spectra. The Analysis of Variance (ANOVA) of quantitative metabolites plasma levels showed significant changes as CKD advance. Metabolic changes associated with glycolysis and gluconeogenesis allowed to discriminate between CKD and control patients. The determination of molecules involved in the generation of trimethylamine N-oxide (TMAO) suggests an important role of this uremic toxin associated with CKD and cardiovascular diseases. These and other findings demonstrate that there are metabolomic differences in the studied patients cohort, in addition to the fact that several specific metabolic pathways are statistically correlated with this pathology. Therefore, the results presented suggest the possibility of assessing CKD according to its metabolomic behavior and not just by isolated biomarkers, thus demonstrating a new perspective for understanding the pathophysiology of this disease.

Keywords: Chronic Kidney Disease, Uremia, Metabolomics, Nuclear Magnetic Resonance, Statistical Analysis.

LISTA DE FIGURAS TESE

Figura 1	– CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC).....	21
Figura 2	– PROCESSO DE FORMAÇÃO DAS TOXINAS URÊMICAS PELO ORGANISMO HUMANO.....	22
Figura 3	– AVALIAÇÃO METABOLÔMICA E SUA IMPORTÂNCIA.....	25
Figura 4	– EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO APLICADO (B_0).....	30
Figura 5	– FUNCIONAMENTO DE UM ESPECTRÔMETRO DE RMN.....	31
Figura 6	– DESCRIÇÃO DO EFEITO NUCLEAR OVERHAUSER (NOE)...	32
Figura 7	– MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADA (HSQCed).	35
Figura 8	– ESPECTROS DE RMN EM AMOSTRAS COM E SEM PRECIPITAÇÃO PROTEICA.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SÍMBOLOS

ACP	–	Análise por componentes principais
AMQP	–	Análise por mínimos quadrados parciais
ANOVA	–	Análise de variância/Analysis of Variance
A1	–	Estágio 1 da DRC baseado na albuminúria
A2	–	Estágio 2 da DRC baseado na albuminúria
A3	–	Estágio 3 da DRC baseado na albuminúria
BMRDB	–	<i>Biological Magnetic Resonance Data Bank</i>
B_0	–	Campo magnético externo estático e homogêneo
CEP/PUC-PR	–	Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Paraná
CEP/UFPR	–	Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná
CG	–	Cromatografia gasosa
CKD-EPI	–	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
CL	–	Cromatografia líquida
CLAE	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPMG	–	Sequência de pulso Carr–Purcell–Meiboom–Gill
CTI	–	Cromatografia de troca iônica
DCV	–	Doença cardiovascular
DRC	–	Doença renal crônica

DRET	– Doença Renal em Estágio Terminal
DSS	– Sal do ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanossulfônico/3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt
D1	– Atraso de relaxamento
EC	– Eletroforese capilar
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético/ethylenediamine tetraacetic acid
eGFR	– estimated glomerular filtration rate
EM	– Espectrometria de massas
ER	– Espectroscopia Raman
EUTox	– <i>European Uremic Toxins Work Group</i>
G1	– Estágio 1 da DRC baseado na TFGe
G2	– Estágio 2 da DRC baseado na TFGe
G3a	– Estágio 3a da DRC baseado na TFGe
G3b	– Estágio 3b da DRC baseado na TFGe
G4	– Estágio 4 da DRC baseado na TFGe
G5	– Estágio 5 da DRC baseado na TFGe
HMBC	– Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMDB	– <i>The Human Metabolome Database</i>
HMQC	– Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
HSQC	– Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
hs-CRP	– High sensitivity C-reactive protein
HSQCed	– Correlação ^1H - ^{13}C HSQC editada
ISN	– <i>International Society of Nephrology</i>
IVTF	– Infravermelho por transformada de Fourier

KDIGO	– <i>The Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
MCP-1	– monocyte chemoattractant protein-1
NKF	– <i>National Kidney Foundation</i>
NOE	– Efeito Nuclear Overhauser
NOESY	– Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NS	– Número de varreduras
OPLS	– Orthogonal Projections to Latent Structures
PCA	– Principal component analysis
PCR-us	– Proteína C reativa ultrassensível
PLS-DA	– Partial Least Squares Discriminant Analysis
PUC-PR	– Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RCF	– Força centrífuga relativa
RMN	– Ressonância magnética nuclear
SBN	– <i>Sociedade Brasileira de Nefrologia</i>
SW	– Largura espectral
TD	– Domínio do tempo
TFGe	– Taxa de filtração glomerular estimada
TMA	– Trimethylamine
TMAO	– N-óxido de trimetilamina/trimethylamine N-oxide
TPH-1	– tryptophan hydroxylase-1
TU	– Toxinas urêmicas
UFPR	– Universidade Federal do Paraná

1D	– Unidimensional
2D	– Bidimensional
5-MTP	– 5-methoxytryptophan
\vec{I}	– Momento angular intrínseco
γ	– Razão giromagnética
μ	– Momento magnético nuclear
ω	– Frequência angular
ν	– Frequência de Larmor
δ	– Deslocamento químico
$\delta^1\text{H}$	– Deslocamento químico de hidrogênio/Hydrogen chemical shift
$\delta^{13}\text{C}$	– Deslocamento químico de carbono/Carbon chemical shift
<i>s</i>	– singlet
<i>d</i>	– doublet
<i>t</i>	– triplet
<i>q</i>	– quartet
<i>m</i>	– multiplet
<i>dd</i>	– double doublet
<i>dt</i>	– double triplet
ND	– not determined

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA E SÍNDROME URÊMICA.....	19
2.2 METABOLÔMICA.....	24
2.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	28
2.3.1 Princípios básicos de RMN.....	29
2.3.2 RMN aplicada à marcadores sanguíneos.....	36
3 HIPÓTESE.....	39
4 OBJETIVOS.....	40
4.1 OBJETIVO GERAL.....	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
5 JUSTIFICATIVA.....	41

6 MATERIAL E MÉTODOS	42
6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES.....	43
6.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	43
6.3 CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES.....	43
6.4 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E BIOQUÍMICA DOS PACIENTES	44
6.5 TRATAMENTO PRÉ-ANALÍTICO DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES DE RMN DE ¹ H.....	44
6.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
7 ARTICLE	48
ABSTRACT.....	49
1 INTRODUCTION.....	50
2 METHODOLOGY.....	53
2.1 <i>Patients</i>	53
2.2 <i>Patients' Samples Collection and Processing</i>	53

2.3 <i>Clinical and Biochemical Characteristics of the Patients</i>	54
2.4 <i>Sample preparation and NMR spectroscopy analysis</i>	54
2.5 <i>Statistical and metabolic pathway analysis</i>	55
3 RESULTS.....	57
3.1 <i>Clinical and Biochemical characteristics of the study population</i>	57
3.2 <i>NMR plasma metabolic analysis</i>	57
3.3 <i>Statistical analysis</i>	57
3.4 <i>Metabolic pathway analysis</i>	60
3.5 <i>¹H NMR quantitative plasma spectra analysis</i>	62
4 DISCUSSION.....	63
5 CONFLICT OF INTEREST.....	68
6 ACKNOWLEDGMENTS.....	68
7 ARTICLE REFERENCES.....	69

8 CONCLUSÕES.....	75
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	78
11 MATERIAL SUPLEMENTAR – TESE.....	91
12 ARTICLE SUPPLEMENTAL DATA.....	94
13 APÊNDICES.....	118
13.1 APÊNDICE I.....	118
13.2 APÊNDICE II.....	120

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) deve ser estabelecida com base na presença de lesão renal e no nível de depuração renal, ambas avaliadas pela albuminúria e pela taxa de filtração glomerular estimada (TFGe), respectivamente (KDOQI, 2002). À medida que a depuração renal diminui, uma variedade de complicações aumenta, como anemia, distúrbios minerais e ósseos, hipercalemia, acidose metabólica e doença cardiovascular (DCV) (CHEN, T. K. et al., 2019). A perda progressiva da função renal, associada a redução da TFGe e acompanhada pelo acúmulo de fluido de retenção urêmica, são as maiores características dos pacientes portadores de DRC (ZHANG et al., 2017). Neste sentido, o monitoramento e a detecção precoce da DRC podem melhorar o cuidado do paciente, e assim, retardar sua progressão que pode evoluir para seu estágio terminal (CHEN, D-Q. et al., 2019). Nessa perspectiva, é necessário conhecer melhor o comportamento metabólico da DRC, que tem como característica a uremia, e também as plataformas analíticas capazes de melhorar seu diagnóstico e monitoramento.

Atualmente, as decisões clínicas para o diagnóstico e o monitoramento da DRC estão baseadas em biomarcadores séricos ou urinários, histopatologia renal, imunohistoquímica e as manifestações clínicas do paciente (PANTEGHINI et al., 2006). Na atualidade, a creatinina sérica, baseada na TFGe, determina o diagnóstico e os diferentes estágios da DRC. Porém, este parâmetro é muito limitado, visto que suas alterações são detectadas apenas quando uma quantidade significativa da função renal já está comprometida (URBSCHAT, 2011). As condições clínicas dos pacientes, como sexo, idade, metabolismo muscular, massa muscular, peso corporal, grau de hidratação e o estado nutricional, também comprometem as determinações das concentrações de creatinina e, portanto, a TFGe. Infelizmente, não existem sintomas clínicos óbvios encontrados nos estágios iniciais da DRC até que danos renais significativos ocorram (WANG et al., 2019). Nesta perspectiva, biomarcadores específicos para a DRC nos seus estágios iniciais podem fornecer uma melhor abordagem terapêutica e diagnóstica.

A descoberta de novos biomarcadores é urgente e necessária para melhorar a eficiência diagnóstica da DRC. Alternativamente, a metabolômica tem evoluído como nova tecnologia no estudo de biomarcadores promissores e de possíveis novas rotas

metabólicas envolvidas em diversas patologias (TITAN et al., 2019). Uma extensa revisão de várias moléculas pode avaliar com mais eficiência a progressão da DRC do que simplesmente o monitoramento por biomarcadores isolados. Assim, um melhor entendimento das principais moléculas envolvidas nos distúrbios da DRC pode melhorar a compreensão das desordens metabólicas que alteram as vias bioquímicas desta doença.

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H surge como uma alternativa promissora na busca por biomoléculas envolvidas na DRC, uma vez que é uma metodologia rápida, não destrutiva e de alta performance, o que pode fornecer identificação e quantificação direta de diversos compostos (DUNN; ELLIS, 2005). O uso da metabolômica por RMN associado a ferramentas estatísticas não supervisionadas são alternativas extremamente eficientes na busca de novos biomarcadores para a DRC (WANG et al., 2019). Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar amostras plasmáticas de pacientes por espectroscopia de RMN e buscar biomoléculas envolvidas na progressão da DRC. Análises por RMN de ^1H , conjuntamente com o tratamento estatístico dos resultados, permitiram a determinação de diversas moléculas capazes de diferenciar os grupos controle e DRC. Concomitantemente, a avaliação das vias metabólicas envolvidas no estágio 5 (G5) permitiu um entendimento mais detalhado do comportamento metabolômico desta patologia em seu estágio mais avançado, o que pode auxiliar o entendimento desta doença que atualmente afeta milhares de pessoas no Brasil e no mundo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA E SÍNDROME URÊMICA

A DRC é um problema crescente de saúde pública que afeta a população mundial entre 8% e 16% (JHA et al., 2013). Dados mais recentes apontam uma prevalência global para DRC em 2017 de 9,1% (697,5 milhões de casos) (CARNEY, 2020). Esta patologia provoca pelo menos 10 vezes mais mortalidade cardiovascular quando comparada com a população geral, tornando a DRC o maior problema de saúde pública em todo o mundo, especialmente em países de alta renda (RHEE et al., 2013; WANG et al., 2019). Segundo projeções da *International Society of Nephrology* (ISN), em 2030, 14,5 milhões de pessoas em todo o mundo apresentarão Doença Renal em Estágio Terminal (DRET), porém devido a fatores econômicos, políticos e sociais, apenas 5,4 milhões de pessoas receberão tratamento adequado. Outrossim, a cada ano mais de 2 milhões de pessoas morrem devido a escassez ou nenhum acesso a hemodiálise ou transplante renal.

A prevalência da DRC no Brasil ainda é incerta e varia de acordo com o método empregado para a definição da doença. Inquéritos populacionais no ano de 2013 apontam uma prevalência de 1,43%, porém, quando a avaliação está baseada em hipercreatininemia este índice sobe para 3,13% (estudo realizado no ano de 2000). Quando os aspectos clínico-laboratoriais em campanhas de saúde são avaliados, a prevalência sobe para índices entre 6,27% – 7,26% (2002 – 2010) (MARINHO et al., 2017).

A maior consequência da DRC é a evolução para seu último estágio, onde a capacidade depurativa renal já está consideravelmente comprometida, o que define o uso de Terapia Renal Substitutiva pelo paciente, ou seja, terapia dialítica com o objetivo de normalizar a função renal. Números do Censo Nacional de Diálise, elaborado pela *Sociedade Brasileira de Nefrologia* (SBN) para o ano de 2017, apontam que 126.583 pacientes realizaram diálise no Brasil e apresentaram uma taxa de 19,9% de mortalidade bruta. Esses dados demonstram a gravidade da DRC à medida que a esta patologia evolui.

A definição da DRC está baseada na redução da TFGe ou no aumento de

excreção de albumina, ou ambos (JHA et al., 2013). De acordo com o *The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)*, em seu documento *Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*, publicado em 2013, a DRC pode ser definida como uma anormalidade estrutural ou uma anormalidade de função renal pelo período de no mínimo 3 meses, acompanhada de marcadores laboratoriais de TFG_e, ou evidências de um ou mais marcadores de dano renal como albuminúria, anormalidades de sedimento urinário, anormalidades eletrolíticas, anormalidades detectadas por histologia e imagem, além de histórico de transplante renal.

À medida que a DRC avança, a TFG_e diminui gradativamente e a albumina urinária (albuminúria) tende a aumentar. Com o auxílio destes dois parâmetros é possível avaliar o prognóstico da DRC (Figura 1). Atualmente a DRC é classificada em 5 estágios, de acordo com a velocidade de redução da TFG_e (G1, G2, G3a, G3b, G4 e G5), e em 3 estágios à medida que a albuminúria aumenta suas concentrações (A1, A2 e A3) (KDIGO, 2013).

FIGURA 1. CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.

				Categorias de albuminúria constante		
				Descrição e extensão		
				A1	A2	A3
				Normal a moderadamente aumentado	Moderadamente aumentado	Severamente aumentado
				<30 mg/g <3 mg/mol	30 – 300 mg/g 3 – 30 mg/mol	>300 mg/g >30 mg/mol
Categorias de TFGe (ml/min/1,73 m ²) Descrição e extensão	G1	Normal ou alta	≥90			
	G2	Levemente diminuída	60 – 89			
	G3a	Levemente a moderadamente diminuída	45 – 59			
	G3b	Moderadamente a severamente diminuída	30 – 44			
	G4	Severamente diminuída	15 – 29			
	G5	Falência Renal	<15			

FONTE DA FIGURA: Adaptado de KDIGO, 2013.

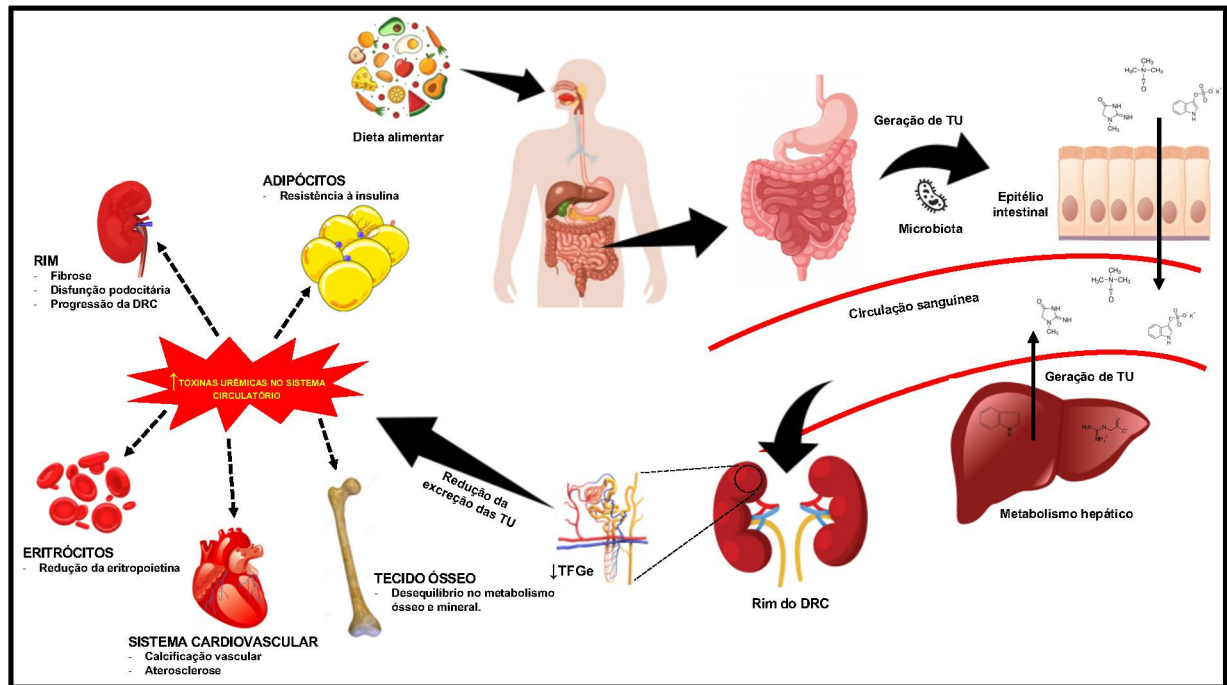
LEGENDA: Classificação da Doença Renal Crônica (DRC) baseada na Taxa de Filtração Glomerular Estimada (TFGe) e na excreção urinária de albumina (albuminúria). A associação entre os níveis de TFGe e albuminúria define o prognóstico da DRC.

Verde: baixo risco (se não houver outros marcadores de DRC, ausência de DRC); Amarelo: risco moderadamente aumentado; Laranja: risco alto; Vermelho: risco muito alto.

Uma das complicações da DRC é a síndrome urêmica, que é caracterizada por uma retenção progressiva de um grande número de compostos, os quais sob condições fisiológicas normais são excretados pelo sistema renal. Esta síndrome está associada a DRC e gera alterações em diversos órgãos e tecidos (Figura 2), afetando assim suas funcionalidades. Estes compostos urêmicos são chamados de solutos de retenção urêmica, ou toxinas urêmicas (TU), e são classificados pelo *European Uremic Toxins Work Group* (EUTox). Essa classificação é realizada de acordo com o tamanho molecular, sendo que sua maioria possui peso molecular inferior a 500 Da (VANHOLDER et. al., 2003). De acordo com o banco de dados do EUTox (<http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>), atualmente existem 130 solutos urêmicos

listados e, certamente, um aumento nesse número pode ser esperado. Dentre todas as TU listadas pelo EUTox, diversas possuem correlação com alterações da função renal, e assim podem estar associadas a DRC (Tabela 1) (Material Suplementar – Tese).

FIGURA 2. PROCESSO DE FORMAÇÃO DAS TOXINAS URÊMICAS PELO ORGANISMO HUMANO.



FONTE DA FIGURA: Autor, 2021.

LEGENDA: Após o processo de absorção alimentar a microbiota intestinal atua na metabolização de diversas moléculas, gerando TU que alcançam a circulação sanguínea. O metabolismo hepático também é responsável pela geração de TU. Assim, as concentrações elevadas de TU reduzem a capacidade de depuração renal, agravando a Doença Renal Crônica (DRC). O excesso dessas TU na circulação sanguínea provoca também desequilíbrio metabólico em diversos outros tecidos do organismo humano.

FONTES DAS IMAGENS UTILIZADAS PELO AUTOR: <https://pt.vecteezy.com> (dieta alimentar); <https://brainstudy.info/images> (anatomia corporal); <https://br.freepik.com> (sistema digestivo); <https://www.tasmeemme.com/en/store-items> (microbiota intestinal); <https://cnx.org/contents> (epitélio intestinal); <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/> (estruturas químicas); <https://www.vectorstock.com> (fígado); <https://vectorportal.com> (rins); <https://stock.adobe.com/br> (néfron); <https://en.crsa.fr/eq-feve-dalle-2019> (adipócitos); <https://pt.dreamstime.com/> (tecido ósseo); <https://br.depositphotos.com> (coração); <https://br.123rf.com> (eritrócitos); <https://free3d.com/pt> (rim).

A perda gradual da função renal, acompanhada do acúmulo de fluido de retenção urêmica são características dos pacientes com DRC (ZHANG et al., 2017). A progressão desta patologia resulta na perda da capacidade renal de eliminar compostos urêmicos da circulação sanguínea. Assim, o acúmulo de compostos urêmicos é conhecido como estado urêmico ou uremia. Um dos efeitos tóxicos da

uremia é o aumento de resposta inflamatória, a qual acelera o desenvolvimento da aterosclerose na DRC (BRO et al., 2004; GLASSOCK, 2008), o que pode explicar o aumento do risco de DCV nestes pacientes. Os riscos associados à aterosclerose nos pacientes com DRC incluem acidente vascular, infarto do miocárdio e calcificação cardiovascular (JHA e WANG, 2012).

Para que uma TU possa ser definida como autêntica, ela deve ser identificada e caracterizada quimicamente; deve ser quantificada em fluidos corporais; sua concentração deve estar aumentada quando o paciente estiver urêmico; a TU deve possuir níveis mais baixos quando o paciente melhora seu quadro clínico de uremia e, finalmente, reproduzir *in vivo* ou *in vitro* os efeitos urêmicos semelhantemente aos encontrados na uremia. Além desses critérios, o mecanismo bioquímico deve ser demonstrado para elucidar a conexão entre a toxina e o quadro urêmico (GLASSOCK, 2008). Além do mais, após provável identificação de uma TU, é necessário entender e avaliar esse metabólito com seus respectivos mecanismos celulares. Outro passo, é mapear as vias metabólicas e analisar sua relação com o metabolismo enzimático envolvido (CHAGOYEN; PAZOS, 2012). Assim, a avaliação do papel fisiopatológico dos metabólitos pode fornecer a identificação de possíveis novas vias metabólicas e biomarcadores para a DRC. Nesta perspectiva, o uso da metabolômica pode ajudar a avaliar melhor as características metabólicas dos diferentes estágios da DRC e também a interação de moléculas relevantes com a fisiopatologia dessa doença.

Infelizmente, não existem sintomas clínicos óbvios nos estágios iniciais da DRC até que considerável dano renal tenha ocorrido (WANG et al., 2019). Mesmo a DRC sendo facilmente avaliada em fases mais tardias, com base nos níveis da creatinina sérica ou na TFG_e, não existe nenhum biomarcador confiável para a DRC em seus estágios iniciais (MISCHAK, et al., 2010). Porém, com um monitoramento preciso e uma detecção precoce da DRC é possível melhorar os cuidados dos pacientes portadores desta enfermidade e também retardar a progressão ao seu estágio terminal (CHEN D-Q. et al., 2019).

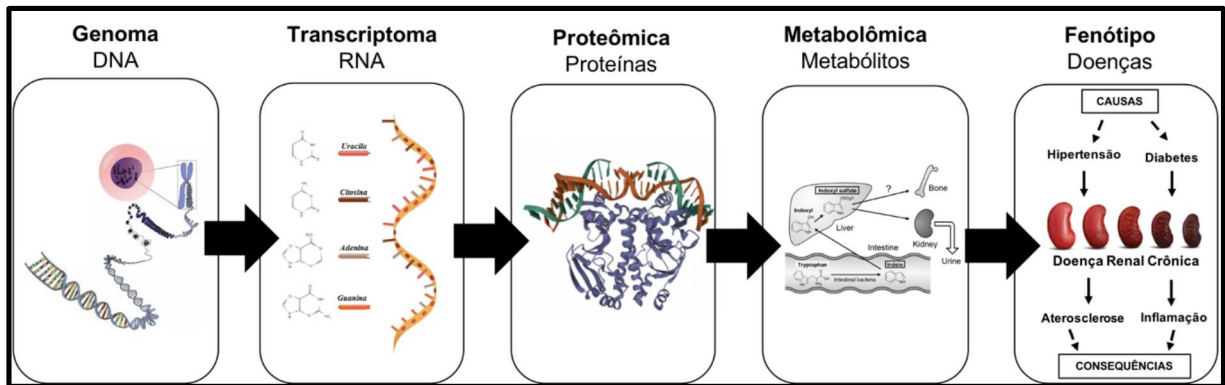
A creatinina sérica, utilizada atualmente para determinar a TFG_e, não possui boa sensibilidade no auxílio diagnóstico nos estágios iniciais da DRC. Esse analito é muito limitado, visto que as elevações acima dos valores referenciais são detectadas apenas quando ocorre redução superior a 50% da TFG_e (DSA et al., 2017 apud

SHEMESH et al., 1985). Desta forma, a busca por novos biomarcadores é urgente e necessária para melhorar a eficiência diagnóstica da DRC.

O comportamento metabólico da DRC passa pelo entendimento do metaboloma humano que é afetado por condições fisiológicas, fisiopatológicas e ambientais. Assim, uma avaliação mais abrangente, com um número maior de metabólitos, pode prover um melhor entendimento do mecanismo moleculares da DRC. Neste sentido, uma alternativa que vem surgido nos últimos anos é a avaliação metabolômica da DRC por RMN. A metabolômica associada a proteômica são técnicas altamente dinâmicas que podem ser utilizadas para auxiliar o entendimento das consequências funcionais do genoma. A RMN é capaz de fornecer uma avaliação mais rápida e abrangente de amostras biológicas em modelos humanos (DUBIN; RHEE, 2020; SILVA et al., 2020). Nesse cenário, discriminar a DRC com o auxílio de vários metabólitos relevantes surge como uma alternativa promissora diante da avaliação atual baseada apenas em biomarcadores isolados.

2.2 METABOLÔMICA

A definição de metabolômica pode ser estabelecida como o estudo dos metabólitos de baixo peso molecular em amostras biológicas, como os fluidos biológicos, extratos celulares e tecidos (EMWAS et al., 2013; WANG et al., 2019). É definida também como a ciência ômica que trabalha para identificar o metaboloma, que é determinado pelo conjunto de metabólitos que compõem um sistema biológico, assim como em uma célula, um tecido ou até mesmo o organismo como um todo (VIGNOLI et al., 2019). A avaliação destes metabólitos, que compõem os produtos finais do genoma e do proteoma, pode ser realizada por meio de técnicas metabolômicas, as quais tem a capacidade de fornecer diversas informações de um fenótipo integrado em um determinado sistema (figura 3). Assim, analisando o perfil metabólico em determinadas situações, também conhecido como *fingerprint*, podemos avaliar de forma ampla diversos estágios fisiopatológicos. E desta forma, sendo possível avaliar também a metabolômica relacionada a DRC (SHAH et al., 2013).

FIGURA 3. AVALIAÇÃO METABOLÔMICA E SUA IMPORTÂNCIA.

FONTE DA FIGURA: Autor, 2021.

LEGENDA. A importância da análise metabolômica nas informações integradas nos produtos finais do genoma e do proteoma. Essas informações moleculares podem revelar detalhes importantes relacionados ao genótipo e ao fenótipo. Desta forma, podendo auxiliar na determinação de diversas causas e consequências relacionadas a DRC.

FONTES DAS IMAGENS UTILIZADAS PELO AUTOR: www.educamaisbrasil.com.br/ (genoma); <https://www.biologianet.com/biologiacelular>(transcriptoma); www.ebi.ac.uk/training/online/courses/biom acromolecular-structures/proteins/levels-of-protein-structure-primary/levels-of-protein-structure-quaternary/(proteômica); <https://europepmc.org/article/pmc/5536993> (metabolômica); <https://hintng.com/kidney-disease-causes-symptoms-treatment/> (fenótipo).

Diversas técnicas de detecção têm sido empregadas para quantificar compostos urêmicos, incluindo a cromatografia de troca iônica (CTI), a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia líquida (CL), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a espectrofotometria, a fluorimetria, a quimioluminescência, a nefelometria, a RMN e a espectrometria de massas (EM) (LISOWSKA-MYJAK, 2014). Plataformas analíticas como a RMN e a EM, precedidos por um passo intermediário de separação cromatográfica, podem ser utilizadas na avaliação metabolômica (VANHOLDER et al., 2015). Outras técnicas espectroscópicas como a espectroscopia Raman (ER) e infravermelho por transformada de Fourier (IVTF) também têm sido utilizadas para identificar diversos compostos presentes na uremia (GULYAMOV et al, 2021; YUAN et al., 2020). Dentro deste universo de técnicas analíticas, as mais utilizadas na avaliação da DRC são a RMN e a EM, geralmente precedidas por técnicas de separação, como CL, CG ou eletroforese capilar (EC) (GAGNEBIN et al., 2020; BOELAERT et al, 2017).

Para a detecção de compostos não-voláteis, termolábeis e/ou compostos com alta polaridade, a CG não é recomendada. Entretanto, a derivatização de metabólitos pode ser uma alternativa para produção de analitos mais estáveis. A CG é capaz de separar metabólitos de baixo peso molecular, frequentemente metabólitos polares

como aminoácidos, ácidos orgânicos, aminas, amidas e açúcares (VANHOLDER et al., 2015). Nessa perspectiva, a CG acoplada a detecção por EM tem sido utilizada para identificar moléculas como potenciais biomarcadores da DRC. Dentre elas, a trimetilamina (TMA) (GRABOWSKA-POLANOWSKA et al., 2013), fosfatidilcolinas, lisofosfatidilcolinas e esfingomielinas, que estão relacionadas a gravidade desta doença (DURANTON et al., 2010). De acordo com KURANO e YATOMI (2019), o uso da CL associada a EM mostrou diversos metabólitos associados a DRC com origem na nefropatia de deposição por imunoglobulina A. A análise metabolômica por CL associada a EM tem sido utilizada na avaliação da glomerulonefrite membranosa (TAHERKHANI et al., 2019) e na investigação da associação entre metabólitos e a mortalidade por DRET (TITAN, 2019).

A CL permite separar e identificar compostos com alta polaridade, termolábeis e misturas de compostos com alto peso molecular. Como a CL não precisa de derivatização, a preparação das amostras é mais simples quando comparada a CG (DUNN; ELLIS, 2005). Com o avanço tecnológico a CLAE foi desenvolvida e aumentou a resolução cromatográfica, o número de metabólitos detectáveis, e quando acoplada a EM promove melhor resolução para a identificação de potenciais metabólitos (VANHOLDER et al., 2015). A CLAE tem sido utilizada nos últimos anos em estudos envolvendo doenças renais, por meio de estudos experimentais em amostras de soro, urina, fezes ou em modelos animais experimentais (ZHAO, 2013).

A CG e a CL, ambas acopladas a EM, juntamente com a RMN são habitualmente as técnicas mais aplicadas em pesquisas de perfis metabólicos, além de fornecer uma análise rápida e diversa de amostras biológicas obtidas de modelos humanos (SILVA et al., 2020). A CLAE também tem sido muito explorada na avaliação de alterações na DRC, como na caracterização de produtos de retenção urêmica de pacientes em hemodiálise (GAGNEBIN et al., 2020) e na identificação de metabólitos associados com a progressão da DRC (CHEN D-Q. et al., 2019).

À medida que a DRC evolui, a presença de proteínas e peptídeos se torna evidente na urina. Neste sentido, a EC, quando acoplada a EM, tem se tornado uma ferramenta promissora na busca de moléculas associadas a proteômica clínica, principalmente proteômica associada a análise de urina (MISCHAK et al., 2010). O uso da proteômica utilizando a urianálise, com o objetivo de avaliar diferentes etiologias das doenças renais, tem sido descrito por diversos estudos como alternativa aos testes padrão ouro presentes nas decisões clínicas. Por conseguinte, o uso da

EC associada a EM surge como alternativa na abordagem proteômica com o propósito de encontrar biomarcadores urinários úteis no diagnóstico e prognóstico da DRC (MAGALHÃES; MISCHAK; ZÜRBIG, 2016). Assim, a evolução de pacientes portadores de DRC para DRET pode ser avaliada por EC acoplada a EM (EC-EM), por meio da possibilidade de mensuração de metabólitos específicos que podem facilitar os cuidados desses pacientes (KIMURA et al., 2016).

A ER é uma técnica óptica não invasiva ou minimamente invasiva e sensível a composição molecular dos tecidos. Assim como a RMN, é uma técnica que necessariamente não requer preparação da amostra ou de reagentes (CUI et al., 2018). O efeito Raman é um fenômeno de vibração/rotação molecular inelástica capaz de causar uma mudança na capacidade de polarização de uma molécula. Essa capacidade de polarização representa a habilidade de um campo elétrico externo induzir um momento dipolo em determinada molécula (CHASE, 1994; AUNER et al., 2018). Nesse contexto, o fenômeno de espalhamento Raman, que é caracterizado como um método espectroscópico vibracional, tem sido utilizado em análises químicas capazes de revelar informações moleculares do tipo *fingerprint* (ZONG et al., 2021). Esta ferramenta analítica é considerada promissora para análises semi-quantitativas de potenciais biomarcadores da função renal, além de utilizar pouco ou nenhum preparo de amostra e também possibilitar a visualização de diversos biomarcadores de forma simultânea (GULYAMOV et al, 2021). Além do que, pode ser uma alternativa viável para identificar diferenças nos constituintes bioquímicos presentes em amostras de soro e urina de indivíduos com DRC e controles saudáveis (ZONG et al., 2021).

A espectroscopia por IVTF é um tipo específico de espectroscopia no infravermelho que estuda a interação da luz infravermelha com a matéria (SMITH, et al., 2011). Esta técnica funciona por meio da emissão de luz policromática em determinada amostra e, desta forma, medindo a quantidade de luz absorvida (NASEER; ALI; QAZI, 2020). O uso do IVTF na avaliação da DRC pode envolver a análise de tecidos e de fluídos biológicos. Esta técnica de análise pode avaliar a qualidade óssea de pacientes com DRC, mediante avaliação da redução do volume e da massa ósseas (ASADIPOOYA et al, 2021). A espectroscopia por IVTF associada a análise multivariada tem grande potencial na avaliação do screening de pacientes em falência renal crônica (YUAN et al., 2020).

A RMN é uma importante ferramenta na metabolômica (WANG et al., 2019) e surgiu como uma técnica apropriada para investigar composições anormais em fluidos

corporais, pois ela possui a capacidade de detectar simultaneamente uma grande quantidade de metabólitos (LINDON et al., 2005). Esta técnica também apresenta dados analíticos altamente quantitativos e precisos em uma ampla faixa dinâmica, o que pode fornecer dados importantes quando avaliamos estruturas moleculares desconhecidas (VIGNOLI et al., 2019). Apesar de ser uma técnica mais robusta, quantitativa e reprodutível que a CL acoplada a EM, a RMN é menos sensível e requer instrumentação mais onerosa (VIGNOLI et al., 2019; VANHOLDER et al., 2015). Porém, existem mais vantagens do que desvantagens nesta técnica. A RMN é a única ferramenta espectroscópica capaz de fornecer informações de conectividade centradas no átomo. Conseqüentemente, atribuindo um papel importante à esta técnica na elucidação de estruturas moleculares (GARCIA-PEREZ et al., 2020). Quando comparamos a RMN com outras técnicas empregadas atualmente na determinação do perfil metabólico, observamos diversas vantagens, como mínimo de preparo de amostra, alta reprodutibilidade, robustez, natureza não destrutiva e quantificação relativa sem o uso de padrões internos (WISHART, 2008). Nessa perspectiva, a avaliação de moléculas obtidas por extração aquosa, ou seja, moléculas de baixo peso molecular (<1500 Da), que também são produzidas em processos bioquímicos, podem ser identificadas com o auxílio da RMN (TAHERKHANI et al., 2019).

2.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Dentro das plataformas analíticas que compreendem o universo de técnicas utilizadas para pesquisa de biomoléculas, a RMN tem se tornado uma ferramenta de destaque por seus diversos atributos espectroscópicos. Esta técnica analítica é uma das mais poderosas e importantes ferramentas utilizadas para a investigação de propriedades físico-químicas em sistemas complexos, o que pode auxiliar na elucidação estrutural de moléculas de baixa massa molecular e macromoléculas, bem como no estudo da interação entre essas moléculas (MENEZES, 2019). Segundo Pavia (2010), a RMN é capaz de apresentar dados sobre o número de átomos magneticamente distintos de um determinado isótopo estudado. Desta forma, quando estudamos núcleos de hidrogênio, é possível determinarmos o número de cada um

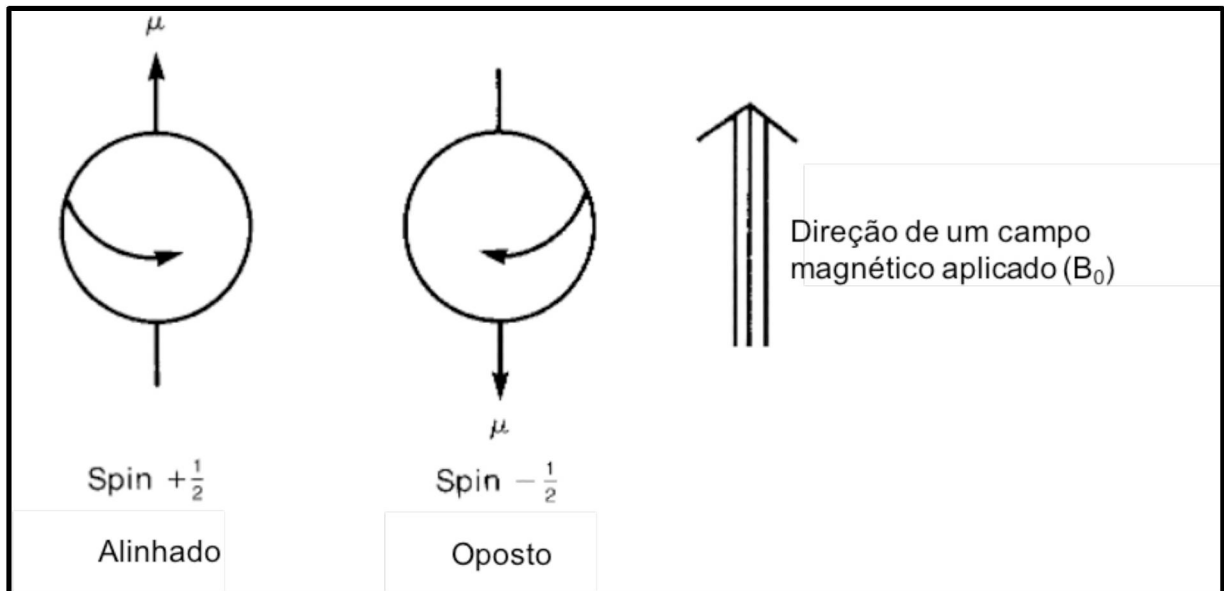
dos diferentes tipos de prótons não equivalentes e assim obtermos informações a respeito dos diferentes tipos de ligações de hidrogênio na molécula estudada, fornecendo assim informações importantes na pesquisa por moléculas em amostras desconhecidas. Esta plataforma analítica está baseada no fato de que diversos núcleos atômicos que possuem spin (dentre os mais comuns: ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O e ^{19}F), podem estar em diferentes níveis de energia na presença de um forte campo magnético (PAVIA et al., 2010). Logo, o raio giromagnético nuclear irá definir a capacidade rotacional do spin, o que pode fornecer informações estruturais muito importantes a respeito da especificidade molecular (GOODACRE et al., 2004).

A RMN é uma técnica que possui alta reprodutibilidade, nível de detecção μM , requer mínimo preparo de amostra, volume de amostra entre 0,1 – 0,5 mL, quantificável e capacidade de detectar metabólitos simultaneamente (EMWAS et al., 2019; VIGNOLI et al., 2019). Tudo isso torna a RMN uma técnica com grande número de vantagens sobre outras plataformas. Esta técnica é muito eficiente e capaz de auxiliar em estudos estruturais de moléculas, sem a necessidade de derivação prévia, além de ser uma técnica rápida, não destrutiva, qualitativa e quantitativa para pesquisa direta de diversos compostos em biofluidos, extratos de membranas e tecidos (DUNN; ELLIS, 2005; ADOSRAKU, 1994 apud MIKA, 2018). À vista disso, em um universo de possibilidades, a RMN de ^1H pode ser utilizada em diversos tipos de amostras biológicas, como em pacientes DRC em tratamento por hemodiálise convencional ou peritoneal, com a finalidade de identificar diferenças nos seus respectivos padrões metabólicos (ZHAO, 2013).

2.3.1 Princípios básicos de RMN

A RMN é um fenômeno espectroscópico que relaciona radiação eletromagnética e matéria. É possível submeter amostras líquidas ou sólidas a um campo magnético externo estático e homogêneo (B_0). Quando os átomos destas amostras, como composições anormais de fluidos biológicos, são expostos a determinado campo magnético, todos os prótons possuem seus momentos magnéticos alinhados ao longo de B_0 ou opostos a ele (Figura 4) (LINDON et al., 2000; PAVIA et al., 2010).

FIGURA 4. EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO APLICADO (B_0).

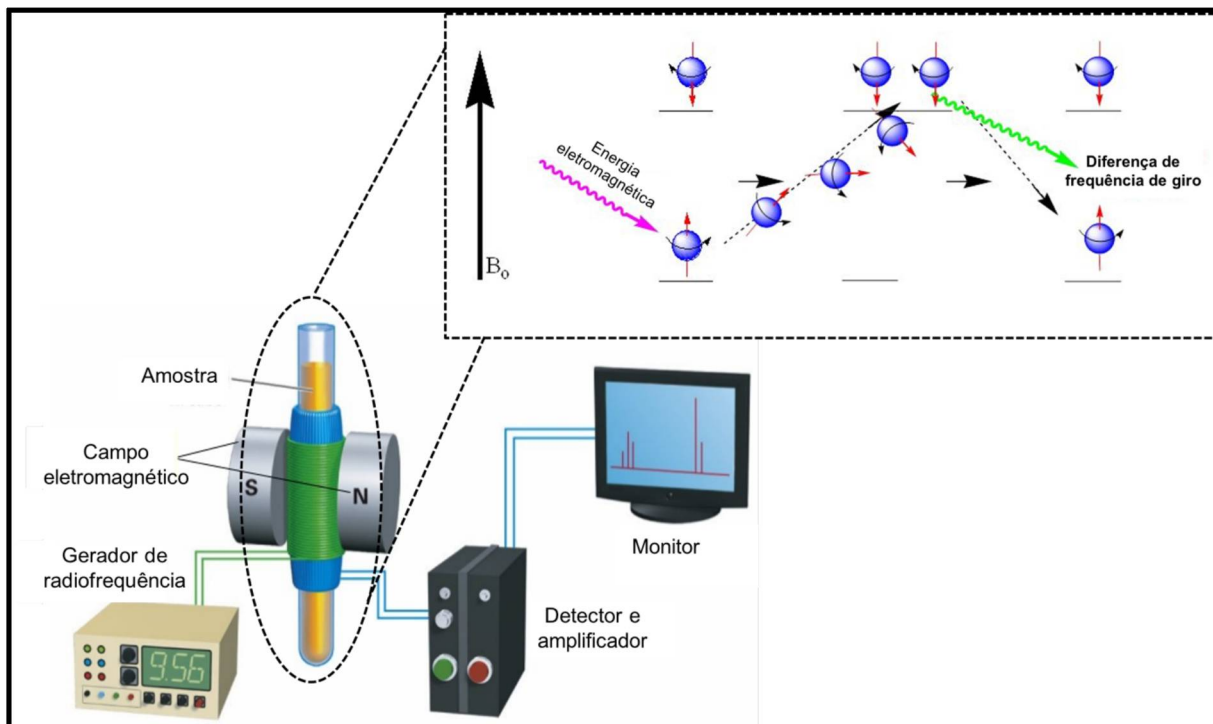


FONTE DA FIGURA: PAVIA et al., 2010.

LEGENDA. Atuação do campo magnético aplicado (B_0) sobre os momentos magnéticos dos núcleos de ^1H , provocando o alinhamento dos prótons na mesma direção ao longo de B_0 ou em direção oposta a ele.

Um pulso eletromagnético emitido por um espectrômetro de RMN é capaz de interagir com núcleos de moléculas desconhecidas, pois quando a radiofrequência emitida por este equipamento for equivalente a frequência do campo magnético gerado pelo núcleo estudado, os dois campos magnéticos podem se acoplar. Neste sentido, quando nos referimos a RMN de ^1H é necessário entender que um próton (^1H) possui spins designados como $-\frac{1}{2}$ e $+\frac{1}{2}$, sendo que na ausência de B_0 estes spins possuem a mesma energia. Porém, quando B_0 é aplicado o spin $-\frac{1}{2}$ possui mais energia do que o spin $+\frac{1}{2}$. Desta forma, a transferência de energia de radiação para o núcleo pode ocorrer, gerando assim a mudança de *spin*, processo esse conhecido como ressonância. Conseqüentemente, quando o spin retorna ao seu nível energético normal, a diferença na frequência de giro (*spin*) é detectada pelo espectrômetro de RMN (Figura 5) (PAVIA et al., 2010; RHODES, 2017).

FIGURA 5. FUNCIONAMENTO DE UM ESPECTRÔMETRO DE RMN.



FONTE DA FIGURA: Autor, 2021.

LEGENDA. O campo magnético gerado pelo espectrômetro de RMN interage com os spins nucleares presentes na amostra por meio da equivalência de frequência. Após essa equivalência, pode ocorrer a diferença na frequência de giro (*spin*) antes e após a energia eletromagnética emitida pelo espectrômetro de RMN. Após o término do pulso eletromagnético emitido pelo espectro, o spin nuclear que recebeu transferência de energia retorna ao seu nível energético normal. Essa diferença de frequência de giro é detectada pelo espectrômetro de RMN, fornecendo informações sobre as características do núcleo estudado.

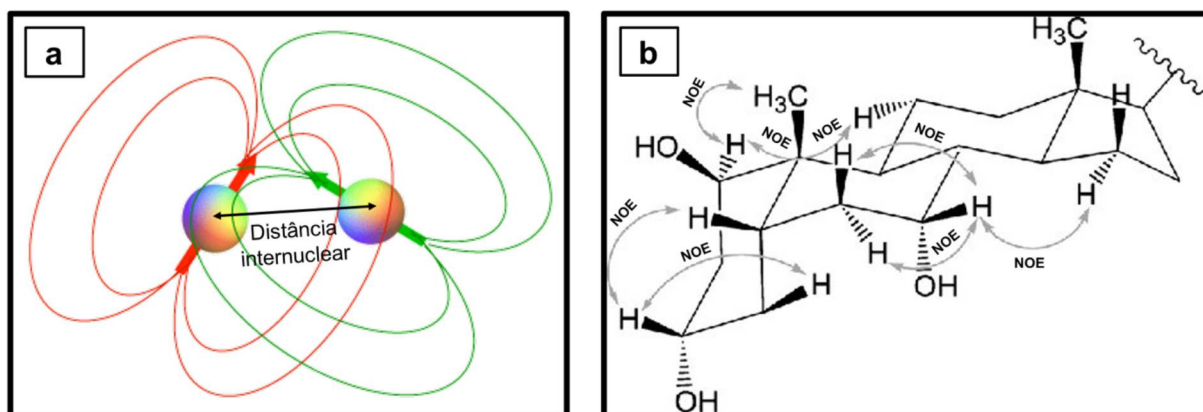
FONTES DAS IMAGENS UTILIZADAS PELO AUTOR: <https://slideplayer.com/slide/11423375/>; <https://www.slideshare.net/ASUTOSHMOHAPATRA/nuclear-magnetic-resonance-spectroscopy>.

Quando avaliamos moléculas orgânicas, átomos de um mesmo elemento (como o ^1H) podem estar expostos a ambientes químicos distintos, o que faz com que as frequências de ressonância se comportem de maneira diferente. Assim, o espectrômetro de RMN consegue prever estes ambientes químicos distintos, permitindo avaliar diferentemente cada átomo de acordo com seu respectivo nível de blindagem. Consequentemente, é possível diferenciar moléculas de acordo com o comportamento magnético único de cada uma delas.

Dentro do universo de interações spin-spin capazes de fornecer informações importantes para o espectro de RMN, podemos destacar o *Efeito Nuclear Overhauser* (NOE). O efeito NOE tem se tornado uma das formas de se obter informações sobre estruturas moleculares, especialmente biomoléculas em soluções, por espectroscopia

de RMN (LINDON, 2017). Esta interação está relacionada com o comportamento dipolar espacial entre os spins, sendo o resultado da transferência de polarização via mecanismos de relaxação entre núcleos que apresentam acoplamentos dipolares (OVERHAUSER, 1953). A interação entre spins do efeito NOE não necessita compartilhar um orbital eletrônico em comum, sua força varia de acordo com a distância espacial entre as interações de spins (LINDON, 2000). Em outras palavras, o campo magnético de um determinado núcleo é afetado pela presença de outro núcleo próximo (Figura 6). Isto pode ser avaliado quando um dos spins nucleares atinge a saturação e o spin nuclear próximo apresenta mudanças na intensidade do sinal de RMN. (LINDON, 2017).

FIGURA 6. DESCRIÇÃO DO EFEITO NUCLEAR OVERHAUSER (NOE).



FONTE DA FIGURA: Autor, 2021.

LEGENDA. Interação entre spins pelo efeito NOE está relacionada com a distância espacial de cada spin (a). Esta distância espacial pode estar presente de diversas formas dentro de uma mesma molécula (b).

FONTES DAS IMAGENS UTILIZADAS PELO AUTOR: https://ethz.ch/content/dam/ethz/special-interest/chab/physical-chemistry/bionmr-dam/education/liquid-state-nmr-voegeli/NOE_script.pdf; https://www.researchgate.net/publication/247807229_A_new_major_C27_biliary_bile_acid_in_the_Red-winged_tinamou_Rhynchotus_rufescens25R-1_3_7_-trihydroxy-5_-cholestan-27-oid_acid/figures?lo=1.

Experimentos que utilizam a diferença de NOE são utilizados a muito tempo antes de sequências de pulso como a *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy* (NOESY), que utiliza pulsos modelados e gradientes de campo pulsado, gerando espectros mais limpos do que os experimentos de diferença de NOE (REYNOLDS; ENRÍQUEZ, 2002). A espectroscopia por RMN 1D-NOESY utiliza as correlações que envolvem interações devidas ao NOE entre os hidrogênios que estão próximos espacialmente. Esta técnica é capaz de estabelecer uma configuração

relativa de cada hidrogênio em determinada molécula, podendo descrever sua geometria molecular geral (KAISER, 2000).

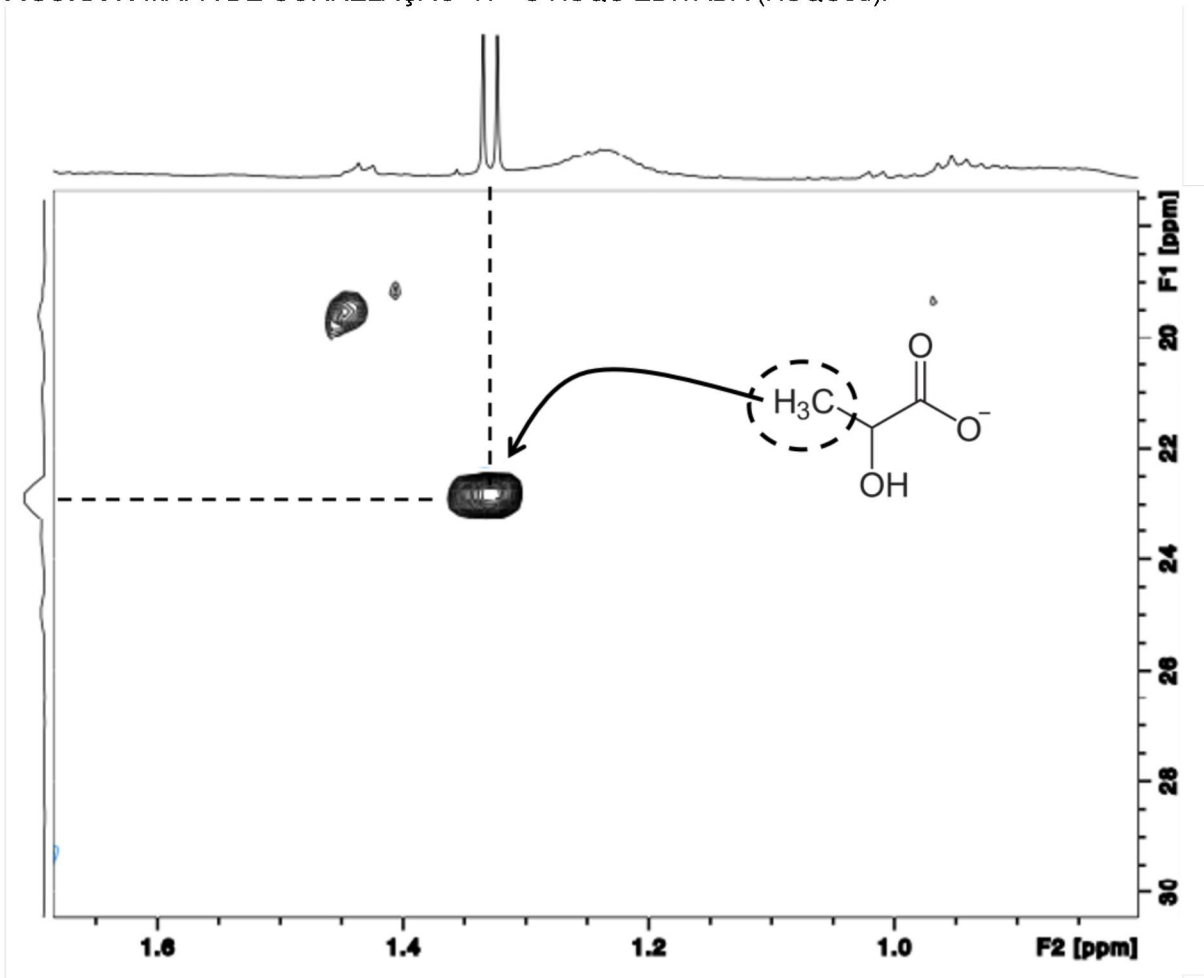
O uso de técnicas de RMN ^1H que auxiliem na melhora da visualização dos picos espectrais são necessárias, pois o sinal do solvente pode dificultar a identificação de diversos sinais importantes no espectro de RMN ^1H . Neste sentido, a literatura científica descreve diversos métodos de supressão de solvente (MCKAY, 2011). Para tanto, é necessário suprimir o sinal da água para reduzir o impacto do amortecimento de radiação nos espectros de RMN (KEUN et al., 2018). Assim, o uso da sequência 1D-NOESY com pré-saturação (noesypr1d) pode melhorar os espectros e auxiliar na identificação de diversos compostos. A 1D-NOESY é a sequência de pulso de RMN mais utilizada para coleção de dados metabolômicos em amostras biológicas como plasma, soro, urina, fluido cerebrospinal, escarro e extratos de tecidos homogêneos (BECKONERT et al., 2007). Por fim, implementar uma técnica de supressão de água eficiente, em amostras biológicas para perfis metabólicos, torna-se um importante pré-requisito para a aquisição de espectros de RMN bem elucidados (ZHENG e PRICE, 2010).

A utilização da sequência de pulso 1D-NOESY tem sido baseada em diversos fatores. Dentre eles, a facilidade na obtenção de qualidade de supressão da água e o fato de que um grande número de grupos de pesquisa que já utilizam essa sequência, demonstrando ser uma técnica bem estabelecida. A 1D-NOESY possui fatores necessários para otimização da pré-saturação durante sua sequência de pulso. Dentre esses fatores, a alteração manual no campo magnético (*Shimming*), tem o objetivo de compensar os efeitos ambientais e da própria amostra. Já o *Lock Compensation* é utilizado para compensar desvios magnéticos internos e externos, sendo capaz de produzir um campo magnético paralelo ao principal ímã supercondutor. Também a configuração dos instrumentos é direcionada pra o uso da tensão máxima utilizada, com o objetivo de cobrir a maior área de excitação possível, e assim apenas o tempo de duração da largura do pulso (Pulse Width) será controlada pelo operador. Além disso, períodos de delay desempenham papel importante no processo de supressão do solvente, pois o delay permite que o relaxamento de T1 ocorra. Já o *Mixing Time* utilizado no 1D-NOESY desempenha um papel importante no mecanismo de supressão. O valor ideal para o *Mixing Time* depende de vários fatores, como a relação peso molecular efetivo/tempo de relaxamento do soluto *versus*

o tempo de relaxamento dos sinais que se está tentando evitar (ou seja, o solvente) (MCKAY, 2011).

Normalmente para identificarmos compostos específicos em biofluidos os espectros de RMN de ^1H são comparados com moléculas de referência à amostra do biofluido pesquisado. Isto pode ser determinado por acesso à bancos de dados prévios como o *The Human Metabolome Database* (HMDB) (<https://hmdb.ca/>) e o *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRDB) (<https://bmrdb.io/>), os quais descrevem espectros de RMN de ^1H unidimensional (1D) e bidimensional (2D) (LINDON et al., 2000). Diversas técnicas de RMN de 2D podem ser utilizadas, sendo as correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ e $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ as mais empregadas. Experimentos 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation (HMQC), Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) e Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy (HSQC), quando aplicados em amostras plasmáticas, são eficientes na identificação de metabólitos, fornecendo informações sobre os deslocamentos químicos de ^{13}C utilizando detecção por ^1H (LINDON, 2000). Por meio da técnica de HSQC é possível determinar acoplamentos entre ^1H e ^{13}C ligados entre si diretamente, o que pode fornecer mais informações estruturais de determinado composto em análise (Figura 7) (POSTIGO, 2012).

FIGURA 7. MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADA (HSQCed).



FONTE DA FIGURA: Autor, 2021.

LEGENDA. Espectro de RMN de 2D do lactato obtido por correlação ^1H - ^{13}C HSQC editada (HSQCed). Condições do experimento: 310 K, ^1H : 600.13 MHz, ^{13}C 150.61 MHz, D_2O .

A avaliação metabolômica 1D por RMN de ^1H possui boa sensibilidade e curto tempo de aquisição, porém a presença de grande quantidade de sobreposições nos espectros faz com que a determinação 2D por RMN de ^1H seja uma alternativa eficiente. Esta avaliação por meio de uma segunda dimensão permite uma melhor análise estrutural (PUIG-CASTELLVÍ et al., 2018). Nesta perspectiva, para auxiliar na identificação dos metabólitos, utilizamos a correlação ^1H - ^{13}C HSQC editada (HSQCed) com o objetivo de determinar os metabólitos de forma mais sensível e específica. A técnica por HSQCed, ou também conhecida como edição de multiplicidade, é uma variante do experimento HSQC que correlaciona os deslocamentos químicos de prótons com os deslocamentos químicos de ^{13}C e assim

permite realizar a distinção entre carbonos contendo um número par (CH_2) ou ímpar (CH ou CH_3) de hidrogênios (SZAKÁCS e SÁNTA, 2015).

2.3.2 RMN aplicada à marcadores sanguíneos

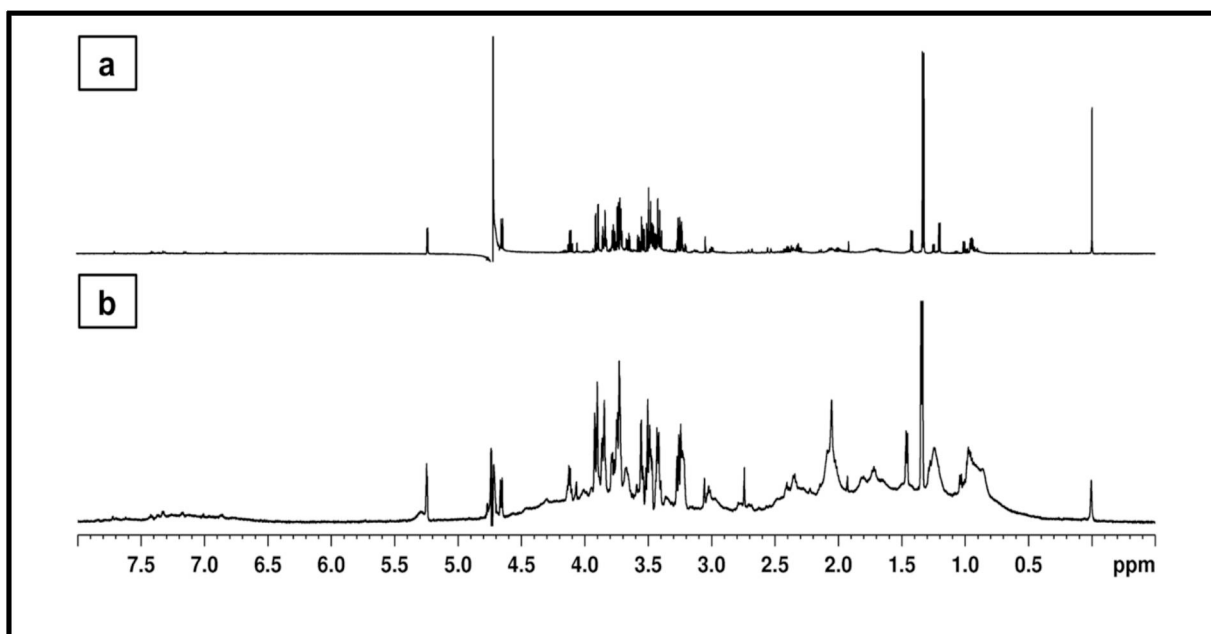
As dosagens de biomarcadores plasmáticos e séricos são fundamentais na avaliação de testes clínicos e também na rotina da clínica médica. Logo, é natural que exista uma correlação de estudos envolvendo multimetabólitos com diversas plataformas analíticas, em especial a RMN. Assim, pesquisas que envolvam informações sobre o comportamento de várias biomoléculas associadas ao metabolismo de doenças, como a DRC, podem ajudar a elucidar o metabolismo destas patologias. Para tanto, a avaliação metabólica da DRC em modelos animais e humanos tem sido amplamente utilizada com o propósito de identificar metabólitos em amostras de plasma, soro ou urina (WANG, et al., 2019).

A análise espectroscópica de RMN ^1H em amostras de plasma ou soro pode ajudar a estimar os níveis da maioria das pequenas moléculas no sangue. Isto pode ajudar nas decisões clínicas, ainda que no Brasil isso não seja uma realidade, pois é algo promissor e já ocorre em diversos países por meio da prestação de serviços comerciais e de testes laboratoriais baseados em análises em amostras sanguíneas, tudo isso com aprovação regulatória e amplo uso clínico (KEUN et al., 2018).

A grande quantidade de biomoléculas presentes no sangue faz com que a análise por RMN seja um desafio, tendo em vista que existe uma grande quantidade de proteínas, lipídeos, lipoproteínas e pequenas moléculas. Diante deste cenário, um espectro de RMN ^1H de amostras de soro ou plasma não tratados é destacado pela presença de grande sobreposição de sinais nos espectros de RMN ^1H , o que se deve ao deslocamento químico oriundo principalmente de prótons presentes nas proteínas e lipoproteínas plasmáticas (KEUN et al., 2018). Assim, pequenas moléculas que se apresentam nos espectros de RMN ^1H , em sua maioria são sobrepostas pelos sinais de hidrogênio destas macromoléculas. No entanto, a aquisição dos espectros de RMN ^1H pode ser melhorada com o auxílio de técnicas que ajudem a eliminar a carga protéica presente nas amostras de soro ou plasma. A Figura 8 descreve o comportamento metabólico de dois espectros de RMN ^1H em condições distintas de tratamento pré-analítico. Sendo que, os espectros foram adquiridos em amostras plasmáticas com e sem precipitação proteica. Fica evidente que o processo de

preparo de amostra por precipitação proteica, normalmente pelo uso de solventes orgânicos, é uma eficiente alternativa para identificar diversas moléculas por RMN ^1H , as quais anteriormente estariam sobrepostas por sinais de compostos macromoleculares presentes no sangue.

FIGURA 8. ESPECTROS DE RMN EM AMOSTRAS COM E SEM PRECIPITAÇÃO PROTEICA.



FONTE DA FIGURA: Autor, 2021.

LEGENDA. Espectros de RMN ^1H utilizando a técnica 1D-NOESY comparando as resoluções obtidas com (a) e sem precipitação proteica (b).

Condições do experimento: 310 K, ^1H : 600.13 MHz, ^{13}C 150.61 MHz, D_2O .

A espectroscopia de RMN pode rotineiramente detectar aproximadamente entre 50 e 68 metabólitos quando a desproteínização das amostras é realizada (KEUN et al., 2018). Uma outra alternativa é a aquisição de espectros de RMN utilizando a sequência de pulso Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG), a qual tem a capacidade de suprimir os sinais das proteínas plasmáticas. A análise das amostras sem necessidade de tratamento prévio é atraente, porém, diversas limitações fazem com que essa abordagem seja cada vez menos adequada para estudos metabolômicos. Essas limitações compreendem, (1) o número de metabólitos detectados ser inferior ou igual a 30, o que é muito abaixo do número real de metabólitos sanguíneos (PSYCHOGIOS et al., 2011); (2) subestimação de diversos metabólitos que tem sua detecção atenuada por suas ligações as proteínas plasmáticas/séricas; (3) o uso da

CPMG faz com que os sinais espectrais da linha de base fiquem distorcidos, o que é provocado por residuais macromoleculares, afetando a quantificação de diversos metabólitos; (4) excesso de proteínas presentes no plasma/soro causa a redução dos tempos de relaxação transverso, o que resulta em picos espectrais aumentados (reduzindo a precisão quantitativa).

A análise plasmática por espectroscopia de RMN tem avançado muito nas pesquisas que envolvem diversas doenças. Como exemplo, a DCV pode estar associada a diversas patologias, principalmente na DRC em que o risco deste evento é pelo menos 10 vezes maior que na população em geral (WANG et al., 2019). Esta associação de risco possui correlação com a capacidade aterogênica das partículas de LDL-colesterol, que com o auxílio da RMN pode mensurar o número e o tamanho destas partículas, revelando uma nova perspectiva na elucidação do mecanismo fisiopatológico da DCV (JEYARAJAH; CROMWELL; OTVOS, 2006). Outra patologia associada a DRC é o diabetes mellitus que tem como consequência a nefropatia diabética, a qual pode ser diagnosticada pelos ensaios em química clínica atuais, bem como por espectroscopia de RMN (MÄKINEN et al., 2006).

A espectroscopia de RMN pode ser útil na avaliação metabólica de diversas patologias associadas do sistema renal, como na avaliação metabólica da glomerulonefrite membranosa (TAHERKHANI et al., 2019), na resposta metabólica durante o processo de hemodiálise (FUJIWARA et al., 2015; GAGNEBIN et al., 2020), na comparação entre pacientes DRC com Diabetes e sem Diabetes (LEE et al., 2016), na nefropatia diabética (MÄKINEN et al., 2006), na detecção de desordens metabólicas presentes em pacientes com insuficiência renal moderada (MIKA, 2018) e no perfil metabólico de pacientes com DRC (QI, et al., 2012; SAGGI, et al., 2017).

Diante do exposto, diversos estudos sobre a DRC com RMN de amostras plasmáticas e sorológicas tem surgido, porém pesquisas que comparem a classificação atual da DRC baseada na TFGe e na albuminúria ainda são escassas. Assim, o presente trabalho teve como o objetivo principal avaliar por RMN ^1H a DRC nos seus diferentes estágios evolutivos, trazendo uma nova perspectiva a respeito da fisiopatologia desta doença que afeta milhares de pessoas no Brasil e no mundo.

3 HIPÓTESE

O estudo metabolômico da DRC por RMN ^1H pode revelar uma nova perspectiva para esta doença, pois permite uma análise por múltiplos metabólitos e não apenas por biomarcadores isolados.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Empregar a RMN ^1H na análise de amostras plasmáticas de pacientes em diferentes estágios da DRC, avaliando o perfil metabólico na busca por possíveis biomarcadores.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar metabolicamente por espectroscopia de RMN ^1H 1D e 2D todos os estágios da DRC e grupo controle;

- Buscar por meio das ferramentas estatísticas Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise por Mínimos Quadrados Parciais (AMQP), discriminar e classificar a DRC do grupo controle;

- Determinar por ACP os metabólitos capazes de distinguir os pacientes com DRC do grupo controle.

- Dentro das condições executadas pela pesquisa, construir com a ajuda da AMQP um modelo estatístico metabólico capaz de prever e classificar novos pacientes com DRC.

- Realizar a análise de mapa metabólico de pool plasmático de pacientes DRC G5 por meio da aquisição de espectros de RMN de 2D (HSQCed) e posterior submissão dos metabólitos encontrados na plataforma estatística online MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Por conseguinte, buscar um melhor entendimento das principais rotas metabólicas envolvidas na fisiopatologia da DRC.

- Determinar indiretamente as concentrações plasmáticas dos metabólitos quantificáveis nos espectros de RMN ^1H 1D e correlacionar os resultados obtidos com a evolução da DRC.

5 JUSTIFICATIVA

Segundo o Global Burden of Disease, em 2017 a prevalência global da DRC foi de 9,1% (697,5 milhões de casos) (CARNEY, 2020). Quando avaliamos dados nacionais, a prevalência pode alcançar os índices entre 6,27% – 7,26% da população brasileira (2002 – 2010) (MARINHO et al., 2017). O impacto econômico da DRC é global e os cuidados despendidos com os pacientes DRC envolvem diversas especialidades médicas e assistenciais, além de envolver custos que incidem diretamente nas famílias destes pacientes. De acordo com *National Kidney Foundation* (NKF), os gastos no tratamento da DRC nos Estados Unidos devem ultrapassar 48 bilhões de dólares ao ano, na Austrália os custos estimados com pacientes já diagnosticados e em novos casos de DRET foi de 12 bilhões de dólares, na Inglaterra os custos despendidos com doença renal são maiores que os valores gastos com o tratamento dos cânceres de mama, pulmão, cólon e pele juntos. No Brasil, o impacto financeiro da DRC e de algumas das principais doenças relacionadas, correspondem a 12,97% de todas as despesas direcionadas para o Sistema Único de Saúde no triênio 2013 – 2015 (ALCALDE; KIRSZTAJN, 2018). Tudo isso mostra a urgência de alternativas que busquem melhorar o diagnóstico e o monitoramento dos pacientes portadores de DRC. Neste sentido, novas técnicas analíticas que busquem encontrar biomarcadores que possam melhorar o diagnóstico precoce e também o monitoramento dos pacientes com DRC, podem reduzir significativamente os custos dos tratamentos para estes pacientes, bem como para os sistemas público e privado de saúde.

Em um amplo universo de técnicas analíticas, a metabolômica tem surgido como alternativa para uma análise baseada em multianálitos e não apenas em biomarcadores isolados, como tem sido utilizado atualmente. Neste contexto, a RMN ¹H tem sido opção como uma técnica qualitativa e quantitativa, com necessidade mínima de preparação de amostra, alta reprodutibilidade, análise não destrutiva da amostra, capacidade de detecção de um número expressivo de metabólitos em uma única análise e em um curto espaço de tempo. Assim, a análise metabolômica por RMN ¹H é uma grande alternativa na busca por novos biomarcadores, bem como por um melhor entendimento dos metabólitos envolvidos na DRC. Conseqüentemente, gerar uma nova perspectiva para melhorar a prevenção, o diagnóstico e o tratamento dos pacientes portadores de DRC.

6 MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação metabólica da coorte de pacientes com DRC exigiu diversas etapas, como a coleta e processamento das amostras (obtenção de amostras plasmáticas DRC e grupo controle), caracterização clínica e bioquímica, classificação de acordo com cada um dos estágios baseados na TFG e albuminúria, aquisição dos espectros de RMN ^1H e tratamento estatístico.

O desenvolvimento da metodologia analítica empregada envolveu previamente técnicas de preparo das amostras para posterior análise em RMN ^1H . Técnicas de detecção direta, separação física por membrana filtrante e precipitação proteica foram utilizadas com o objetivo de desenvolver a técnica de preparo ideal das amostras plasmáticas. A detecção direta das amostras plasmáticas foi realizada, porém, a alta carga de proteínas das amostras dificultou a resolução dos espectros de RMN ^1H . Já a análise por separação física, que envolveu o uso do dispositivo comercial Amicon®, não obteve o sucesso esperado devido a alta carga proteica das amostras que saturaram a membrana destes dispositivos, fazendo com que diversas moléculas ligadas a proteínas plasmáticas não pudessem ser analisadas por RMN ^1H . A melhor alternativa foi encontrada com o uso de solventes orgânicos para precipitar o excesso de proteínas plasmáticas das amostras, e assim, extrair moléculas ligadas a estas proteínas. Solventes como acetonitrila, acetona e metanol foram utilizados no processo de precipitação proteica, sendo que, o metanol foi o solvente ideal que permitiu as melhores análises espectrométricas de RMN ^1H .

Durante o processo de obtenção da coorte de pacientes, 77 amostras de sangue periférico foram obtidas por punção venosa, sendo 10 amostras controle e 67 amostras obtidas na clínica de doença renal crônica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Curitiba, Brasil) entre março e agosto de 2015. Todas as amostras obtidas foram classificadas de acordo com os estágios evolutivos da DRC com base em suas respectivas TFG e albuminúria. As amostras utilizadas foram previamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) sob os pareceres CEP/SD-PB nº 980.959 na data de 11/03/2015 (APÊNDICE I) e CEP/PUC-PR nº 557 na data de 26/06/2005 (APÊNDICE II), respectivamente.

6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

Foram incluídos no estudo 67 pacientes diagnosticados com DRC, em diferentes estágios, em tratamento no Ambulatório de Nefrologia da PUC-PR, atendidos pelo Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho, nefrologista do ambulatório. Os pacientes incluídos no estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), prontificando-se a participar de estudos elucidativos da DRC. Os critérios de inclusão aplicados foram idade entre 18 e 80 anos, presença de DRC e aceite na participação do estudo. Os critérios de exclusão foram sinais clínicos de inflamação aguda ou doença infecciosa, malignidade, terapia de reposição da função renal prévia ou atual, doença autoimune, neoplasias, disfunção hepática, uso de drogas imunossupressoras no momento ou nos últimos 3 meses.

6.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue total dos pacientes foram coletadas, no período de maio a agosto de 2015, no Ambulatório de Nefrologia da PUC-PR, no período da tarde (13:00 às 17:00 horas) em tubos secos sem anticoagulantes (e com ativadores de coágulo) e tubos com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) K₂. As amostras obtidas foram mantidas em gelo e processadas no período de 2 h até a centrifugação a 1500 g (força centrífuga relativa – RCF) por 10 min, a fim de se obter os soros e plasmas, e posteriormente estocados a -80°C até o momento das análises.

6.3 CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES

A TFG_e dos pacientes foi estimada pela fórmula do estudo CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) (LEVEY et. al., 2009; KDIGO, 2013; INKER et al., 2014), onde:

$$\text{TFGe} = 141 \times \min(\text{Cre}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{Cre}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0,993^{\text{Idade}} \times 1,018 [\text{se mulher}] \times 1,159 [\text{se negro}]$$

Sendo:

Cre = creatinina sérica; κ = 0,7 para mulheres e 0,9 para homens; α = 0,329 para mulheres e 0,411 para homens; min = indica o mínimo de Cre/ κ ou 1; max = indica o máximo de Cre/ κ ou 1. Já os estágios da DRC baseados nos níveis de albuminúria foram estabelecidos em grupos com níveis abaixo de 30 mg/g, entre 30 e 300 mg/g) e acima de 300 mg/g. Assim, os pacientes portadores de DRC e seus respectivos plasmas foram classificados seguindo as recomendações do KDIGO em estágios G1, G2, G3a, G3b, G4 e G5 e A1, A2 e A3, de acordo com seus respectivos níveis de TFGe e albuminúria, respectivamente (KDIGO, 2013; INKER et al., 2014).

6.4 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E BIOQUÍMICA DOS PACIENTES

No recrutamento, os pacientes DRC foram caracterizados de acordo com idade, gênero, raça, tabagismo, etilismo, presença de *Diabetes mellitus* e de hipertensão arterial. As dosagens de ácido úrico, albumina, cálcio, creatinina, fósforo, sódio, potássio e ureia foram realizadas por metodologia de química seca (Vitros 5,1 Fusion, Ortho Clinical Diagnostics, Nova Jérsei, EUA) e as dosagens de Proteína C Reativa de alta sensibilidade (PCR-US) por ensaio imunoturbidimétrico (AU680, Beckman Counter, Califórnia, EUA).

6.5 TRATAMENTO PRÉ-ANALÍTICO DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES DE RMN DE ^1H

As amostras plasmáticas, previamente congeladas, permaneceram em temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$) por 30 minutos e posteriormente agitadas em vortex a 2500 rpm. Sequencialmente, 400 μL de metanol grau UPLC foram adicionados em 200 μL de plasma descongelado. Sequencialmente, as amostras foram agitadas novamente em vortex (2500 rpm) por 1 minuto e armazenadas por 20 minutos a $-30\text{ }^\circ\text{C}$. Depois disso, as amostras foram centrifugadas a 15000 g por 30 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante de cada amostra foi evaporado e liofilizado (MIKA et al., 2018). Posteriormente, as amostras foram reconstituídas em 600 μL de óxido de deutério (água deuterada) contendo 0,1% de sal de sódio do ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanossulfônico (DSS). As soluções foram então transferidas para tubos de RMN

de 5 mm e mantidas a -20 °C antes da aquisição dos espectros de RMN. As amostras foram analisadas em duplicata para garantir a precisão das análises. Todos os espectros foram adquiridos a 310 K em um espectrômetro Bruker Avance III HD 600 MHz equipado com uma sonda TXI de 5 mm e gradiente de campo no eixo Z. O sinal do solvente foi suprimido utilizando a sequência de pulso noesypr1d (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany), na qual o pico de água residual é irradiado durante o atraso do relaxamento e durante o tempo de mistura (mixing time) de 100 ms. Os espectros foram gerados com 32.000 pontos de dados em uma largura espectral de 15.000 Hz em média em 64 transientes, apodizados por multiplicação exponencial correspondente à ampliação da linha de 0,3 Hz no espectro transformado e preenchido com zero por um fator de 4. As amostras foram analisadas em solução contendo D₂O e a homogeneidade do campo magnético foi otimizada para cada amostra. Os espectros foram faseados manualmente, corrigidos na linha de base e os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) em relação ao DSS (0,00 ppm). Para auxiliar na identificação dos metabólitos, a correlação ¹H-¹³C de uma ligação a partir de experimentos de RMN editados por HSQCed foram adquiridos usando um gradiente selecionado e um programa de pulso aprimorado pela sensibilidade. Os experimentos de HSQCed foram registrados usando a detecção de quadratura em dimensão indireta e adquiridas usando cada parâmetro de ¹H (f2) e ¹³C (f1) foram os seguintes: domínio do tempo (TD) 2 k e incrementos de 256, largura espectral (SW) 10,65 e 165 ppm, número de varreduras (NS) 128 e atraso de relaxamento (D1) 1,0 segundo e temperatura de aquisição 310 K.

6.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar os resultados laboratoriais os softwares AMIX[®] (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) e MestReNova[®] (Mestrelab Research, A Corunã, Spain) foram utilizados para a obtenção da ACP, MATLAB[®] (MathWorks Inc., Massachusetts, EUA) para o ADMQP, a plataforma on-line MetPA 4.0 (MetaboAnalyst, Alberta, Canada) (www.metaboanalyst.ca) para analisar as moléculas de interesse e categorizá-las em suas distintas rotas metabólicas e o Origin[®] 2018 (OriginLab Corporation, Massachusetts, EUA) para a obtenção da Análise de variância (ANOVA) – One-way ANOVA.

A ACP foi utilizada como método não supervisionado para analisar e maximizar a recuperação de informações de dados brutos. Para tanto, foi utilizado o intervalo de deslocamento químico entre 9,00 – 0,50, representando todas as ressonâncias de RMN nas amostras, com exceção da área entre 5,00 – 4,50 ppm que foi excluída do espectro de RMN com o objetivo de eliminar a água residual presente nas amostras. Essa faixa foi segmentada em pequenos *buckets* contínuos com 0,02 ppm de largura. A área sob cada *bucket* foi integrada usando o modo de integração especial. Os espectros foram escalados para a intensidade total, que por sua vez divide a área do *bucket* pela integral do espectro completo. Após esse procedimento, foi criada uma matriz na qual cada linha representa os espectros de RMN das amostras e cada coluna contém as áreas integradas do sinal original dentro de cada região do *bucket* específico. A matriz inicial foi composta por 68 amostras, cujos espectros de RMN foram obtidos em duplicata (136 linhas) e 386 variáveis ou *buckets* (colunas). Desta forma, com o objetivo de encontrar a melhor ACP, foram avaliadas diversas combinações estatísticas com os grupos DRC em todos os seus estágios evolutivos (baseados na TFGe e albuminúria) e o grupo controle. Estas combinações envolveram grupos isolados, grupos associados e também exclusão de grupos e/ou *buckets* de regiões específicas. A melhor performance encontrada para a ACP foi realizada com o escalonamento de Pareto, desvio padrão de 10% e intervalo de confiança de 95%. A identificação dos metabólitos responsáveis pela discriminação entre os grupos foi realizada através do gráfico de *loadings plot*, o qual apresentou a relação entre as variáveis através do peso relativo ou importância relativa de cada *bucket*.

A avaliação estatística supervisionada por AMQP permitiu a construção de um modelo estatístico capaz de classificar novos pacientes de acordo com o comportamento metabólico encontrado durante as análises. Os resultados da estatística por AMQP apresentaram metabólitos que contribuíram para a discriminação entre os pacientes DRC e controle. Os metabólitos responsáveis pelos dados de variância foram atribuídos com base em experimentos de RMN de 2D e sequencialmente por comparação destes com a literatura científica por meio de plataformas específicas de bancos de dados metabólicos (HMDB e o BMRDB).

As análises de vias bioquímicas foram obtidas com o auxílio da plataforma on-line MetaboAnalyst 4.0, a qual descreveu o perfil metabólico por análise de enriquecimento (de acordo com os respectivos valores de p) e por valores de impacto da via (por análise topológica da rota metabólica). Ficou estabelecido como valor de

corte (cut-off) o valor $>0,2$ para uma via metabólica potencial (MIKA et al., 2018). Este valor de cut-off foi estabelecido por ser o valor que possui a maior correlação entre o valor de p e o valor do impacto de via (XIA and WISHART, 2010; CHONG; WISHART; XIA, 2019).

A presença de sinais sem sobreposição nos espectros de RMN ^1H permitiu a possibilidade de quantificar moléculas por meio de suas respectivas integrações. Assim, com o objetivo de avaliar o comportamento destes compostos à medida que a DRC evolui, foi realizada a determinação indireta dos níveis destes compostos por ANOVA.

7. ARTICLE

UNTARGETED PLASMA ¹H NMR-BASED METABOLOMIC PROFILING IN DIFERENT STAGES OF CHRONIC KIDNEY DISEASE

Renato Itamar Duarte Fonseca^{1*}, Leociley Rocha Alencar Menezes^{2*}, Arquimedes Paixão Santana-Filho², Elberth Manfron Schiefer¹, Roberto Pecoits-Filho³, Guilherme Lanzi Sasaki², Andréa Emilia Marques Stinghen¹.

* Both authors contributed equally to this manuscript

¹Department of Basic Pathology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 80050-540, Brazil;

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 80050-540, Brazil;

Tecnológica Federal do Paraná, Av. Sete de Setembro, 3165, Curitiba, Brazil, 80230-901.

³Center for Health and Biological Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, CEP 80215-901, Brazil.

** Correspondence authors:

Andréa E. M. Stinghen (andreastinghen@ufpr.br) and Guilherme Lanzi Sasaki (sasaki@ufpr.br), Universidade Federal do Paraná, Mail Box 19031 Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR 80531-98 (Brazil).

ABSTRACT

Chronic Kidney Disease (CKD) is a serious public health issue that affects thousands all over the world. Currently, the diagnosis of CKD is made usually on the levels of the Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) and albuminuria, limiting the knowledge of the mechanisms behind CKD progression. The elucidation of the CKD metabolic behavior may help in the prevention and diagnose of this sickness. The aim of the present study was to identify changes in the metabolomic profile that occur as CKD advances. In this sense, 77 plasma samples from patients classified according to their respective levels of eGFR and albuminuria were subjected to protein precipitation and then to ^1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy and to a robust statistical analysis. ^1H NMR spectra and statistical analysis showed significant changes in metabolomic profile for CKD patients and control group. Principal component analysis (PCA) clustered CKD and control patients (both based on eGFR) into three distinct groups, control and stage 1 (G1) – stage 4 (G4) and stage 5 (G5), according to their respective metabolic profiles. Lactate, glucose, acetate and creatinine are responsible for discriminating the control group with all the others CKD stages. Valine, alanine, glucose, creatinine, glutamate, lactate and ND3 (not determined chemical shift) were responsible for the clustering G1-G4 stages. G5 was discriminated by calcium ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), magnesium EDTA, creatinine, betaine/choline/trimethylamine N-oxide (TMAO), lactate and acetate. A Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) of the data resulted in both train and test accuracy of 100%. Using 2D NMR ^1H - ^{13}C HSQC edited by CH_2 groups in opposite phase with CH and CH_3 groups, it was acceptable to ensure better accuracy signals corresponding to 1D NMR ^1H . This 2D NMR accuracy allowed that several determinate molecules by 1D NMR ^1H in CKD G5 plasma pool which were submitted in MetaboAnalyst 4.0 platform (MetPA) analysis what demonstrated that 13 metabolic pathways and specific molecules are involved in the CKD physiopathology. Statistical evaluation based on Analysis of Variance (ANOVA) allowed to estimate the spectra quantitative metabolites. These findings demonstrate that there are metabolomic differences in CKD in addition to that several specific metabolic pathways are statistically correlated with this pathology. Some compounds have been determined and suggest several metabolic routes associated with CKD profile. Metabolic changes associated with glycolysis and gluconeogenesis allowed discriminating between CKD and control patients. The determination of involved molecules in TMAO generation in G5 suggests an important role to this uremic toxin linked to CKD and cardiovascular diseases. PCA results discriminated G1 – G4 stages, G5 stage and control group according to the metabolites involved in glyceic, renal and cardiovascular metabolism. In addition, spectra quantitative indirect detection by ^1H NMR suggests a play an important role in CKD pathophysiology. The aforementioned results propose the feasibility of NMR-based CKD metabolomic evaluation.

Keywords: Chronic Kidney Disease, Nuclear Magnetic Resonance, Metabolomics, Statistical Analysis.

1. INTRODUCTION

According to Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) guidelines (HALLAN and ORTH, 2010; KDOQI, 2002), Chronic Kidney Disease (CKD) should be established based on the presence of kidney damage and level of renal clearance, both assessed by albuminuria and estimated glomerular filtration rate (eGFR), respectively. When CKD is not treated, this disease may progress to end-stage renal disease. At this stage the patient may require renal replacement therapy, such as dialysis and kidney transplantation (MIKA et al., 2018). Progressive loss of renal function that leads to the accumulation of uremic retention solutes in the circulation is a major feature found in CKD patients (ZHANG et al., 2017), and the early detection and continuous monitoring of CKD evolution could improve care and postpone CKD progression to end-stage renal disease (CHEN, D-Q. et al., 2019).

CKD complications decrease quality of life, in addition to contributing to high morbidity and mortality. As kidney clearance decreases, a variety of complications arise, like anemia, hypertension, mineral disorder, bone disorder, hyperkalemia, metabolic acidosis, and cardiovascular disease (BELLO et al., 2017; CHEN, T. K. et al., 2019). Cardiovascular mortality in patients with CKD is at least 8-10 times higher than in the general population. The increased risk of cardiovascular disease in CKD patients includes stroke, myocardial infarction, peripheral arterial disease and also cardiovascular calcification (JHA and WANG, 2012).

The eGFR is usually estimated from serum concentrations of endogenous creatinine or cystatin C (PRICE and FINNEY, 2000). Although serum creatinine based on eGFR is the best-known biomarker to determine the diagnosis and different stages of CKD, this biomarker is limited, since variations are detected only when the renal function has already been compromised (URBSCHAT et al., 2011). Moreover, clinical conditions such as gender, age, muscle metabolism, muscle mass, overall body weight, hydration status, and nutritional status compromise the determinations of creatinine concentrations. Unfortunately, there are no clinical symptoms in the early stages of CKD until further damage has occurred (WANG et al., 2019). Furthermore, seeking for alternatives in monitoring this progression, the metabolic profile evaluation has been vastly researched in current works (QI et al., 2012; SHAH et al., 2013; ZHAO Y-Y, 2013; KIM et al., 2014; LEE et al, 2016; HOCHER and ADAMSKI, 2017; SAGGI

et al., 2017; GRAMS et al., 2018; MIKA et al., 2018; HANIFA et al., 2019; TITAN et al., 2019). Therefore, findings of specific CKD biomarkers at early stages could improve an early therapeutic intervention and treatment.

Metabolomics has emerged as a new approach for biomarkers and pathways investigation as a useful tool for CKD research (GRAMS et al., 2018; TITAN et al., 2019), since an extensive review of many molecules can provide more efficiently the progression of CKD than a single-biomarker monitoring. ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) metabolomics with supervised and unsupervised statistical tools are an extremely efficient alternative (ZHAO Y-Y, 2013; WANG et al., 2019). NMR is a fast analytical technique, non-destructive and with high performance, which provides identification and direct quantification of several compounds simultaneously (DUNN; ELLIS, 2005).

The metabolomic studies for small molecules are important tools for research on CKD (HOCHER and ADAMSKI, 2017). In addition, continuous technological improvements, collaborative work through metabolomic platforms and metabolic profiles in large cohort studies should generate new biomarkers, insights into the pathophysiology of CKD and new therapeutic opportunities (GRAMS et al., 2018). Thus, when we evaluate CKD based on a single metabolite (creatinine's eGFR) and statistical models based on unsupervised multivariate analysis of several metabolites, it is reasonable to infer that these changes revealed by NMR spectra can be more sensitive than isolated eGFR (QI et al., 2012).

CKD metabolomic profile evaluation by NMR spectroscopy has been increasingly used in recent years. Previous studies have evaluated patients in stage 1 (G1), stage 2 (G2), stage 3a (G3a) and stage 3b (G3b) (QI et al., 2012), total kidney nephrectomy in animal models (KIM et al., 2014; HANIFA et al., 2019), hemodialysis patients with chronic glomerular nephropathy (FUJIWARA et al., 2015), with and without diabetes mellitus (LEE et al., 2016), CKD G3a and G3b stages – CKD stage 5 (G5) (SAGGI et al., 2017) and CKD patients stages G3a and G3b (MIKA et al., 2018). However, most of these studies do not have a detailed investigation of all CKD stages. QI et al. (2012) evaluated 80 CKD patients and 20 control patients using ¹H NMR spectroscopy and supervised and unsupervised statistical analyzes, allowing clustering CKD patients. ¹H NMR metabolomic combined with chemometric analysis, was used in CKD animal models allowed the determination of significant changes of

several compounds (KIM et al., 2014; HANIFA et al., 2019). FUJIWARA et al. (2015) analyzed dialysate samples from 9 patients with chronic glomerular nephropathy in hemodialysis by ^1H NMR and metabolically discriminate these patients. Evaluation of metabolic profile of CKD patients, with and without diabetes mellitus, was performed by ^1H NMR spectroscopy in combination with Principal component analysis (PCA) and Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), which allowed to discriminate these two groups of CKD patients (LEE et al, 2016). SAGGI et al. (2017) demonstrated that, in 24 CKD Stages G3a and G3b – stage 4 (G4) patients using ^1H NMR metabolomic and chemometric evaluation, the feasibility to predict the benefit from probiotics. ^1H NMR metabolomic study of 13 CKD G3a and 20 CKD G3b patients, along with multivariate analyzes, allowed to distinguish CKD from control patients (MIKA et al., 2018).

Metabolomics studies provide a range of complex multivariate data sets that require software for visualization and bioinformatics and multivariate data analysis for elucidation (BECKONERT et al., 2007). In this sense, our study was able to assess CKD patients at all stages, assessing the linked metabolomic characteristics with statistical analysis. Thus, the aim of the present study was to evaluate CKD patients plasma samples by ^1H NMR spectroscopy in order to search for biomarkers involved in the CKD profile. Multivariate analysis by PCA and PLS-DA allowing the determination of different metabolites between control patients and CKD stages. We also used univariate analysis based on Analysis of Variance (ANOVA) to determining the quantifiable metabolites of the study patients. It was also possible to determine the group V metabolic pathways, which was carried out by MetaboAnalyst 4.0 platform (MetPA) (www.metaboanalyst.ca). In this context, the patients plasma evaluation based on multiple analytes shows that there is a possibility to discriminate CKD patients in an innovative way in groups according to metabolic behavior and not just by isolated biomarkers.

2. METHODOLOGY

The patients cohort metabolomic evaluation with CKD required several steps, like samples collection and processing, clinical and biochemical characterization eGFR and albuminuria CKD classification, acquisition of ^1H NMR spectra and statistical evaluation.

Experiments were conducted as per the Ethical Committee of Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Brazil) and Ethical Committee of Pontificia Universidade Católica do Paraná (Curitiba, Brazil), under the numbers CEP/SD-PB no 980959 (11/03/2015) and CEP/PUC-PR no 557 (26/06/2005), respectively. Informed consent was obtained from the patients.

2.1 Patients

The number of CKD and controls samples was obtained with peripheral blood ($n = 77$) were performed by venipuncture, with 10 control samples and 67 CKD samples obtained from the chronic kidney disease clinic of the Pontifical Catholic University of Paraná (Curitiba, Brazil). Inclusion criteria were: (i) Age between 18–80 years, (ii) patient with CKD and (iii) willingness to participate in the study. Exclusion criteria were: (i) Signs of active inflammatory or infectious diseases, (ii) malignancy, (iii) previous or current renal function therapy, (iv) autoimmune diseases, (v) neoplasms, (vi) hepatic dysfunction, and (vii) use of immunosuppressive drugs in the last three months before inclusion in the study. eGFRs were calculated based on the Kidney Disease Improving Global Outcomes recommendations (KDIGO) and in the study equation formulated by the *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) (LEVEY et. al., 2009; KDIGO, 2013; INKER et al., 2014).

2.2 Patients' Samples Collection and Processing

Whole blood samples were obtained by venipuncture EDTA tubes. Plasma was collected, divided into aliquots, and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Patients were classified according the recommendations of *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)* in CKD stages G1, G2, G3a, G3b, G4 and G5 and A1, A2 and A3, according to their respective levels of eGFR and albuminuria (KDIGO, 2013; INKER et al., 2014).

2.3 Clinical and Biochemical Characteristics of the Patients

During inclusion, patients were characterized according to their age, gender, race, smoking, presence of Diabetes mellitus and/or hypertension. High sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) was assessed by an immunoturbidimetric assay (AU680, Beckman Counter, CA, USA) and others biochemical parameters were measured by Vitros® MicroSlide Technology (Vitros 5,1 Fusion, Ortho Clinical Diagnostics, NJ, USA).

2.4 Sample preparation and NMR spectroscopy analysis

The frozen plasma samples were thawed at room temperature (~25 °C) and vortexed. 400 µL of methanol were then added in 200 µL of thawed plasma. The samples were once more vortexed for 1 minute and stored for 20 min in -30 °C. Thus, samples were centrifuged at 15,000 g for 30 min at 4 °C. The supernatant of each sample was dried and freeze-dried (MIKA et al., 2018). Subsequently, the samples were reconstituted in 600 µL of the deuterium oxide (NICHOLSON et al., 1995) containing 0.1% of 3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt (DSS). The solutions were then transferred to 5 mm NMR tubes and kept at -20 °C prior to acquiring the NMR spectra. Samples were analyzed in duplicate. All ¹H-NMR spectra were acquired at 310 K to avoid modification of small molecules in plasma samples (GARCIA-PEREZ et al, 2020), on a Bruker Avance III 600 MHz NMR spectrometer operating at 14.1 T and observing ¹H and ¹³C at 600.13 and 150.61 MHz, respectively. The spectrometer was equipped with a 5 mm inverse detection TXI probe with z-gradient. The acquisition was performed using a ¹H NMR solvent-presaturation (noesypr1d), a solvent suppression pulse sequence (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany), with relaxation delay (D1) of 10.0 s and mixing time of 100 ms (GARCIA-PEREZ et al, 2020). Spectra were generated with 32 k data points over a 25 ppm spectral width averaged over 64 transients, apodised via exponential multiplication corresponding to 0.3 Hz line broadening in the transformed spectrum, and zero filled by a factor of 4. Samples were locked on the deuterium signal from D₂O, and the magnetic field homogeneity was optimized for each sample. Spectra were manually phased, baseline-corrected and chemical shifts were expressed in δ (ppm) relative to DSS. To assist the metabolites identification, one-bond ¹H-¹³C correlation from

heteronuclear single quantum coherence edited (HSQCed) NMR experiments were acquired using a gradient selected and sensitivity enhanced pulse program (SANTANA-FILHO et al., 2017). HSQCed NMR experiments were recorded using quadrature detection at indirect dimension and acquired using each parameter of ^1H (f2) and ^{13}C (f1) were as follows: time domain (TD) 2 k and 256 increments, spectral width (SW) 10.65 and 165 ppm, number of scans (NS) 128, relaxation delay (D1) 1.00 s and measuring temperature 310 K.

2.5 Statistical and metabolic pathway analysis

AMIX[®] (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) and MestReNova[®] (Mestrelab Research, A Coruña, Spain) and MATLAB[®] (MathWorks Inc., Massachusetts, EUA) were used for supervised and unsupervised ^1H NMR spectra. In this way, PCA and PLS-DA multivariate analysis were performed. One-way ANOVA was performed with Origin[®] 2018 (OriginLab Corporation, Massachusetts, EUA) (GLANTZ; SLINKER; NEILANDS, 2016) and evaluated the differences among concentrations of compounds in the different CKD groups. MetaboAnalyst 4.0 (MetaboAnalyst, Alberta, Canada) (www.metaboanalyst.ca) was used to select the most influential molecules found in the CKD G5 pool by ^1H NMR analysis and thus evaluate the pathophysiology of this disease and classify it according to the determined metabolic pathways.

Chemical shifts between 9.00 and 0.50 ppm represented all ^1H NMR resonances in the samples. Such range was segmented in continuous small buckets 0.02 ppm wide. The area between 5.00 and 4.50 ppm was excluded from the ^1H NMR spectra to eliminate residual water. The area under each bucket was integrated using the special integration mode. The spectra were scaled to total intensity, which in turn divides the bucket area by the integral of the complete spectrum. After this procedure, a matrix was created in which each row represents the ^1H NMR spectra of the samples and each column contains the integrated areas of the original signal within each bucket region. The initial matrix was composed by 68 samples, from which ^1H NMR spectra were obtained in duplicate (136 lines) and 386 variables or buckets (columns). For the PCA analyses, it was used Pareto scaling due to its appropriate application to chemical data where larger peaks are often more reliable and less susceptible to noise (IVOSEV et al., 2008), such as in the case of ^1H NMR (EMWAS et al., 2018).

The identification of the metabolites responsible for the discrimination between groups was performed through a loadings plot, which demonstrated the weights of each bucket. The metabolites responsible for the variance data were attributed based on 2D NMR experiments and based on comparison with the literature.

From the PCA results, PLS-DA was used to create a classification model and verify their predictive ability to recognize new samples among the three PCA-classified classes. In this way, the integrated areas of each bucket from ^1H NMR spectra were transformed into ASCII files and the resulting data matrices were imported into the MATLAB[®] software. The establishment of models through PLS-DA was performed with 136 spectra, where 75% (104 spectra \times 386 buckets) and 25% (34 spectra \times 386 buckets) of the plasma samples were reserved for calibration and external validation sets, respectively. On the other hand, the Y matrix of the calibration set has the number of lines equal to the number of samples, while only a column represents the sample classes (1, 2 or 3) for calibration model (104 \times 1). The autoscaling pre-processing was used in the calibration set in order to put the same weight in all variables. Thus, a model was constructed by PLS-DA followed by cross-validation using the leave-one-out method. In the construction of the model, threshold values were calculated to classify the validation set (34 spectra \times 386 buckets) as belonging or not to a given class (1, 2 or 3). In addition, the Root Mean Squared Error of Calibration (RMSEC), Root Mean Squared Error of Cross-Validation (RMSECV), and Correlation Coefficient (r^2) were then used to evaluate the performance of the model.

Biochemical pathways were obtained with the aid of MetaboAnalyst 4.0 online platform. The metabolomic profile was defined by enrichment analysis (according to the respective p values) and by pathway impact values (by metabolic route topological analysis). The pathway impact was performed by MetPA considering cut-off value >0.2 as significant. This pathway impact cut-off was chosen because it is value that has the highest correlation between p (p-value) and pathway impact (XIA and WISHART, 2010; CHONG; WISHART; XIA, 2019).

3. RESULTS

3.1 *Clinical and Biochemical characteristics of the study population*

Clinical and biochemical characteristics of the study population are described in Tables 2 and 3 (supplemental data). To enable uniformity of control patients, all were selected based on eGFR >90 mL/min/1.73m² and albuminuria <30mg/g.

3.2 *NMR plasma metabolic analysis*

Plasma metabolites from control and CKD patients were investigated using ¹H NMR spectroscopy to identify the metabolomic profile. 1D and 2D NMR metabolites evaluation in the progression of CKD was performed with sample pools from control (Figures 4 and 8 – supplemental data), G1 (early) (Figure 5 and 9 – supplemental data), G3b (moderate) (Figure 6 and 10 – supplemental data) and G5 (severe) (Figure 7 and 11 – supplemental data) patients, respectively (supplemental data). The chemical shifts from pool plasma samples are described in Table 4 (supplemental data) and were referenced according to the on-line databases Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRDB) (<https://bmrdb.io/>) and Human Metabolome Data Base (HMDB) (<https://hmdb.ca/>).

3.3 *Statistical analysis*

The aim to find the best PCA, several statistical combinations were performed with all CKD groups (based on eGFR and albuminuria) and the control group. These combinations involved isolated groups, associated groups and also the behavior of the PCA with the exclusion of groups and/or buckets from specific regions (Figure 15 and table 6 – supplemental data). CKD albuminuria scores plots clustered the plasma samples in 3 groups, but this groups represent the same separation for CKD eGRF patients, which has a more representative number of spectra. In this way, PCA best performance results was determined in all CKD eGRF stages samples and control patients through Pareto scaling method with confidence level of 95% (average dispersion level).

Scores plots PCA analysis obtained from the control group and all CKD eGFR patients plasma are depicted in Figure 1. PC1 and PC2 together explained 41.88% of the total variance. Individually, PC1 and PC2 represented 28.10% and 13.78%, respectively. The scores plots showed a discrimination of the three groups. The separation into 3 groups demonstrates an atypical metabolic behavior as CKD enhance. Control patients occupied the positive side of PC1 and the negative side of PC2. Stages G1-G4 group occupied the positive and negative regions of PC1 and were dispersed along PC2. Finally, the G5 group occupied the negative region of PC1 and negative PC2 (Figure 1).

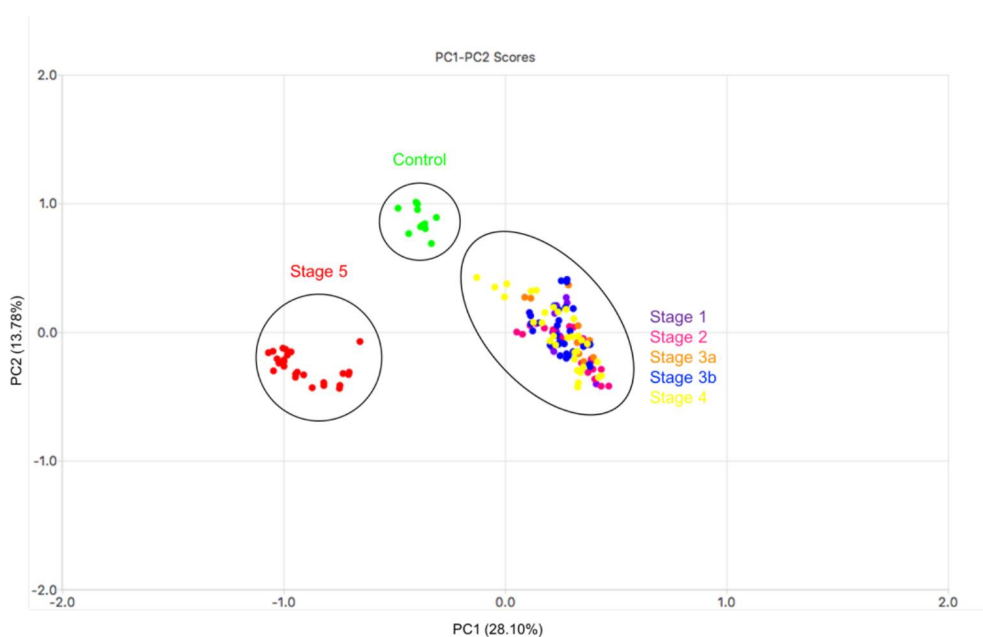


Figure 1. Unsupervised statistical evaluation (PCA – Scores plots) assignments of the ^1H NMR signals from the plasma samples of the all CKD eGFR classification and control patients involved in the study.

According to the eGFR loadings plot PCA analysis, the buckets corresponding to the chemical shifts of lactate (δ 1.31 and 4.09), glucose (δ 3.39; 3.53), acetate (δ 1.89) and creatinine (δ 3.05) are responsible for discriminating the control patients with the other CKD eGFR stages. L-valine (δ 1.04), L-alanine (δ 1.47), glucose (δ 3.23; 3.39; 3.41; 3.45; 3.47; 3.53; 3.69; 3.71; 3.81; 3.87 and 5.21), creatinine (δ 3.05), L-glutamate (δ 2.33) lactate (δ 1.31 and 4.09) and ND3 (δ 2.87) were responsible for the clustering of the stages G1-G4. While G5 was discriminated by the buckets of calcium EDTA (δ 2.57; δ 3.11; 3.13 and 3.15), magnesium EDTA (δ 2.71), creatinine (δ 3.05), lactate (δ 1.31), acetate (δ 1.89), glucose (δ 3.41; 3.45; 3.47; 3.69; 3.71; 3.87 and 5.21)

and betaine/choline/TMAO (δ 3.27). Loadings plot PCA analysis are described in Figure 2.

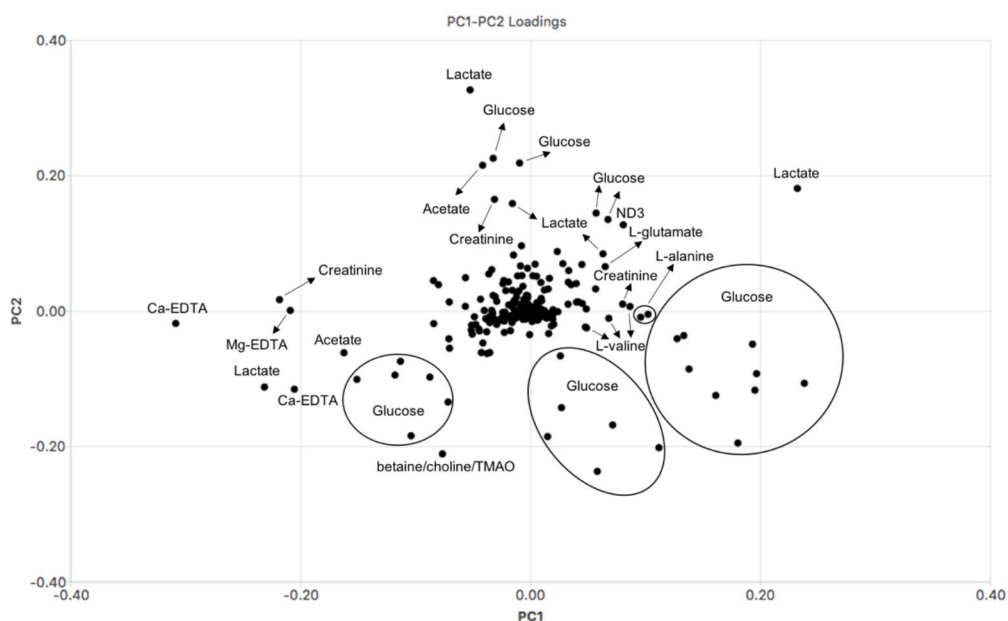


Figure 2. Unsupervised statistical evaluation (PCA – Loadings plot) assignments of the ^1H NMR signals from the plasma samples of the all CKD eGFR classification and control patients involved in the study.

After applying PCA analyses, the classification method PLS-DA in CKD eGFR was performed. Based on this study limitations, PLS-DA model indicated 100% in both train and test accuracies, being named calibration set recognition and external set validation, respectively in Table 1.

Table 1. The overview of classification results obtained by PLS-DA.

PLS-DA Parameters	
Control patients	1
Stages I-IV	2
Stage V	3
Latent variable number	3
RMSEC^(a)	0.066
RMSEC^(b)	0.085
R²^(c)	0.984
*Recognition ability (%)^(d)	100
*Prediction ability (%)^(e)	100

^(a)RMSEC: Root Mean Squares Error Calibration; ^(b)RMSECV: Root Mean Squares Error Cross Validation; ^(c)R²: Correlation Coefficient; ^(d)Recognition ability (%) for calibration set; ^(e)Prediction ability (%) for external validation set. *Recognition and prediction based on the study analytical conditions.

3.4 Metabolic pathway analysis

The behavior of the metabolic ¹H NMR profiles of the CKD and control patients showed significant differences in eGFR and albuminuria classification (Figures 12 and 13 – supplemental data). Using MetaboAnalyst 4.0 platform (www.metaboanalyst.ca), 35 metabolic pathways in CKD G5 pool were found. The number of the determined metabolic pathways is described in detail in the supplementary data (table 5 – supplemental data). Pathway impact and p-value was performed with MetPA software and are described in Figure 3.

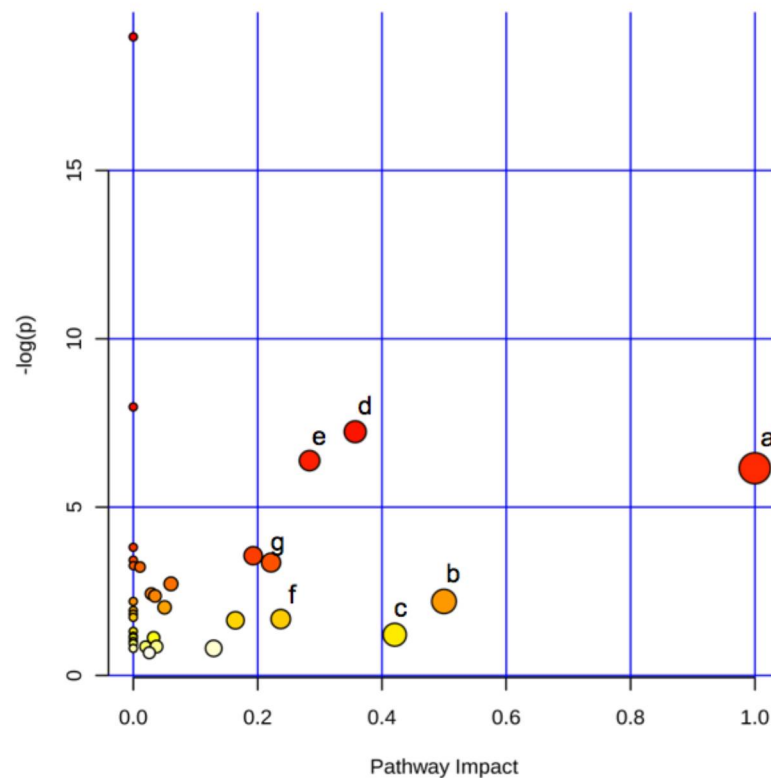


Figure 3. Pathway Impact (>0.2) and p-value (< 0.05) of CKD Cohort performed with Metabolic Pathway Analysis (MetPA) software. The color and size of each circle are based on its p-value and pathway impact value, respectively (yellow, low impact; orange, medium impact; red, high impact). The circles that are more closely of the top right diagonal region are significantly changed, and that they are more likely to have significant impacts on the pathways based on their positions.

Analyzing these metabolic pathways, 13 pathways were statistically significant with a p-value <0.05. An impact value of 0.2 as cut-off point for a potential path goal in order to delimit the major metabolic pathways involved. The major metabolic pathways with p<0.05 or a cut-off> 0.2 are: 1) aminoacyl-tRNA biosynthesis; 2) valine, leucine and isoleucine biosynthesis; 3) phenylalanine metabolism; 4) alanine, aspartate and glutamate metabolism; 5) phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; 6) butanoate metabolism 7) glyoxylate and dicarboxylate metabolism; 8) arginine biosynthesis; 9) arginine e proline metabolism; 10) valine, leucine and isoleucine degradation; 11) glutamine and glutamate metabolism; 12) starch and sucrose metabolism; 13) tryptophan metabolism. Thus, statistical significant pathways with a p-value <0.05 and pathway impact >0.2 determinate were phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis (a); Glutamine and glutamate metabolism (b); Starch and sucrose metabolism (c); Phenylalanine metabolism (d); Alanine, aspartate and

glutamate metabolism (e); Tryptophan metabolism (f) and arginine and proline metabolism (g).

3.5 ¹H NMR quantitative plasma spectra analysis

ANOVA ¹H NMR spectra evaluation of the signals without overlapping allowed to quantify the respective integrations, and thus, to evaluate the compounds associated while the CKD advance. In this sense, an indirect determination of the levels of these compounds was carried out in order to assess the behavior during the evolution of CKD (Figure 14 – supplemental data).

Integral level determination for lactate, alanine and N-acetyl-L-aspartate showed oscillations as the CKD advance. Acetate showed a significant reduction and creatinine and betaine/choline/TMAO showed significant increases in all CKD stages. Calcium EDTA levels showed a reduction in all CKD eGFR stages, more significantly in G4 and A2. In addition, magnesium EDTA also showed a significant reduction in its concentrations in all CKD eGFR stages. Using the classification based on albuminuria, the reduction of calcium and magnesium levels is evident when comparing control patients and all CKD albuminuria stages, with a reduction in magnesium EDTA levels being more evident than calcium EDTA levels.

4. DISCUSSION

In the present study, we performed a metabolomic profile evaluation of a CKD cohort with CKD stages G1-G5, A1-A3 and a control group using ^1H NMR spectroscopy in association with PLS-DA, PCA, ANOVA and MetPA statistical analysis. Our results showed that ^1H NMR spectroscopy allowed the simultaneous determination of several molecules involved in the CKD pathophysiology, revealed a better understanding of CKD more than the monitoring by eGFR *per se* (URBSCHAT et al., 2011). Lactate, glucose, acetate and creatinine discriminated the control group from the eGFR stages of CKD. Valine, alanine, glucose, creatinine, glutamine, lactate and ND3 (not determined chemical shift) discriminated stages G1-G4 from G5 and control patients. The determination of calcium EDTA, magnesium EDTA, creatinine, betaine/choline/TMAO, lactate and glucose allowed to discriminate G5. These differences demonstrate that, as CKD progresses, the metabolic behavior of this pathology may suggest new, more sensitive, and more specific biomarkers than current ones. In addition, the HSQCed and metabolic route analysis MetPA of CKD G5 pool introduced a more detailed assessment of CKD, contributing to a better understanding of possible metabolic routes involved in this sickness.

Herein, several compounds were identified in the different CKD stages, such as aminoacids and compounds associated to glycolysis and gluconeogenesis. In fact, experimental studies with plasma of rats with CKD induced by surgical reduction of renal mass showed important metabolic changes in the early stages of CKD, particularly in acid-base and amino acid metabolism (KIM et al., 2014). In agreement to MIKA et al. (2018), ^1H NMR spectroscopic analysis combined with multivariate analysis, such as PLS-DA, was able to differentiate control group from CKD patients. KURANO and YATOMI (2019), using Orthogonal Projections to Latent Structures (OPLS) discriminated a nephropathy in hyper IgA mice from a control Balb/c mice.

According to HATTORI et al. (2017), amino acids are not only essential nutrients for the body but act as powerful molecular biomarkers. In addition to amino acids, other molecules are involved in the endogenous metabolism of glycolysis (glucose and lactate), like proteins and other organic components (acetone, succinic acid, creatine, creatinine, choline, TMAO and betaine). Our analyzes were able to determine several of these compounds such as lactate, glucose, valine, alanine, creatinine and a chemical shift consistent with the betaine/choline/TMAO. Thus,

glycolysis components, amino acids and organic molecules are among the main ones determined molecules. In this sense, a study with CKD patients in 4 stages (n = 80) and control patients (n = 28) using ^1H RMN, PCA and PLS-DA, it was possible to determine the products of glycolysis (glucose and lactate), amino acids (valine, alanine, glutamic acid, and glycine), organic osmolytes (betaine, myo-inositol, taurine, glycerophospholine), which contributed significantly to distinguish CKD in its different stages (QI et al., 2012).

Creatinine is an organic component produced from a non-enzymatic reaction that degrades approximately 2% of total levels of creatine, been later excreted by the kidneys into urine (WALLIMANN et al., 2017). The serum creatinine and blood urea nitrogen (BUN) are currently used to assess kidney function but have low sensitivity and specificity to determine early kidney injury (MORI and NAKAO, 2007). In this way, ANOVA indirect analyzes were able to determine the presence of an increase of creatinine levels in CKD samples by NMR spectroscopy and PCA discriminated this metabolite in control group, G1-G4 and G5, confirming that the presence of this biomarker is evident in advanced CKD stages (URBSCHAT, 2011).

L-Lactic acid is the tricarboxylic acid cycle metabolite that involves energy metabolism. Changes in this metabolite can be related to an increase in energy metabolism via glycolysis and response to oxidative stress (BEGER, et al., 2010). The PCA analysis discriminated lactate and acetate in CKD G5 and control group patients. ANOVA indirect quantification revealed a decrease in lactate and acetate as CKD evolves. These findings demonstrate the metabolic alteration present during the evolution of CKD. According to BELLOMO (2002), lactate levels are reduced in chronic kidney failure when compared to acute kidney failure, and kidney uptake of lactate can be responsible for approximately 40% of renal glucose production post-absorptive and 60% of renal glucose production during hypoglycemia. Thus, lactate can be the main gluconeogenic precursor in the kidney under some conditions and contributes significantly to the glycemic impact of other specific renal precursors of gluconeogenesis, such as glycerol (CEROSIMO, *et. al.*, 1998), alanine and glutamic acid (STUMVOLL et al., 1998).

The patients baseline characteristics demonstrate that there is considerable antidiabetics use (40%) and a hyperglycemic condition (116.59 mg/dL and 7.51% - glucose and glycated hemoglobin averages, respectively), which may explain the lactate metabolism in these patients. 48.5% of CKD patients used antidiabetics

metformin as a therapeutic alternative. Metformin is a biguanide drug that its use is discouraged by most guidelines and reviews (KAJBAF, et al., 2013). In addition, this drug can also be associated with lactic acidosis (KUAN, et al., 2019) and being responsible for inhibiting hepatic gluconeogenesis by reducing mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity (MADIRAJU, et al., 2014).

Choline metabolism, amino acid metabolism, energy metabolism and oxidative stress play pivotal roles in CKD and organ dysfunction (WANG et al., 2019). Choline is a water-soluble vitamin that is part of the B complex. Along with carnitine, choline plays an important role in the generation of uremic toxins. This is evidenced more specifically in the formation of trimethylamine (TMA), which is oxidized in the liver to TMAO, an important uremic toxin linked to CKD (FERNANDEZ-PRADO et al., 2017). PCA statistical analyzes showed that a bucket region (3.22 - 3.26 ppm) liable for betaine, choline and TMAO are responsible for discriminated CKD G5 patients from others study patients, which may suggest indirectly changes in the TMAO generation via choline and betaine gut microbial metabolism (JANEIRO et al., 2018). An increase in betaine/choline/TMAO ANOVA indirect quantification may suggests an enlargement risk of cardiovascular events in CKD patients (JANEIRO et al., 2018; HAGHIKIA et al., 2018).

Through PCA analysis using ¹H NMR-based metabolite profiling, it was shown that alanine and valine was discriminated in stages G1-G4 when compared with G5 and control group. L-alanine and L-valine are amino acids that are directly correlated with glycolysis through transamination reactions, generating glutamate and glutamine, respectively (GORE et al., 2003). In the glycemic metabolism, alanine is used during gluconeogenesis as the primary precursor in the glucose generation by liver through the conversion of alanine to pyruvate and the latter to glucose. This process happens through the metabolization of pyruvate, which is derived from glucose, undergoing muscle transamination to alanine, being released into the circulatory current and, ultimately, glucose is converted into the liver (GARBER et al., 1976; NELSON et al., 2013). The presence of L-alanine, L-valine and L-glutamate in PCA discrimination is also related to our analysis of the metabolic pathway of valine, leucine and isoleucine biosynthesis; alanine, aspartate and glutamate metabolism; valine, leucine and isoleucine degradation and D-glutamine and D-glutamate metabolism. Glutamate is an anion generated from the loss of a proton from L-glutamic acid. This metabolite is a non-essential amino acid that can be synthesized by the body through several

metabolic routes and acts as an excitatory neurotransmitter of the central nervous system (WATKINS and EVANS, 1981). In the γ -glutamyl cycle, glutamic acid is an auxiliary intermediate in the formation of the antioxidant glutathione (MEISTER and TATE, 1976). Glutamate has an important biochemical role as an excitatory neurotransmitter, which is antagonized by the inhibitory effects of gamma aminobutyric acid (GABA) (PETROFF, 2002). Experiments with hypertensive rats with CKD showed enhanced GABA receptor function and regulation in the afferent renal fibers that transmit information to the sympathetic and parasympathetic nerves that regulate blood pressure through baroreceptors (DURGAM; VITELA; MIFFLIN, 1999; SVED et al., 1985; CHEN, H-H et al., 2016). Thus, changes in L-glutamic acid metabolism may suggest a compensatory mechanism to the inhibitory effect of GABA, which directly reflects in the blood pressure of CKD patients (93.55%).

The determination of tryptophan in CKD G5 pool HSQC analysis correlates is in agreement with its metabolomic pathway, tryptophan metabolism and phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis can be linked with a reduction in the enzymatic activity of tryptophan hydroxylase-1 (TPH-1), responsible for the synthesis of 5-methoxytryptophan (5-MTP). According to HO et al. (2016), coronary artery disease is inversely correlated with the concentration of 5-MTP, which agrees with the highest probability of cardiovascular complications presented by these patients. The 5-MTP is also correlated with the anti-inflammatory activity mediated by inhibition of inflammatory markers such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and Cyclooxygenase-2 (COX-2) (CHEN, D-Q. et al., 2019), these biomarkers are present in significant concentrations in CKD patients. When the baseline data of patients with CKD is analyzed, it is possible to recognize a high cardiovascular and inflammatory profile that can be understood by hs-CRP raised values (VELDE et al, 2012). The presence of tryptophan might also be correlated with increased production of indoxyl sulphate, since it is derived from the degradation of tryptophan by intestinal microbiota (LEONG and SIRICH, 2016).

The indirect assessment of calcium and magnesium levels were obtained through the analysis of the integrals of the chemical shifts related to EDTA chelated to these ions. As CKD advance, levels of these metals are reduced in GRFe and albuminuria CKD classification. Clinical and experimental studies have shown that magnesium deficiency leads to hypertension, insulin resistance and endothelial dysfunction (SAKAGUCHI et al., 2018). In CKD patients calcium negative balance can

increase the risk of osteoporosis and fractures, but the positive balance can lead to an increased risk of vascular calcification and cardiovascular events (GALLANT and SPIEGEL, 2017). These findings corroborate with the clinical and medication use characteristics of the analyzed CKD patients – High blood pressure (93.55%); antihypertensives use (81.54%); diabetics (58.07%); antidiabetics use (40.00%); cardiovascular disease (54.84%); statins use (47.69%).

In CKD G5 pool HSQCed analysis, 35 metabolites were identified. However, out of the 35, 12 ^1H NMR chemical shifts were not determined. For these undetermined signals, 3 signals (ND 10, ND 11 e ND 12) in the aromatic region (6.00 – 8.00 ppm), 3 signals (ND7, ND 8 and ND 9) in anomeric region (4.00 – 6.00) and 6 signals (ND 1, ND 2, ND 3, ND 4, ND 5 and ND 6) in alpha carbon and aliphatic region (0.50 – 3.00 ppm) were identified. In fact, signals of various compounds were covered by the EDTA anticoagulant signals. The overlapping signals in these regions did not allow the identification of several metabolites in ^1H NMR spectroscopy. However, it was possible to detect and indirectly quantify non-overlapping compounds with the aid of HSQCed and ANOVA, respectively. For further studies, the use of samples without anticoagulant or heparin is suggested (EMWAS et al., 2013). On the other hand, the use of EDTA minimizes the frequency of metal affinity metabolite displacements, which can be seen in the spectra (ASIAGO et al., 2008).

We recognize that the present study has some limitations and that further work will be required. i) The overlap of several ^1H NMR signals made it impossible to identify and detect several analytes, we tried to solve this problem combining the similar ^1H NMR spectra and performed 2D ^1H - ^{13}C HSQC, which increase the coverage and allowed to identify more 20 metabolites than detected previously. However, we hope in further studies confirm by LC-MS/MS the ^{13}C NMR cross peaks which were detected but not properly assigned. ii) The molecular complexity of the plasma samples was an impediment to obtaining a large number of molecules. iii) The CKD patients comorbidities had a negative impact on the process of obtaining a plasma sample, as the high inflammatory and the association of several diseases encumber vascular access. iv) The baseline characteristics and drug therapy of patients make the metabolomic valuation more difficult. We propose that new samples extraction methods using others organic solvents and ultrafiltration devices that may help the better identification of the other metabolites. The use of other analytical platforms like gas chromatography, high performance liquid chromatography, mass spectrometry,

capillary electrophoresis, Raman spectroscopy and Fourier transform infrared may also complement the metabolic profile of CKD patients.

In summary, the 1D and 2D ^1H NMR spectroscopic analyzes enabled a better understanding of the metabolic behavior of CKD. PCA and PLS-DA statistical analysis allowed a classification of CKD patients based on metabolomics profile and not on a biomarker *per se*. ANOVA indirect analysis allowed to quantitatively evaluate the metabolites associated with non-overlapping chemical shifts. The PCA clustered CKD eGRF and control patients into three groups, showing that the change in CKD metabolic behavior is more evident in G5 than in the early stages. The PCA determination discriminated lactate, glucose, acetate and creatinine in control group. L-valine, L-alanine, glucose, creatinine, L-glutamine, lactate and ND3 were responsible for distinguish G1-G4 to the other groups. Moreover, calcium EDTA, sodium EDTA, creatinine, betaine/choline/TMAO, lactate, acetate and glucose separated G5 to the other patients of the study. The MetPA fingerprint analysis of CKD patients in CKD G5 pool evaluated several metabolic routes involved in CKD pathophysiology, mainly pathways related to L-tryptophan, L-phenylalanine, L-tyrosine, L-valine, L-isoleucine, L-alanine and L-glutamate. Furthermore, the indirect assessment of lactate, L-alanine, acetate, N-acetyl-L-aspartate, creatinine, betaine/choline/TMAO, calcium EDTA and magnesium EDTA levels demonstrated the possibility of evaluating simultaneously levels of these compounds by NMR spectroscopy. In this sense, future studies are necessary to better understand and validate the metabolic changes found with others well established CKD biomarkers.

5. CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

6. ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Rayana Pereira Maciel and Paulo Gregório for helping with patients samples collection and storage. We are also so grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) for the financial support in the funding of this research.

7. ARTICLE REFERENCES

- ASIAGO, V. M. et al. Use of EDTA to minimize ionic strength dependent frequency shifts in the ^1H NMR spectra of urine. **Metabolomics**, v. 4, n. 4, p. 328–336, 2008.
- BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 2692–2703, 2007.
- BEGER, R. D. et al., Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, n. 2, p. 154–166, 2010.
- BELLO, A. K. et al. Complications of chronic kidney disease: current state, knowledge gaps, and strategy for action. **Kidney International Supplements**, v. 7, n. 2, p. 122–129, 2017.
- BELLOMO, R. Bench-to-bedside review: Lactate and the kidney. **Critical Care**, v. 6, n. 4, p. 322–326, 2002.
- CEROSIMO, E.; MOLINA, P. E.; ABUMRAD, N. N. Renal lactate metabolism and gluconeogenesis during insulin-induced hypoglycemia. **Diabetes**, v. 47, n. 7, p. 1101–1106, 1998.
- CHEN, D-Q. et al. Identification of serum metabolites associating with chronic kidney disease progression and anti-fibrotic effect of 5-methoxytryptophan. **Nature communications**, v.10, n. 1476, p. 1–15, 2019.
- CHEN, H-H. et al. Renal Denervation Improves the Baroreflex and GABA System in Chronic Kidney Disease-induced Hypertension. **Scientific Reports**, v. 6, n. 38447, p. 1–13, 2016.
- CHEN, T. K.; KNICELY, D. H.; GRAMS, M. E. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management – A Review. Clinical Review & Education, **JAMA Review**, v. 322, n.13, p. 1294–1304, 2019.
- CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Protocols in Bioinformatics**, v. 68, n. 1, p. 1–128, 2019.
- DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, 2005.

- DURGAM, V. R.; VITELA, M.; MIFFLIN, S. W. Enhanced gamma-aminobutyric acid-B receptor agonist responses and mRNA within the nucleus of the solitary tract in hypertension. **Hypertension**, v. 33, n. 1, p. 530–536, 1999.
- EMWAS, A-H. M. et al. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. **Metabolomics**, v. 9, n. 5, p.1048–1072, 2013.
- EMWAS, A-H. et al. Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. **Metabolomics**, v.14, n. 31, p. 1–23, 2018.
- FERNANDEZ-PRADO, R. et al. Nutrients Turned into Toxins: Microbiota Modulation of Nutrient Properties in Chronic Kidney Disease. **Nutrients**, v. 9, n. 489, p. 1–20, 2017.
- FUJIWARA, M. et al. Metabolic responses during hemodialysis determined by quantitative ¹H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.111, p. 159–162, 2015.
- GALLANT, K. M. H.; SPIEGEL, D. M. Calcium Balance in Chronic Kidney Disease. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, p. 214–221, 2017.
- GARBER, A.; KARL, I. E.; KIPNIS, D. M. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. I. Glycolysis and amino acid release. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 3, p. 826–835, 1976.
- GARCIA-PEREZ, I. et al. Identifying unknown metabolites using NMR-based metabolic profiling techniques. **Nature Protocols**, v.15, p. 2538–2567, 2020.
- GLANTZ., S. A.; SLINKER, B. K.; NEILANDS, T. B. **Primer of Regression & Analysis of Variance**, 3. ed. McGraw-Hill Education/Medical, 2016.
- GORE, D. C.; WOLFE, R. R. Metabolic Response of Muscle to Alanine, Glutamine, and Valine Supplementation During Severe Illness. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 27, n. 5, p. 307–314, 2003.
- GRAMS, M. E.; SHAFI, T.; RHEE, E. P. Metabolomics Research in Chronic Kidney Disease. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 29, n. 6, p. 1588–1590, 2018.
- HAGHIKIA, A. et al. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients with Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 9, p. 2225–2235, 2018.

- HALLAN, S. I.; ORTH, S. R. The KDOQI 2002 classification of chronic kidney disease: for whom the bell tolls. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 9, p. 2832–2836, 2010.
- HANIFA, M. A. et al. Tissue, urine and blood metabolite signatures of chronic kidney disease in the 5/6 nephrectomy rat model. **Metabolomics**, v.15, n.112, p. 1–16, 2019.
- HATTORI, A. et al. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukemia. **Nature**; v.545, n. 7655, p. 1–29, 2017.
- HO, Y. et al. A Novel Protective Function of 5-Methoxytryptophan in Vascular Injury. **Nature Scientific Reports**, v. 6, n. 25374, p. 1–15 2016.
- HOCHER, B.; ADAMSKI, J. Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 5, p. 269–284, 2017.
- INKER, L. A. et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 63, n. 5, p. 713–735, 2014.
- IVOSEV, G.; BURTON, L.; BONNER, R. Dimensionality Reduction and Visualization in Principal Component Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 13, p. 4933–4944, 2008.
- JANEIRO, M. H. et. al. Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Disease: Potential Biomarker or New Therapeutic Target. **Nutrients**, v. 10, n. 1398, p. 1–22, 2018.
- JHA, V.; WANG, A. Y-M.; WANG, H. The impact of CKD identification in large countries: the burden of illness. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 27, n. 3, , p. 32–38, 2012.
- KAJBAF, F. et al. Metformin therapy and kidney disease: a review of guidelines and proposals for metformin withdrawal around the world. **Pharmacoepidemiology & Drug Safety**, v. 22, n. 10, p.1027–1035, 2013.
- KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) CKD WORK GROUP. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney International Supplements**, v. 3, p. 1–163, 2013.
- KIM, J-A. et al. ¹H NMR-Based Metabolite Profiling of Plasma in a Rat Model of Chronic Kidney Disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2014.
- KUAN, I. H. S., et al. The Association between Metformin Therapy and Lactic Acidosis. **Drug Safety**, v. 42, n. 12, p. 1449–1469, 2019.

KURANO, M; YATOMI, Y. Use of gas chromatography mass spectrometry to elucidate metabolites predicting the phenotypes of IgA nephropathy in hyper IgA mice. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. 1–14, 2019.

LEE, J. et al. Changes in serum metabolites with the stage of chronic kidney disease: Comparison of diabetes and non-diabetes. **Clinica Chimica Acta**, n. 459, p. 123–131, 2016.

LEONG, S. C.; SIRICH, T. L. Indoxyl Sulfate – Review of Toxicity and Therapeutic Strategies. **Toxins**, v. 8, n. 358, p. 1–13, 2016.

LEVEY, A.S. et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Annals of Internal Medicine**, v. 150, n. 9, p. 604–612, 2009.

MADIRAJU, A. K. et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. **Research Letter (Nature)**, n. 510, p. 542–546, 2014.

MCKAY, R. T. Suppresses Solvent Signal in Metabonomics NMR Spectroscopy: An Examination of the Pulse Sequence Components and Evolution. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 38A, n. 5, p. 197–220, 2011.

MEISTER, A.; TATE, S. S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annual Review of Biochemistry**, n. 45, p. 559–604, 1976.

MIKA, A. et al. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for the detection of metabolic disorders in patients with moderate kidney insufficiency. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 1–8, 2018.

MORI, K.; NAKAO, K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. **Kidney International**, v. 71, n. 10, p. 967–970, 2007.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 39, p. 1–266, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6. Ed. Nova York: W.H. Freeman and Company, 2013.

NICHOLSON, J. K. et al. 750 MHz ^1H and ^1H - ^{13}H NMR Spectroscopy of Human Blood Plasma. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 793–811, 1995.

PETROFF, O. A. C. Book Review: GABA and Glutamate in the Human Brain. **The Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 562–573, 2002.

PRICE, C. P.; FINNEY, H. Developments in the assessment of glomerular filtration rate. **Clinica Chimica Acta**, v. 297, n. 1–2, p. 55–66, 2000.

PSYCHOGIOS, N. et al. The Human Serum Metabolome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1–23, 2011.

QI, S. et al. A Pilot Metabolic Profiling Study in Serum of Patients with Chronic Kidney Disease Based on ¹H-NMR-Spectroscopy. **Clinical and Translational Science**, v. 5, n. 5, p. 379–385, 2012.

SAGGI, S. J. et al. Metabolic profiling of a chronic kidney disease cohort reveals metabolic phenotype more likely to benefit from a probiotic. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 12, n. 1, p. 43–54, 2017.

SAKAGUCHI, Y.; HAMANO, T.; ISAKA, Y. Magnesium and Progression of Chronic Kidney Disease: Benefits Beyond Cardiovascular Protection? **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 25, n. 3, p. 274–280, 2018.

SANTANA-FILHO, A. P. et al. NMR metabolic fingerprints of murine melanocyte and melanoma cell lines: application to biomarker discovery. **Scientific Reports**, v. 7, n. 42324, p. 1–9, 2017.

SHAH, V. O. et al. Plasma Metabolomic Profiles in Different Stages of CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, n. 3, p. 363–370, 2013.

STUMVOLL, M. et al. Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ subselectivity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 274, n. 5, p. 817–826, 1998.

SVED, A. F. et al. Vasopressin contributes to hypertension caused by nucleus tractus solitarius lesions. **Hypertension**, 7, n. 2, p. 262–267, 1985.

TITAN, S. M. et al. Metabolomics biomarkers and the risk of overall mortality and ESRD in CKD: Results from the Progridir Cohort. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–24, 2019.

URBSCHAT, A.; OBERMÜLLER, N.; HAFERKAMP, A. Biomarkers of kidney injury. **Biomarkers**, v. 16, n. 1 p. 22–30, 2011.

VELDE, M. V. D., et al., Do albuminuria and hs-CRP add to the International Diabetes Federation definition of the metabolic syndrome in predicting outcome? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 6, p. 2275–2283, 2012.

XIA, J.; WISHART, D. S. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. **Bioinformatics**, v. 26, n. 18, p. 2342–2344, 2010.

WALLIMANN, T., RIEK, U.; MÖDDEL. Intradialytic creatine supplementation: A scientific rationale for improving the health and quality of life of dialysis patients.

Medical Hypotheses, v. 99, p. 1–14, 2017.

WANG, Y., et al. Chronic kidney disease: Biomarker diagnosis to therapeutic targets.

Clinica Chimica Acta, v. 499, p. 54–63, 2019.

WATKINS, J.C.; EVANS, R. H. Excitatory amino acid transmitters. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 21, p. 165–204, 1981.

ZHANG, Z-H., et al. Removal of uremic retention products by hemodialysis is coupled with indiscriminate loss of vital metabolites. **Clinical Biochemistry**, v. 50, n. 18, p. 1078–1086, 2017.

ZHAO, Y-Y. Metabolomics in chronic kidney disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 422, p. 59–69, 2013.

8. CONCLUSÕES

- As análises espectroscópicas por RMN ^1H 1D e 2D possibilitaram um melhor entendimento a respeito do comportamento metabólico da DRC em seus estágios evolutivos e também do grupo controle.
- As avaliações estatísticas utilizando ACP e AMQP permitiram a classificação dos pacientes DRC baseada no perfil metabólico e não apenas em um biomarcador *per se*.
- As determinações quimiométricas por ACP permitiram distinguir metabolicamente os pacientes DRC do grupo controle.
- A avaliação quimiométrica por AMQP foi capaz de criar um modelo estatístico robusto, dentro das limitações da coorte analisada, capaz de classificar novos pacientes DRC e saudáveis de acordo com seus respectivos perfis metabólicos.
- A análise do *fingerprint* do pool de pacientes DRC do grupo 5, determinada por RMN ^1H 1D e 2D, permitiu avaliar as potenciais rotas metabólicas estatisticamente envolvidas na fisiopatologia da DRC. Desta forma, baseado nos metabólitos determinados, 13 rotas metabólicas foram relacionadas com a DRC. Assim, é possível inferir que esse achado metabólico poderá auxiliar pesquisas futuras na busca por um melhor entendimento da DRC.
- O uso da estatística univariada por ANOVA permitiu avaliar a influência das concentrações plasmáticas de diversos analitos que estão relacionados com a evolução da DRC. Assim, quando determinados indiretamente, pelas integrais dos espectros de RMN ^1H , os níveis destes compostos sofreram variações significativas nos diferentes estágios da DRC.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve o objetivo de entender melhor a fisiopatologia que envolve os pacientes com DRC. Vários estudos sobre a DRC foram realizados nos últimos anos e diversas técnicas analíticas foram utilizadas, porém estudos que envolvam todos os estágios dessa patologia são muito escassos. A avaliação metabólica da DRC em todos os seus estágios evolutivos foi o principal objetivo desta tese, o que pode apresentar uma perspectiva mais ampla a respeito dessa doença. Com os resultados experimentais conseguimos obter um perfil metabólico da coorte de pacientes DRC analisada e também um modelo estatístico capaz de caracterizar novos pacientes.

As comorbidades que os pacientes DRC apresentaram refletiram negativamente no processo de obtenção de amostras de plasma, pois a alta carga inflamatória e a associação de diversas doenças dificultam o acesso vascular, consequentemente maiores volumes de sangue periférico não puderam ser obtidos. Apesar das dificuldades de acesso venoso, o volume utilizado nas análises por HSQCed não foi impeditivo e permitiu a identificação de diversas moléculas de forma simultânea.

Durante o processo de análise das amostras tivemos que avaliar várias formas de preparo, sempre procurando a melhor alternativa para que a máxima eficiência de detecção do espectrômetro de RMN ^1H fosse alcançada. Devido a alta carga inflamatória dos pacientes, a complexidade molecular dos plasmas dos pacientes foi o maior limitante para a obtenção direta dos espectros de RMN ^1H . Para tanto, metodologias de preparo pré-analíticas como precipitação proteica com o uso de solventes orgânicos (acetonitrila e metanol), detecção direta (NaCl 0,9% deuterado) e filtração por meio de dispositivos comerciais (Amicon[®] 30 kDa) foram realizadas. Após diversas tentativas, a melhor alternativa obtida foi a precipitação com o metanol, o que permitiu uma melhor visualização dos espectros de RMN ^1H . É necessário pontuar que outras técnicas de extração podem ser utilizadas com o objetivo de detectar novas biomoléculas. Também a avaliação e o uso de outras técnicas espectroscópicas se fazem necessárias para determinar os analitos encontrados no presente trabalho.

Da perspectiva da aplicabilidade dos resultados obtidos por esta pesquisa, podemos avaliar que a determinação metabólica de diversos metabólitos envolvidos na DRC de forma simultânea e não isolada, como ocorre na atualidade, é

algo promissor e que deve ser avaliado e corroborado por novas pesquisas em outras coortes de DRC.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ADOSRAKU, R. K. et al. NMR lipid profiles of cells, tissues, and body fluids: proton NMR analysis of human erythrocyte lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 35, n. 11, p. 1925–1931, 1994.
- AKIN, D.; OZMEN, S.; YILMAZ, M. E. Hyaluronic Acid as a New Biomarker to Differentiate Acute Kidney Injury from Chronic Kidney Disease. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 11, n. 6, p. 409–413, 2017.
- ALCALDE, R.; KIRSZTAJN, G. M. Expenses of the Brazilian Public Healthcare System with chronic kidney disease. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 40, n. 2, p. 122–129, 2018.
- ASADIPOOYA, K. et al. Bone Quality in CKD Patients: Current Concepts and Future Directions – Part I. **Kidney Diseases**, v. 7, n. 5, p. 359–371, 2021.
- ASIAGO, V. M. et al. Use of EDTA to minimize ionic strength dependent frequency shifts in the ^1H NMR spectra of urine. **Metabolomics**, v. 4, n. 4, p. 328–336, 2008.
- AUNER, G. W. et al. Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 37, n. 4, p. 691 – 717, 2018.
- BECKER, B. et al. Renal insulin resistance syndrome, adiponectin and cardiovascular events in patients with kidney disease: the mild and moderate kidney disease study. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 16, n. 4. p. 1091–1098, 2005.
- BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocols**, v. 2. n. 1, p. 2692–2703, 2007.
- BEGER, R. D. et al., Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, n. 2, p. 154–166, 2010.
- BELLO, A. K. et al. Complications of chronic kidney disease: current state, knowledge gaps, and strategy for action. **Kidney International Supplements**, v. 7, n. 2, p. 122–129, 2017.
- BELLOMO, R. Bench-to-bedside review: Lactate and the kidney. **Critical Care**, v. 6, n. 4, p. 322–326, 2002.
- BIOLOGICAL MAGNETIC RESONANCE DATA BANK (BMRDB). Disponível em: <<https://bmrdb.io/>>. Acesso em: 02/01/2018.

- BODE-BÖGER, S. M. et al. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 4, p. 1128–1134, 2006.
- BOELAERT, J. et al. Metabolic profiling of human plasma and urine in chronic kidney disease by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry: A pilot study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 8, p. 2201–2211, 2017.
- BRO, S. et al. Increased expression of adhesion molecules in uremic atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 1495–1503, 2004.
- CARNEY, E. F. The Impact of chronic kidney disease on global health. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, p. 251, 2020.
- CARTER, C. E.; IX, J. H. Urinary Creatinine and Survival in CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, n. 12, p. 2028–2029, 2014
- CASES, A. et al. Increased plasma adrenomedullin levels in hemodialysis patients with sustained hypotension. *Dialysis transplantation*, v. 47, n. 2, p. 664–670, 2000.
- CEROSIMO, E.; MOLINA, P. E.; ABUMRAD, N. N. Renal lactate metabolism and gluconeogenesis during insulin-induced hypoglycemia. **Diabetes**, v. 47, n. 7, p. 1101–1106, 1998.
- CHAGOYEN, M.; PAZOS, F. Tools for the functional interpretation of metabolomic experiments. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 6, p. 737–744, 2012.
- CHASE, B. A New Generation of Raman Instrumentation. **Applied Spectroscopy**, v. 48, n. 7, p. 14A–19A, 1994.
- CHEN, D-Q. et al. Identification of serum metabolites associating with chronic kidney disease progression and anti-fibrotic effect of 5-methoxytryptophan. **Nature communications**, v.10, n. 1476, p. 1–15, 2019.
- CHEN, H-H. et al. Renal Denervation Improves the Baroreflex and GABA System in Chronic Kidney Disease-induced Hypertension. **Scientific Reports**, v. 6, n. 38447, p. 1–13, 2016.
- CHEN, T. K.; KNICELY, D. H.; GRAMS, M. E. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management – A Review. *Clinical Review & Education*, **JAMA Review**, v. 322, n.13, p. 1294–1304, 2019.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Protocols in Bioinformatics**, v. 68, n. 1, p. 1–128, 2019.

CUI, X. et al. Analysis and classification of kidney stones based on Raman spectroscopy. **Biomedical Optics Express**, v. 9, n.9, p. 4175–4183, 2018

D'APOLITO, M. et al. Urea-induced ROS cause endothelial dysfunction in chronic renal failure. **Atherosclerosis**, v. 239, n. 2, p. 393–400, 2015.

DRÜEKE, T. B. et al. Beta2-microglobulin and amyloidosis. **Nephrology dialysis transplantation**, v. 15, n. 1, p. 17–24, 2000.

DSA, J. et al. Association Between Serum Cystatin C and Creatinine in Chronic Kidney Disease Subjects Attending a Tertiary Health Care Centre. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.11, n. 4, p. BC09–BC12, 2017.

DUBIN, R. F.; RHEE, E. P. Proteomics and Metabolomics in Kidney Disease, including Insights into Etiology, Treatment, and Prevention. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v.15, n. 3, p. 404–411, 2020.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, 2005.

DURANTON, F. et al. The CKD plasma lipidome varies with disease severity and outcome. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 13, n. 1, p. 176–185, 2018.

DURGAM, V. R.; VITELA, M.; MIFFLIN, S. W. Enhanced gamma-aminobutyric acid-B receptor agonist responses and mRNA within the nucleus of the solitary tract in hypertension. **Hypertension**, v. 33, n. 1, p. 530–536, 1999.

EMWAS, A-H. M. et al. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. **Metabolomics**, v. 9, n. 5, p.1048–1072, 2013.

EMWAS, A-H. et al. Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. **Metabolomics**, v.14, n. 31, p. 1–23, 2018.

ENWAS, A-H. et al. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. **Metabolites**, v. 9, n. 123, p. 1–39, 2019.

European Uremic Toxins Work Group (EUTox). Disponível em: < <https://www.uremic-toxins.org/eutox-database/>>. Acesso em: 09/010/2021.

FERNANDEZ-PRADO, R. et al. Nutrients Turned into Toxins: Microbiota Modulation of Nutrient Properties in Chronic Kidney Disease. **Nutrients**, v. 9, n. 489, p. 1–20, 2017.

FUJIWARA, M. et al. Metabolic responses during hemodialysis determined by quantitative ^1H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.111, p. 159–162, 2015.

GAGNEBIN, Y. et al. Exploring blood alterations in chronic kidney disease and haemodialysis using metabolomics. *Scientific Reports*, v. 10, n. 19502, p. 1–9, 2020.

GALLANT, K. M. H.; SPIEGEL, D. M. Calcium Balance in Chronic Kidney Disease. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, p. 214–221, 2017.

GARBER, A.; KARL, I. E.; KIPNIS, D. M. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. I. Glycolysis and amino acid release. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 3, p. 826–835, 1976.

GARCIA-PEREZ, I. et al. Identifying unknown metabolites using NMR-based metabolic profiling techniques. **Nature Protocols**, v.15, p. 2538–2567, 2020.

GLANTZ., S. A.; SLINKER, B. K.; NEILANDS, T. B. **Primer of Regression & Analysis of Variance**, 3. ed. McGraw-Hill Education/Medical, 2016.

GLASSOCK, R. J. Uremic toxins: what are they? An integrated overview of pathobiology and classification. **Journal of Renal Nutrition**, v.18, n.1, p. 2–6, 2008.

GOODACRE, R. et al. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **Trends in Biotechnology**. v. 22, n. 5, p. 245–252, 2004.

GORE, D. C.; WOLFE, R. R. Metabolic Response of Muscle to Alanine, Glutamine, and Valine Supplementation During Severe Illness. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 27, n. 5, p. 307–314, 2003.

GRABOWSKA-POLANOWSKA, B. et al. Detection of potential CKD markers in breath using GC/MS coupled with thermal desorption method. **Journal of Chromatography A**, v. 1301, n. 2, p. 179–189, 2013.

GRAMS, M. E.; SHAFI, T.; RHEE, E. P. Metabolomics Research in Chronic Kidney Disease. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 29, n. 6, p. 1588–1590, 2018.

GUPTA, N. et al. Targeted Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine N-Oxide Production Reduces Renal Tubulointerstitial Fibrosis and Functional Impairment in a

Murine Model of Chronic Kidney Disease, Arteriosclerosis. **Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 40, n. 5, p. 1239–1255, 2020.

HAGHIKIA, A. et al. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients with Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 9, p. 2225–2235, 2018.

HALLAN, S. I.; ORTH, S. R. The KDOQI 2002 classification of chronic kidney disease: for whom the bell tolls. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 9, p. 2832–2836, 2010.

HANIFA, M. A. et al. Tissue, urine and blood metabolite signatures of chronic kidney disease in the 5/6 nephrectomy rat model. **Metabolomics**, v.15, n.112, p. 1–16, 2019.

HARRISON, T. G., et al. Association of NT-proBNP and BNP With Future Clinical Outcomes in Patients With ESKD: A Systematic Review and Meta-analysis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 76, n. 2, p. P233–P247, 2020.

HATTORI, A. et al. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukemia. **Nature**; v.545, n. 7655, p. 1–29, 2017.

HO, Y. et al. A Novel Protective Function of 5-Methoxytryptophan in Vascular Injury. **Nature Scientific Reports**, v. 6, n. 25374, p. 1–15 2016.

HOCHER, B.; ADAMSKI, J. Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 5, p. 269–284, 2017.

HUNG, C-Y. et al. Association of leptin with hemodialysis-related muscle cramps: a cross-sectional study. **Blood Purification**, v. 27, n. 2, p. 159–164, 2009.

INKER, L. A. et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 63, n. 5, p. 713–735, 2014.

INTERNATIONAL SOCIETY OF NEPHROLOGY (ISN). **2019 Global Kidney Health Atlas**. Disponível em: <<https://www.theisn.org/initiatives/global-kidney-health-atlas/>>. Acesso em 03/10/2021.

IVOSEV, G.; BURTON, L.; BONNER, R. Dimensionality Reduction and Visualization in Principal Component Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 13, p. 4933–4944, 2008.

JANEIRO, M. H. et. al. Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Disease: Potential Biomarker or New Therapeutic Target. **Nutrients**, v. 10, n. 1398, p. 1–22, 2018.

- JANKOWSKI, J. et al. Increased plasma phenylacetic acid in patients with end-stage renal failure inhibits iNOS expression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 2, p. 256–264, 2003.
- JEYARAJAH, E. J.; CROMWELL, W. C.; OTVOS, J. D. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 26, n. 4, p. 847–870, 2006.
- JHA, V.; WANG, A. Y-M.; WANG, H. The impact of CKD identification in large countries: the burden of illness. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 27, n. 3, p. 32–38, 2012.
- JHA, V. et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 260–272, 2013.
- KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção Inversa e Gradiente de Campo na Determinação Estrutural de Compostos Orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231–236, 2000.
- KAJBAF, F. et al. Metformin therapy and kidney disease: a review of guidelines and proposals for metformin withdrawal around the world. **Pharmacoepidemiology & Drug Safety**, v. 22, n. 10, p.1027–1035, 2013.
- KAUL, A. et al. Hyaluronan, a double-edged sword in kidney diseases. **Pediatric Nephrology**, Review, p. 1–10, 2021.
- KEUN, H. C. **NMR-based Metabolomics**. The Royal Society of Chemistry, 2018.
- KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) CKD WORK GROUP. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney International Supplements**, v. 3, p. 1–163, 2013.
- KIM, H. J. et al. Effects of blood urea nitrogen independent of the estimated glomerular filtration rate on the development of anemia in non-dialysis chronic kidney disease: The results of the KNOW-CKD study. **PLoS ONE**, v. 16, n. 9, p. 1 – 21, 2021.
- KIM, J-A. et al. ¹H NMR-Based Metabolite Profiling of Plasma in a Rat Model of Chronic Kidney Disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2014.
- KOHAN, E. D. Endothelin, Hypertension, and Chronic Kidney Disease: New insights. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 19, n. 2, p. 134–139, 2010.
- KUAN, I. H. S., et al. The Association between Metformin Therapy and Lactic Acidosis. **Drug Safety**, v. 42, n. 12, p. 1449–1469, 2019.

KURANO, M; YATOMI, Y. Use of gas chromatography mass spectrometry to elucidate metabolites predicting the phenotypes of IgA nephropathy in hyper IgA mice. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. 1–14, 2019.

LINDON, J. C.; TRANTER, G. E.; KOPPENNAL, D. W. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. 3. ed. Academic Press, 2017.

LEE, J. et al. Changes in serum metabolites with the stage of chronic kidney disease: Comparison of diabetes and non-diabetes. **Clinica Chimica Acta**, n. 459, p. 123–131, 2016.

LEONG, S. C.; SIRICH, T. L. Indoxyl Sulfate – Review of Toxicity and Therapeutic Strategies. **Toxins**, v. 8, n. 358, p. 1–13, 2016.

LEVEY, A.S. et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Annals of Internal Medicine**, v. 150, n. 9, p. 604–612, 2009.

LIABEU, S. et al. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. **Nephrology dialysis transplantation**, v. 25, n. 4, p. 1183–1191, 2010.

LINDON, J. C. et al. Metabonomics: Metabolic Processes Studied by NMR Spectroscopy of Biofluids. **Concepts in Magnetic Resonance**, v. 12, n. 5, p. 289–320, 2000.

LISOWSKA-MYJAK, B. Uremic Toxins and Their Effects on Multiple Organ Systems. **Nephron Clinical Practice**, v. 128, n. 3–4, p., 303–311, 2014.

MADIRAJU, A. K. et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. **Research Letter (Nature)**, n. 510, p. 542–546, 2014.

MAGALHÃES, P.; MISCHAK, H.; ZÜRBIG, P. Urinary proteomics using capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for diagnosis and prognosis in kidney diseases. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 25, n. 6, p. 494–501, 2016.

MÄKINEN, V-P. et al. Diagnosing diabetic nephropathy by ¹H NMR metabonomics of serum. **Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine**, n. 19, v. 6, p. 281–296, 2006.

MARINHO, A. W. G. B. et al. Prevalência de doença renal crônica em adultos no Brasil: revisão sistemática da literatura. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 379–388, 2017.

MCGREGOR, D. O. et al. Dimethylglycine accumulates in uremia and predicts elevated plasma homocysteine concentrations. **Clinical nephrology, epidemiology and clinical trials**, v. 59, n. 6, p. 2267–2272, 2001.

MCKAY, R. T. Suppresses Solvent Signal in Metabonomics NMR Spectroscopy: An Examination of the Pulse Sequence Components and Evolution. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 38A, n. 5, p. 197–220, 2011.

MEISTER, A.; TATE, S. S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annual Review of Biochemistry**, n. 45, p. 559–604, 1976.

MENEZES, L. R. A. **Aplicação da RMN no Estudo das Interações entre Toxinas Urêmicas e a Albumina Sérica Humana**. p. 1–87. Tese (doutorado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

MENON, V. et al. Adiponectin and Mortality in Patients with Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 17, n. 9. p. 2599–2606, 2006.

MIKA, A. et al. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for the detection of metabolic disorders in patients with moderate kidney insufficiency. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 1–8, 2018.

MISCHAK, H. et al. Urinary Proteomics Based on Capillary Electrophoresis-Coupled Mass Spectrometry in Kidney Disease: Discovery and Validation of Biomarkers, and Clinical Application. *Advances in Chronic Kidney Disease*, v. 17, n. 6, p. 493–506, 2010.

MITCHELL, S. C.; ZHANG, A. Q. Methylamine in human urine. **Clinica Chimica Acta**, v. 312, n. 1–2, p. 107–114, 2001.

MORI, K.; NAKAO, K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. **Kidney International**, v. 71, n. 10, p. 967–970, 2007.

NASEER, K.; ALI, S.; QAZI, J. ATR-FTIR spectroscopy as the future of diagnostics: a systematic review of the approach using biofluids. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 56, n. 2, p. 85–97, 2020.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 39, p. 1–266, 2002. Disponível em:

<https://www.kidney.org/sites/default/files/docs/ckd_evaluation_classification_stratification.pdf>. Acesso em: 16 set. 2018.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. Global Facts: About Kidney Disease. Disponível em: <https://www.kidney.org/kidneydisease/global-facts-about-kidney-disease#_ENREF_1>. Acesso em: 23 out. 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6. Ed. Nova York: W.H. Freeman and Company, 2013.

NICHOLSON, J. K. et al. 750 MHz ^1H and ^1H - ^{13}H NMR Spectroscopy of Human Blood Plasma. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 793–811, 1995.

OKUNO, S. et al. Serum beta2-microglobulin level is a significant predictor of mortality in maintenance haemodialysis patients. **Nephrology dialysis transplantation**, v. 24, n. 2, p. 571–577, 2009.

OTTONELLO, L. et al. Leptin as a uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 9, p. 2366–2372, 2004.

OVERHAUSER, A. W. Polarization of Nuclei in Metals. **Physical Review**, v. 92, n. 2, p. 411-415, 1953.

PANTEGHINI, M. et al. The importance of metrological traceability on the validity of creatinine measurement as an index of renal function: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 44, n. 10, p. 1287–92, 2006.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**, 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PERALTA, C. A. et al. Detection of Chronic Kidney Disease With Creatinine, Cystatin C, and Urine Albumin-to-Creatinine Ratio and Association with Progression to End-Stage Renal Disease and Mortality. **JAMA**, v. 305, n. 15, p. 1545–1552, 2011.

PETROFF, O. A. C. Book Review: GABA and Glutamate in the Human Brain. **The Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 562–573, 2002.

POSTIGO, M. P. **Uso de Ressonância Magnética Nuclear na análise metabólica de biofluidos de animais tratados com Ivermectina**. p. 1 – 133. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PRICE, C. P.; FINNEY, H. Developments in the assessment of glomerular filtration rate. **Clinica Chimica Acta**, v. 297, n. 1–2, p. 55–66, 2000.

- PSYCHOGIOS, N. et al. The Human Serum Metabolome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1–23, 2011.
- PUIG-CASTELLVÍ, F. et al. Comparative analysis of ^1H NMR and ^1H – ^{13}C HSQC NMR metabolomics to understand the effects of medium composition in yeast growth. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 21, p. 12422–12430, 2018.
- QI, S. et al. A Pilot Metabolic Profiling Study in Serum of Patients with Chronic Kidney Disease Based on ^1H -NMR-Spectroscopy. **Clinical and Translational Science**, v. 5, n. 5, p. 379–385, 2012.
- RAINA, R. et al. The Role of Endothelin and Endothelin Antagonists in Chronic Kidney Disease. **Kidney Diseases**, v. 6, n. 1, p. 22–34, 2020.
- REYNOLDS, W. F.; ENRÍQUEZ, R. G. Choosing the Best Pulse Sequences, Acquisition Parameters, Postacquisition Processing Strategies, and Probes for Natural Product Structure Elucidation by NMR Spectroscopy. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 221–244, 2002.
- RHEE, E. P. et al. A Combined Epidemiologic and Metabolomic Approach Improves CKD Prediction. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, n. 8, p. 1330–1338, 2013.
- RHODES, C. J. Magnetic resonance spectroscopy. **Science Progress**, v. 100, n. 3, p. 241–292, 2017.
- SAGGI, S. J. et al. Metabolic profiling of a chronic kidney disease cohort reveals metabolic phenotype more likely to benefit from a probiotic. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 12, n. 1, p. 43–54, 2017.
- SAKAGUCHI, Y.; HAMANO, T.; ISAKA, Y. Magnesium and Progression of Chronic Kidney Disease: Benefits Beyond Cardiovascular Protection? **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 25, n. 3, p. 274–280, 2018.
- SANTANA-FILHO, A. P. et al. NMR metabolic fingerprints of murine melanocyte and melanoma cell lines: application to biomarker discovery. **Scientific Reports**, v. 7, n. 42324, p. 1–9, 2017.
- SCHMIDT, S. et al. The uraemic toxin phenylacetic acid impairs macrophage function. **Nephrology dialysis transplantation**, v. 23, n. 11, p. 3485–3493, 2008.
- SHAH, V. O. et al. Plasma Metabolomic Profiles in Different Stages of CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, n. 3, p. 363–370, 2013.
- SHEMESH, et al. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. **Kidney International**, v. 28, n. 5, p. 830–838, 1985.

- SILVA, R. A. et al. ^1H NMR-based metabolite profiling for biomarker identification. **Clinica Chimica Acta**, v. 502, p. 269–279, 2020.
- SMITH, B. C. **Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy**. second edition, CRC Press, 2011.
- STUMVOLL, M. et al. Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ subselectivity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v.274, n. 5, p. 817–826, 1998.
- SVED, A. F. et al. Vasopressin contributes to hypertension caused by nucleus tractus solitarius lesions. **Hypertension**, 7, n. 2, p. 262–267, 1985.
- SZAKÁCS, Z.; SÁNTA, Z. The Human Aspects of Scientific Thinking in NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry. **Anthropic Awareness**, Chapter 7 – NMR Methodological Overview, p. 257–289 2015.
- SUN, C-Y.; CHANG, S-C.; WU, M-S. Uremic toxins induce kidney fibrosis by activating intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system associated epithelial-to-mesenchymal transition. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2012.
- TAGLIERI, N.; KOENING, T.; KASKI, J. C. Cystatin C and Cardiovascular Risk. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1932–1943, 2009.
- TAGORE, R. et al. Natriuretic Peptides in Chronic Kidney Disease. **Clinical Journal of the American Society of nephrology**, v. 3, n. 6, p. 1644–1651, 2008.
- TAHERKHANI, A. et al. Metabolomic Analysis of Membranous Glomerulonephritis: Identification of a Diagnostic Panel and Pathogenic Pathways. **Archives of Medical Research**, v. 50, n. 4, p.159–169, 2019.
- THE HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). Disponível em: <https://hmdb.ca/>. Acesso em 15/03/2018.
- TITAN, S. M. et al. Metabolomics biomarkers and the risk of overall mortality and ESRD in CKD: Results from the ProgreDir Cohort. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–24, 2019.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Manual de Normalização de Documentos Científicos de acordo com as normas da ABNT**. Curitiba: Editora UFPR, 2015.
- URBSCHAT, A.; OBERMÜLLER, N.; HAFERKAMP, A. Biomarkers of kidney injury. **Biomarkers**, v. 16, n. 1 p. 22–30, 2011.
- VANHOLDER, R., et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney International**, v. 63, n.5, p.1934–43, 2003.
- VANHOLDER R. et al. New Methods and Technologies for Measuring Uremic Toxins

and Quantifying Dialysis Adequacy. **Seminars in Dialysis**, v. 28, n. 2, p. 114–124, 2015.

VELDE, M. V. D., et al., Do albuminuria and hs-CRP add to the International Diabetes Federation definition of the metabolic syndrome in predicting outcome? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 6, p. 2275–2283, 2012.

VIGNOLI, A. et al. High-Throughput Metabolomics by ¹D NMR. **Metabolomics**, v. 58, n. 4, p. 968–994, 2019.

WALLIMANN, T., RIEK, U.; MÖDDEL. Intradialytic creatine supplementation: A scientific rationale for improving the health and quality of life of dialysis patients. **Medical Hypotheses**, v. 99, p. 1–14, 2017.

WANG, Y., et al. Chronic kidney disease: Biomarker diagnosis to therapeutic targets. **Clinica Chimica Acta**, v. 499, p. 54–63, 2019.

WATKINS, J.C.; EVANS, R. H. Excitatory amino acid transmitters. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 21, p. 165–204, 1981.

WISHART, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 228–237, 2008.

WRIGHT, M. et al. Cholecystokinin and leptin: their influence upon the eating behaviour and nutrient intake of dialysis patients. **Nephrology dialysis transplantation**, v. 319, n. 1, p. 133–140, 2004.

WU, I-W. et al. p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. **Nephrology dialysis transplantation**, v. 26, n. 3, p. 938–947, 2011.

XIA, J.; WISHART, D. S. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. **Bioinformatics**, v. 26, n. 18, p. 2342–2344, 2010.

YOSHIHARA, F. et al. Adrenomedullin reflects cardiac dysfunction, excessive blood volume, and inflammation in hemodialysis patients. **Dialysis transplantation**, v. 68, n. 3, p. 1355–1363, 2005.

YUAN, Y., et al., Exploratory Study on Screening Chronic Renal Failure Based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy and a Support Vector Machine Algorithm. **Journal of Spectroscopy**, v. 2020, p. 1–7, 2020.

ZHAO, Y–Y. Metabolomics in chronic kidney disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 422, p. 59–69, 2013.

ZHANG, Z-H., et al. Removal of uremic retention products by hemodialysis is coupled with indiscriminate loss of vital metabolites. **Clinical Biochemistry**, v. 50, n. 18, p. 1078–1086, 2017.

ZHENG, G.; PRICE, W. S. Solvent signal suppression in NMR. v. 56, n. 3, p. 267–288, 2010.

ZOCCALI, C. et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. **The lancet**, v. 358, n. 9299, p. 2113–2117, 2001.

ZOCCALI, C. et al. Prospective Study of Neuropeptide Y as na Adverse Cardiovascular Risk Factor in End-Stage Renal Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 10, p. 2611–2617, 2003.

ZONG, M. et al. Comparison of Surface-Enhanced Raman Scattering Properties of Serum and Urine for the Detection of Chronic Kidney Disease in Patients. **Applied Spectroscopy**, v. 75, n. 4, p. 412–421, 2021.

11. MATERIAL SUPLEMENTAR – TESE

Tabela 1. Correlação entre toxinas urêmicas e alterações da função renal.

Toxina urêmica	Associação patológica	Referências
	Pode ser utilizado como biomarcador diferencial entre a lesão renal aguda e a DRC.	AKIN; OZMEN; YILMAZ, 2017
Ácido hialurônico	Atua sobre a patogênese das doenças renais por meio da fibrose e também como mediador inflamatório. Por outro lado, pode exercer efeito anti-inflamatório e antifibrótico.	KAUL et al., 2021
Adiponectina	Redução sugestiva de risco cardiovascular em pacientes com insuficiência renal moderada e leve.	BECKER et al., 2005
	Aumento nas concentrações plasmáticas está associado com aumento da mortalidade em pacientes G3 e G4.	MENON et al., 2006
Adrenomedulina	Possível envolvimento com a fisiopatologia da hipotensão crônica em pacientes hemodialíticos.	CASES et al., 2000
	Concentração plasmática aumentada é preditor de morbidade e mortalidade em pacientes em hemodiálise com doença cardiovascular.	YOSHIHARA, et al., 2005
cistatina C	A cistatina C identifica pacientes portadores de DRC com maior risco de complicações.	PERALTA, et al., 2011
	Aumento nas concentrações está associado ao maior risco de desenvolvimento de DCV e DRC.	TAGLIERI; KOENING; KASKI, 2009.
Colecistoquinina	Concentração plasmática aumentada parece influenciar percepção da saciedade em pacientes em diálise peritoneal, contribuindo assim para desnutrição.	WRIGHT, et al., 2004
creatinina	Sua avaliação concomitantemente com níveis de cistatina C e relação albumina-creatinina urinária melhora a acurácia preditiva para mortalidade e doença renal em estágio terminal.	PERALTA, et al., 2011
	Associação entre a creatinina urinária e níveis de sobrevivência na DRC. Quanto maior a sua concentração, melhor o prognóstico do paciente.	CARTER; IX, 2014
Dimetilarginina assimétrica	Aumento nas concentrações é um preditor independente de mortalidade geral e desfecho cardiovascular na insuficiência renal crônica.	ZOCCALI, et al., 2001
Dimetilglicina	Concentração elevada é preditor independente para hiperhomocisteinemia na falência renal crônica.	MCGREGOR, D. O. et al., 2001

Peptídeo natriurético atrial	Pode ser utilizado como biomarcador de escolha para disfunção miocárdica em pacientes com DRC.	TAGORE, et al., 2008
	Aumento dos níveis referenciais em pacientes portadores de DRET está associado ao risco elevado de mortalidade por DCV.	HARRISON, et al., 2020
Endotelina	Independente da doença subjacente, o aumento plasmático da endotelina foi encontrado em diversas doenças associadas à DRC.	RAINA, et al., 2020
	Produção aumentada de endotelina estimula vasoconstrição, inflamação, fibrose. Desta forma, promovendo a hipertensão, aterosclerose e DRC.	KOHAN, 2010
Indoxil sulfato total e livre	Concentrações elevadas promovem a ativação da via renal RAAS/TGF- β que possui importante papel patológico na lesão renal crônica	SUN; CHANG; WU, 2012
	Seus níveis séricos podem ajudar a prever o risco de progressão renal nos diferentes estágios da DRC.	WU, et al., 2011
Leptina	Níveis sérios diminuídos são preditores de mortalidade em pacientes em G5.	SCHOLZE, et al., 2007
	Concentrações reduzidas parecem influenciar o estabelecimento de infecções na doença renal em estágio terminal.	OTTONELLO, et al., 2004
	Concentrações altas estão correlacionadas a cólicas associadas à hemodiálise.	HUNG, et al., 2009
Metilamina	Pode desempenhar papel importante nos distúrbios do sistema nervoso central observados na doença renal.	MITCHELL; ZHANG, 2001
Neuropeptídeo Y	Aumento na concentração plasmática pode prever complicações cardiovasculares presentes na doença renal em estágio terminal.	ZOCCALI, et al., 2003
p-cresil sulfato total e livre	Preditor de mortalidade em pacientes em diferentes estágios da doença renal crônica	LIABEUF, et al., 2010
	Pode ajudar a prever o risco de progressão renal em pacientes com diferentes estágios de DRC.	WU, et al., 2011
Ácido fenilacético	Acúmulo pode contribuir para o aumento da aterosclerose e morbidade cardiovascular em pacientes com insuficiência renal em estágio terminal.	JANKOWSKI, et al., 2003
	Pode agravar a imunodeficiência de pacientes com doença em estágio terminal.	SCHMIDT, et al., 2008
Dimetilarginina simétrica	Molécula útil para detectar pacientes em estágios iniciais da doença renal crônica e também determinar risco de desenvolver doença cardiovascular.	BODE-BÖGER, et al., 2006

	Pode avaliar a progressão da doença renal e contribui para o risco de mortalidade em pacientes DRC.	JANEIRO, et al., 2018
N-óxido-trimetilamina (TMAO)	Inibição de microbiota responsável pela produção de TMAO pode reduzir alterações na estrutura e função renais na DRC.	GUPTA, et al., 2020
	Aumento nas concentrações de TMAO nos pacientes DRC pode sugerir aumento no risco de eventos cardiovasculares.	JANEIRO et al., 2018; HAGHIKIA et al., 2018
Ureia	Causa de disfunção endotelial aórtica e ativação de vias pró-aterogênicas.	D'APOLITO, et al., 2015
	O aumento dos níveis de ureia, derivados de dieta proteica, em pacientes DRC em níveis não dialíticos está associado com anemia, independente da TFGe.	KIM, et al., 2021
β-2-Microglobulina	Aumento na concentração é característico de falência renal crônica.	DRÜEKE, et al., 2000
	Preditor significativo de mortalidade em pacientes em hemodiálise.	OKUNO, et al., 2009

12. ARTICLE SUPPLEMENTAL DATA

Table 2. Baseline characteristics of the CKD study population.

CKD stages		Clinical characterization								
Creatinine eGFR* mL/min/1.73m ² (n =67)	Mean age	Gender, % male	Race, % caucasians	Smokers%	Diabetics%	Alcoholics%	Dyslipidemia%	High blood pressure%	Cardiovascular disease%	
Stage 1	>90	48.50	42.86	83.33	28.57	28.57	14.29	14.29	28.47	0.00
Stage 2	67.87	62.18	63.64	81.82	62.50	50.00	25.00	75.00	100.00	62.5
Stage 3a	48.26	70.33	40.00	100.00	40.00	50.00	10.00	24.00	100.00	30.00
Stage 3b	36.88	65.71	70.00	100.00	33.33	20.00	13.33	32.00	100.00	40.00
Stage 4	22.38	63.19	66.67	81.25	52.63	63.16	21.05	57.89	89.47	52.63
Stage 5	11.33	60.50	50.00	41.67	33.33	50.00	33.33	58.33	100.00	58.33
Albuminuria mg/g (n =23)										
Stage A1	11.39	64.80	100.00	100.00	60.00	58.33	33.33	100.00	100.00	50.00
Stage A2	110.40	64.70	66.67	80.00	66.67	100.00	33.33	66.67	100.00	33.33
Stage A3	1619.98	59.30	41.67	50.00	58.33	58.33	25.00	66.67	91.67	58.33

*Based on MDRD equation.

Table 2. Baseline characteristics of the CKD study population (continuation).

CKD stages		Medication use					
Stage	Creatinine eGFR* mL/min/1.73m ² (n =67)	antihypertensives%	anticoagulants%	diuretics%	antidiabetics%	statins%	phosphate binders%
Stage 1	>90	42.86	50.00	0.00	28.57	0.00	0.00
Stage 2	67.87	87.50	47.37	43.75	50.00	68.75	0.00
Stage 3a	48.26	90.00	40.00	50.00	50.00	50.00	0.00
Stage 3b	36.88	100.00	40.00	66.67	20.00	46.67	0.00
Stage 4	22.38	100.00	47.37	57.89	47.37	52.63	0.00
Stage 5	11.33	100.00	50.0	83.33	41.67	41.67	41.67
Albuminuria mg/g (n =23)							
Stage A1	11.39	80.00	80.00	40.00	40.00	80.00	0.00
Stage A2	110.40	83.33	83.33	83.33	100.00	66.67	0.00
Stage A3	1619.98	100.00	50.00	75.00	50.00	66.67	16.67

*Based on MDRD equation.

Table 3. Biochemical characteristics of the study population.

CKD stages		Analyzed Parameters								
Stage	Creatinine eGFR* mL/min/1.73m ² (n =67)	Creatinine (mg/dL)	Uric acid (mg/dL)	Urea (mg/dL)	Phosphorus (mg/dL)	Albumin (g/dL)	Calcium (mg/dL)	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Glucose (mg/dL)
Stage 1	>90	0.77	5.56	30.43	4.11	4.44	9.96	142.00	4.96	134.75
Stage 2	67.87	1.10	6.34	47.56	4.10	4.50	9.54	141.13	5.03	137.74
Stage 3a	48.26	1.35	7.13	55.00	4.07	3.93	8.29	140.17	5.15	99.33
Stage 3b	36.88	1.76	6.97	68.07	4.06	4.28	7.40	141.57	4.84	89.25
Stage 4	22.38	2.79	8.22	98.74	4.80	4.10	8.99	140.11	5.01	134.94
Stage 5	11.33	5.18	6.98	138.25	5.26	3.89	7.98	137.83	5.08	100.75
Albuminuria mg/g (n =23)										
Stage A1	11.39	1.41	6.20	49.60	4.02	4.62	10.02	138.80	5.12	115.26
Stage A2	110.40	2.78	7.00	105.17	4.37	4.25	8.55	140.83	5.32	116.00
Stage A3	1619.98	3.29	6.73	107.00	4.75	3.97	8.34	139.42	4.91	147.58

*Based on MDRD equation.

Table 3. Biochemical characteristics of the study population (continuation).

CKD stages		Analyzed Parameters							
Creatinine eGFR* mL/min/1.73m ² (n =67)	HB (g/dL)	HT (fL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL cholesterol (mg/dL)	LDL cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Glycated hemoglobin (%)	hs-CRP (mg/L)	
Stage 1	>90	14.31	42.31	167.00	42.33	108.67	111.33	11.78	1.41
Stage 2	67.87	14.41	42.77	175.11	40.11	93.29	168.44	7.47	6.68
Stage 3a	48.26	13.05	39.40	190.00	37.40	114.00	191.60	7.51	4.25
Stage 3b	36.88	13.83	41.38	193.18	48.73	118.91	126.73	5.45	7.02
Stage 4	22.38	12.38	37.77	162.83	38.50	89.67	201.33	8.16	5.13
Stage 5	11.33	10.58	32.58	168.90	43.70	103.48	145.40	7.01	10,94
Albuminuria mg/g (n =23)									
Stage A1	11.39	15.90	47.26	166.50	36.00	88.00	209.25	6.67	6.36
Stage A2	110.40	12.27	36.97	159.60	43.80	85.40	124.40	7.57	5.62
Stage A3	1619.98	12.02	37.14	161.80	40.40	89.38	159.90	8.41	3.80

*Based on MDRD equation.

Legend: HB = Hemoglobin; HT = Hematocrit; HDL = high-density lipoprotein; LDL = low-density lipoprotein; hs-CRP = High-sensitivity C-reactive protein.

Table 4. 1D and 2D NMR assignments from the control group, G1, G3b and G5 pool plasma samples.

Metabolite	2D phase assignment	$\delta^1\text{H}$	Multiplicity (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
2-Hydroxy-3- methylbutyrate	CH ₃	0.79	<i>d</i>	18.2
	CH ₃	0.84	<i>d</i>	16.5
	CH ₃	0.97	<i>d</i>	21.3
	CH	2.03	<i>m</i>	34.2
	CH	3.84	<i>d</i>	79.9
Lipids	CH ₃	0.88	<i>m</i>	23.9
	CH ₂	1.23	<i>m</i>	32.6
Ketoleucine	CH ₃	0.95	<i>d</i>	24.8
	CH	2.08	<i>m</i>	25.3
	CH ₂	2.65	<i>d</i>	49.1
L-Isoleucine	CH ₃	0.93	<i>t</i>	13.9
	CH ₃	0.99	<i>d</i>	17.3
	CH ₂	1.46	<i>m</i>	27.1
	CH	1.97	<i>m</i>	38.6
	CH	3.66	<i>d</i>	62.5
L-Valine	CH ₃	0.98	<i>d</i>	19.5
	CH ₃	1.03	<i>d</i>	21.9
	CH	2.26	<i>m</i>	31.9
	CH	3.60	<i>d</i>	63.3
3-Hydroxybutyrate	CH ₃	1.21	<i>d</i>	21.7
	CH ₂	2.28	<i>dd</i>	49.1
	CH ₂	2.41	<i>dd</i>	49.1
	CH	4.17	<i>m</i>	68.5
Lactate	CH ₃	1.32	<i>d</i>	22.8
	CH	4.11	<i>q</i>	71.2
ND 1	(CH ₂ or CH/CH ₃)	1.35	<i>s</i>	ND
L-Lysine	CH ₂	1.43	<i>m</i>	24.1
	CH ₂	1.71	<i>m</i>	29.1
	CH ₂	1.89	<i>m</i>	32.6
	CH ₂	3.01	<i>t</i>	42.1
	CH	3.74	<i>t</i>	58.1
L-Alanine	CH ₃	1.46	<i>d</i>	19.8

	CH	3.77	<i>q</i>	53.5
Adipic acid	CH ₂	1.53	<i>m</i>	28.1
	CH ₂	2.18	<i>m</i>	40.4
	CH ₂	1.67	<i>m</i>	27.7
L-Arginine	CH ₂	1.91	<i>m</i>	30.6
	CH ₂	3.23	<i>t</i>	43.9
	CH	3.76	<i>t</i>	58.1
	CH ₂	1.69	<i>m</i>	29.3
ND 2 (Overlap)	CH ₂	1.69	<i>m</i>	29.3
Acetate	CH ₃	1.92	<i>s</i>	26.1
L-Proline	CH ₂	2.01	<i>m</i>	30.1
	CH ₂	2.34	<i>m</i>	31.7
	CH ₂	3.32	<i>dt</i>	48.9
	CH ₂	3.40	<i>m</i>	48.9
	CH	4.12	<i>dd</i>	64.1
	CH ₃	2.04	<i>s</i>	24.9
N-Acetyl-L-aspartate	CH ₂	2.59	<i>dd</i>	42.3
	CH	4.37	<i>m</i>	56.2
	CH ₂	2.09	<i>m</i>	30.7
L-Glutamate	CH ₂	2.33	<i>m</i>	36.7
	CH	3.74	<i>m</i>	57.6
	CH ₃	2.17	<i>s</i>	25.7
p-Cresol	CH	6.87	<i>d</i>	119.3
	CH	7.17	<i>d</i>	133.6
	CH ₃	2.21	<i>s</i>	32.6
Acetone	CH ₃	2.21	<i>s</i>	32.6
Methionine sulfoxide	CH ₂	2.31	<i>m</i>	26.3
	CH ₃	2.74	<i>s</i>	39.1
	CH ₂	3.02	<i>m</i>	50.8
	CH	3.87	<i>s</i>	56.1
	CH ₂	2.34	<i>m</i>	36.7
Succinate	CH ₂	2.34	<i>m</i>	36.7
Calcium-EDTA complex (Ca-EDTA)	CH ₂	2.57	<i>s</i>	57.9
	CH ₂	3.13	<i>d</i>	63.9
Magnesium-EDTA complex (Mg-EDTA)	CH ₂	2.71	<i>s</i>	58.3
	CH ₂	3.17	<i>m</i>	54.1
Dimethylamine	CH ₃	2.73	<i>s</i>	36.8
ND 3	CH ₂	2.87	<i>s</i>	59.3

Tyramine	CH ₂	2.93	<i>t</i>	32.9
	CH ₂	3.23	<i>t</i>	43.9
	CH	6.82	<i>d</i>	118.6
	CH	7.29	<i>d</i>	132.9
Creatinine	CH ₃	3.03	<i>s</i>	33.1
	CH ₂	4.05	<i>s</i>	59.2
L-Tyrosine	CH ₂	3.03	<i>dd</i>	38.2
	CH ₂	3.17	<i>dd</i>	38.2
	CH	3.93	<i>dd</i>	58.9
	CH	6.94	<i>m</i>	118.1
	CH	7.21	<i>m</i>	134.4
L-Phenylalanine	CH ₂	3.13	<i>m</i>	39.7
	CH ₂	3.27	<i>m</i>	39.7
	CH	3.98	<i>m</i>	58.9
	CH	7.37	<i>m</i>	130.4
Choline	CH ₃	3.19	<i>s</i>	56.7
	CH ₂	3.50	<i>dd</i>	70.1
	CH ₂	4.05	<i>m</i>	58.4
Free EDTA	CH ₂	3.23	<i>m</i>	63.8
	CH ₂	3.51	<i>m</i>	60.1
Betaine	CH ₃	3.24	<i>s</i>	55.1
	CH ₂	3.89	<i>s</i>	68.9
Trimethylamine <i>N</i> -oxide (TMAO)	CH ₃	3.25	<i>s</i>	62.8
Beta-D-Glucose	CH	3.25	<i>s</i>	77.1
	CH	3.41	<i>s</i>	72.6
	CH	3.48	<i>s</i>	78.8
	CH ₂	3.73	<i>s</i>	63.7
	CH ₂	3.89	<i>s</i>	63.7
	CH	4.64	<i>d</i>	98.8
Myo-inositol	CH	3.28	<i>t</i>	77.1
	CH	3.53	<i>dd</i>	73.9
	CH	3.60	<i>t</i>	75.1
	CH	4.05	<i>dd</i>	74.9
L-Tryptophan	CH ₂	3.29	<i>dd</i>	29.1
	CH ₂	3.47	<i>dd</i>	29.1

	CH	4.05	<i>dd</i>	57.9
	CH	7.19	<i>m</i>	120.9
	CH	7.21	<i>m</i>	124.9
	CH	7.37	<i>s</i>	127.2
	CH	7.53	<i>d</i>	114.7
	CH	7.72	<i>d</i>	121.1
	CH	3.41	<i>s</i>	72.6
	CH	3.54	<i>s</i>	74.3
Alpha-D-glucose	CH	3.71	<i>s</i>	75.7
	CH	3.83	<i>s</i>	74.4
	CH ₂	3.84	<i>s</i>	63.5
	CH	5.23	<i>d</i>	95.1
ND 4 (Overlap)	CH ₂	3.51	<i>m</i>	45.2
ND 5 (Overlap)	CH ₂	3.67	<i>m</i>	65.8
ND 6 (Overlap)	CH ₂	3.67	<i>m</i>	69.1
	CH ₂	3.71	<i>m</i>	41.6
	CH	4.15	<i>dd</i>	53.4
L-Kynurenine	CH	6.78	<i>m</i>	118.1
	CH	6.88	<i>dd</i>	120.7
	CH	7.39	<i>m</i>	136.3
	CH	7.79	<i>dd</i>	133.9
	CH ₂	3.96	<i>d</i>	46.7
Hippurate	CH	7.56	<i>m</i>	131.9
	CH	7.62	<i>m</i>	134.9
	CH	7.82	<i>dd</i>	129.1
ND 7 (Overlap)	CH/CH ₃	4.46	<i>m</i>	106.2
ND 8	CH/CH ₃	5.11	<i>d</i>	102.4
ND 9 (Overlap)	CH/CH ₃	5.29	<i>m</i>	132.4
	CH	7.21	<i>dd</i>	122.4
	CH	7.28	<i>dd</i>	125.1
Indoxyl sulfate	CH	7.36	<i>s</i>	118.8
	CH	7.51	<i>d</i>	114.8
	CH	7.71	<i>d</i>	120.1
ND 10 (Overlap)	CH/CH ₃	7.64	<i>m</i>	135.2

ND 11 (Overlap)	(CH ₂ or CH/CH ₃)	7.92	<i>m</i>	ND
ND 12	(CH ₂ or CH/CH ₃)	7.96	<i>s</i>	ND
Formate	CH	8.46	<i>s</i>	173.7

* $\delta^1\text{H}$ = Hydrogen chemical shift; $\delta^{13}\text{C}$ = Carbon chemical shift; *s* = singlet; *d* = doublet; *t* = triplet; *q* = quartet; *m* = multiplet; *dd* = double doublet; *dt* = double triplet. Overlap = signal overlap. ND = not determined

Table 5. Pathway analysis from plasma metabolites by Metabolomic Pathway Analysis (MetPA) software, considering raw p value <0.05 and pathway impact (>0.2) as statistics significance.

Pathway analysis	Total	Expected	*Hits	Raw p	-log(p)	Holm adjust	FDR	**Pathway Impact
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	0.96	10	8.3921 e-09	18.596	7.0494 e-07	7.049 e-07	0
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	8	0.16	3	0	7.876	0.031	0.015	0
Phenylalanine metabolism	10	0.2	3	0.001	7.141	0.064	0.022	0.357
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	0.56	4	0.001	6.255	0.155	0.038	0.283
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4	0.08	2	0.002	6.089	0.181	0.038	1
Butanoate metabolism	15	0.3	3	0.002	5.876	0.221	0.039	0
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	0.64	3	0.024	3.718	1	0.291	0
Arginine biosynthesis	14	0.28	2	0.030	3.495	1	0.318	0.192
Arginine and proline metabolism	38	0.76	3	0.038	3.268	1	0.331	0.221
Valine, leucine and isoleucine degradation	40	0.8	3	0.043	3.136	1	0.331	0.011
Pyruvate metabolism	22	0.44	2	0.069	2.662	1	0.488	0.144
Synthesis and degradation of ketone bodies	5	0.1	1	0.096	2.341	1	0.598	0
Galactose metabolism	27	0.54	2	0.099	2.305	1	0.598	0.034
Nitrogen metabolism	6	0.12	1	0.114	2.168	1	0.600	0
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	6	0.12	1	0.114	2.168	1	0.600	0.5
Glycine, serine and threonine metabolism	33	0.66	2	0.139	1.969	1	0.689	0.05
Ascorbate and aldarate metabolism	8	0.16	1	0.149	1.900	1	0.697	0
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	9	0.18	1	0.166	1.791	1	0.736	0
Biotin metabolism	10	0.2	1	0.183	1.696	1	0.770	0
Tryptophan metabolism	41	0.82	2	0.196	1.625	1	0.779	0.237

Tyrosine metabolism	42	0.84	2	0.204	1.589	1	0.779	0.164
Histidine metabolism	16	0.32	1	0.277	1.282	1	1	0
Starch and sucrose metabolism	18	0.36	1	0.306	1.183	1	1	0.420
Pantothenate and CoA biosynthesis	19	0.38	1	0.320	1.138	1	1	0
Seleno compound metabolism	20	0.4	1	0.334	1.096	1	1	0
Citrate cycle (TCA cycle)	20	0.4	1	0.334	1.096	1	1	0.032
Propanoate metabolism	23	0.46	1	0.373	0.984	1	1	0
Lysine degradation	25	0.5	1	0.398	0.918	1	1	0
Glycolysis / Gluconeogenesis	26	0.52	1	0.411	0.888	1	1	0.029
Glutathione metabolism	28	0.56	1	0.434	0.832	1	1	0.019
Phosphatidylinositol signaling system	28	0.56	1	0.434	0.832	1	1	0.037
Porphyrin and chlorophyll metabolism	30	0.6	1	0.457	0.781	1	1	0
Inositol phosphate metabolism	30	0.6	1	0.457	0.781	1	1	0.129
Glycerophospholipid metabolism	36	0.72	1	0.521	0.652	1	1	0.025

*Total determined biomolecule number from Pathway analysis.

**Pathway impact based on raw p-value.

Table 6. PC1 and PC2 relative weight for PCA assignments of the ¹H NMR signals from the eGRF and albuminuria classification and control patients.

Combinations	PC1 (%)	PC2 (%)
S1 – S5 and control samples	28.11	13.78
S1 – S4 and control samples	25.61	16.46
S1 – S5 samples	33.38	15.12
S5 and control samples	43.66	10.43
S1 – S4 samples	27.45	19.51
A1 – A3 and control samples	28.17	22.38

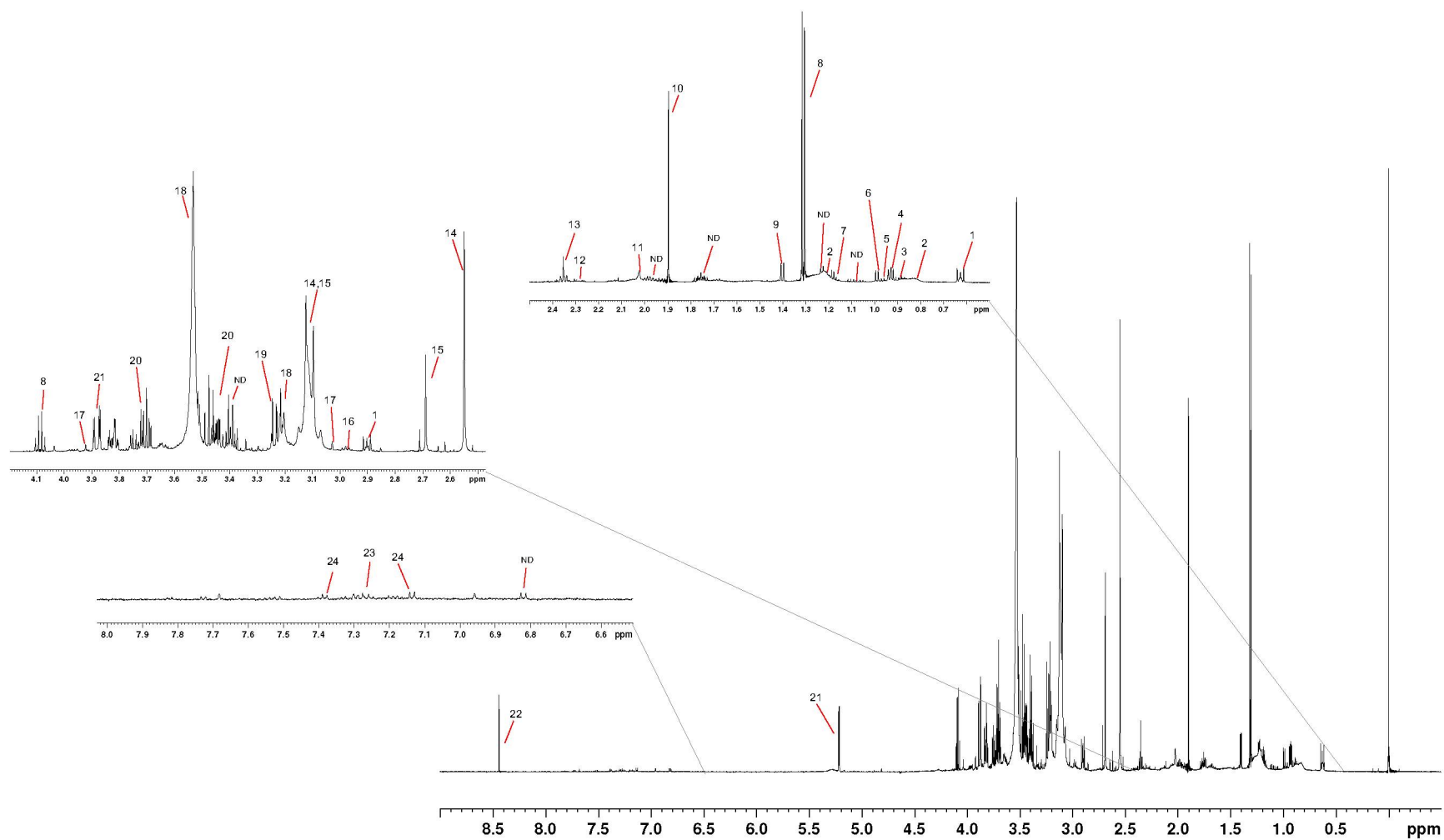


Figure 4. ^1H NMR spectrum from the control group pool plasma samples (^1H : 600.13 MHz; noesypr1d pulse sequence; 310 K; D_2O containing 0.1% of DSS). 1. DSS. 2. Lipids. 3. 2-Hydroxy-3-Methylbutyrate. 4. Ketoleucine. 5. Isoleucine. 6. Valine. 7. 3-Hydroxybutyrate. 8. Lactate. 9. Alanine. 10. Acetate. 11. N-Acetyl-L-aspartate. 12. Succinate. 13. Glutamate. 14. Ca-EDTA. 15. Mg-EDTA. 16. Lysine. 17. Creatinine. 18. Free EDTA. 19. Choline/Betaine/TMAO. 20. Glucose beta. 21. Glucose alpha. 22. Formate. 23. Phenylalanine. 24. Tryptophan. ND = not determined. Chemical shifts assignments references: *The Human Metabolome Database* (HMDB) and *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRDB).

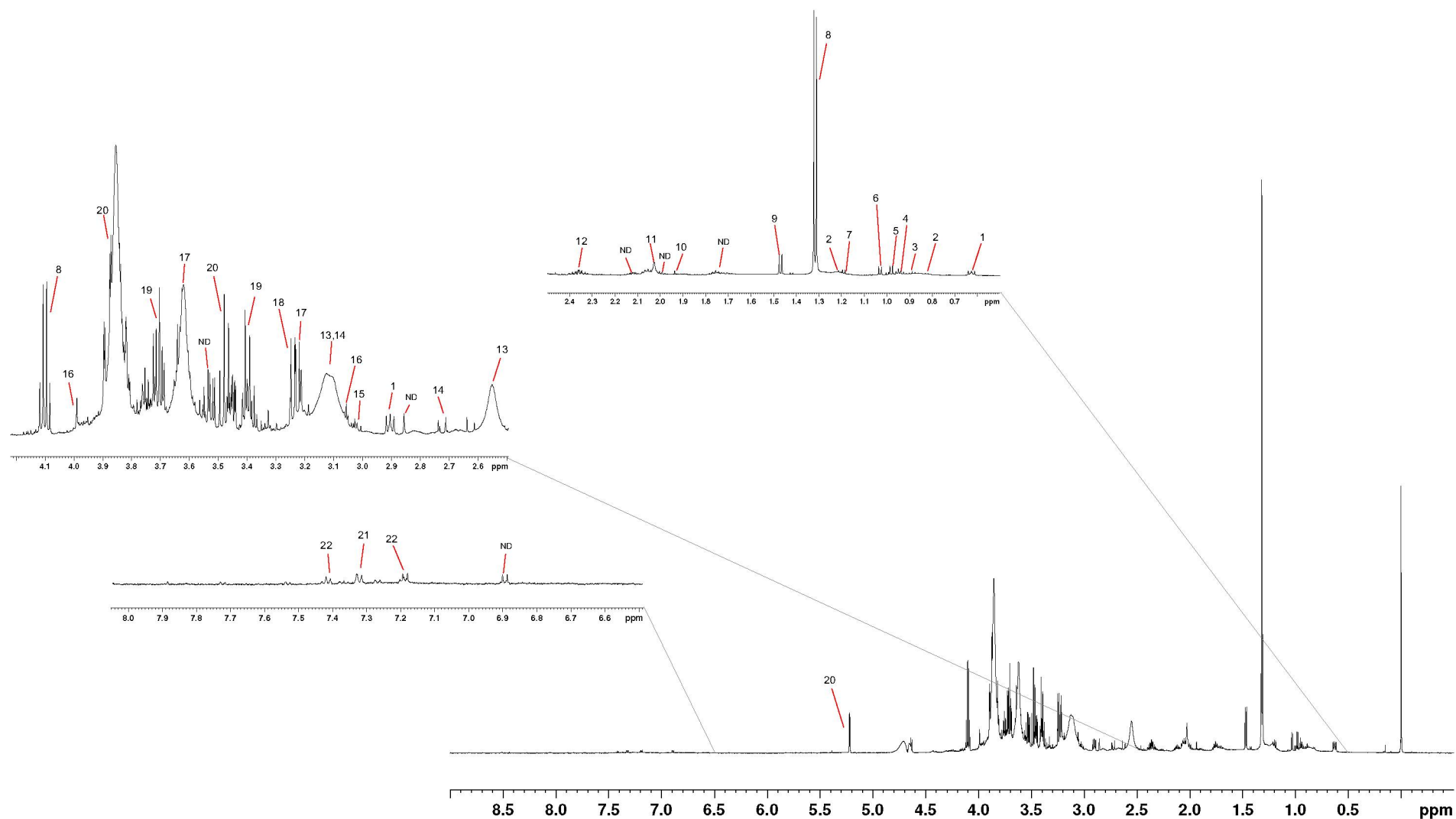


Figure 5. ^1H NMR spectrum from the G1 CKD pool plasma samples (^1H : 600.13 MHz; noesypr1d pulse sequence; 310 K; D_2O containing 0.1% of DSS). 1. DSS. 2. Lipids. 3. 2-Hydroxy-3-Methylbutyrate. 4. Ketoleucine. 5. Isoleucine. 6. Valine. 7. 3-Hydroxybutyrate. 8. Lactate. 9. Alanine. 10. Acetate. 11. N-Acetyl-L-aspartate. 12. Glutamate. 13. Ca-EDTA. 14. Mg-EDTA. 15. Lysine. 16. Creatinine. 17. Free EDTA. 18. Choline/Betaine/TMAO. 19. Glucose beta. 20. Glucose alpha. 21. Phenylalanine. 22. Tryptophan. ND = not determined. Chemical shifts assignments references: *The Human Metabolome Database (HMDB)* and *Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRDB)*.

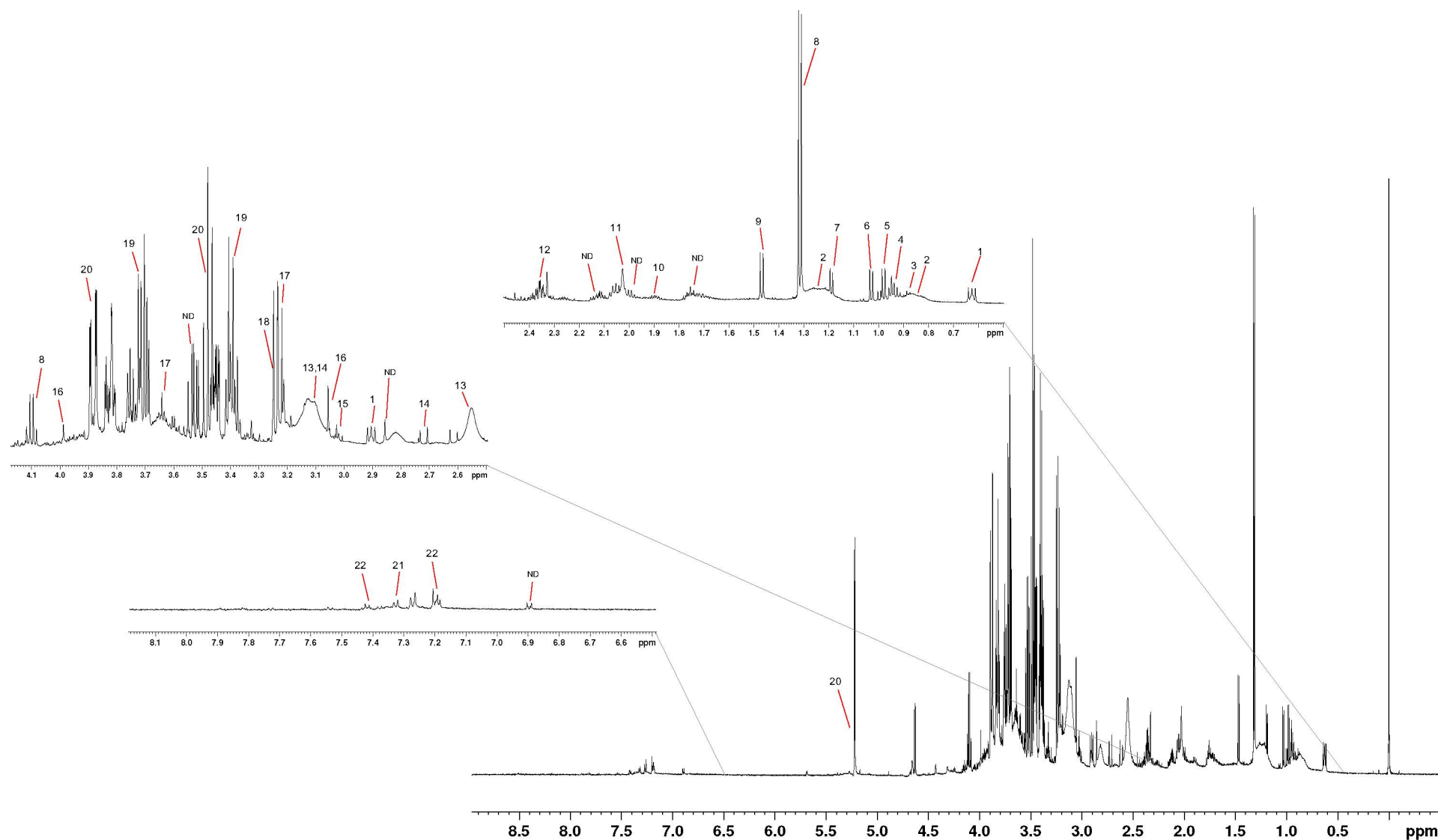


Figure 6. ^1H NMR spectrum from the G3b CKD pool plasma samples (^1H : 600.13 MHz; noesypr1d pulse sequence; 310 K; D_2O containing 0.1% of DSS). 1. DSS. 2. Lipids. 3. 2-Hydroxy-3-Methylbutyrate. 4. Ketoleucine. 5. Isoleucine. 6. Valine. 7. 3-Hydroxybutyrate. 8. Lactate. 9. Alanine. 10. Acetate. 11. N-Acetyl-L-aspartate. 12. Glutamate. 13. Ca-EDTA. 14. Mg-EDTA. 15. Lysine. 16. Creatinine. 17. Free EDTA. 18. Choline/Betaine/TMAO. 19. Glucose beta. 20. Glucose alpha. 21. Phenylalanine. 22. Tryptophan. ND = not determined. Chemical shifts assignments references: *The Human Metabolome Database* (HMDB) and *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRDB).

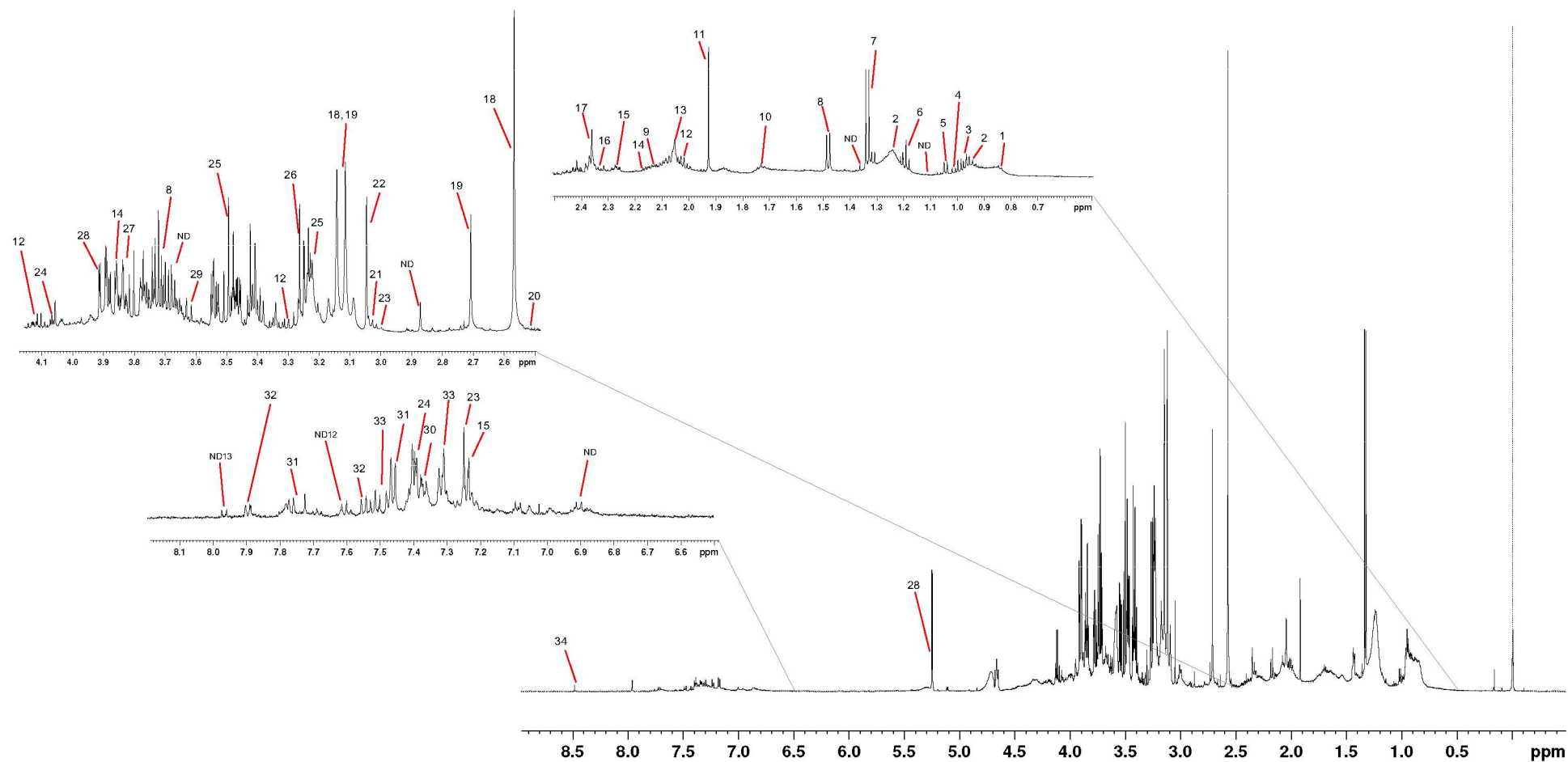


Figure 7. ^1H NMR spectrum from the G5 CKD pool plasma samples 5 (^1H : 600.13 MHz; noesypr1d pulse sequence; 310 K; D_2O containing 0.1% of DSS). 1. Lipids. 2. 2-Hydroxy-3-Methylbutyrate. 3. Ketoleucine. 4. Isoleucine. 5. Valine. 6. 3-Hydroxybutyrate. 7. Lactate. 8. Alanine. 9. Adipic acid. 10. Arginine. 11. Acetate. 12. Proline. 13. N-Acetyl-L-aspartate. 14. Glutamate. 15. p-Cresol. 16. Methionine sulfoxide. 17. Succinate. 18. Ca-EDTA. 19. Mg-EDTA. 20. Dimethylamine. 21. Tyramine. 22. Creatinine. 23. L-Tyrosine. 24. Phenylalanine. 25. Free EDTA. 26. Choline/Betaine/TMAO. 27. Glucose beta. 28. Glucose alpha. 29. Myo-inositol. 30. Tryptophan. 31. Kynurenine. 32. Hippurate. 33. Indoxyl sulfate. 34. Formate. ND = not determined. Chemical shifts assignments references: *The Human Metabolome Database (HMDB)* and *Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRDB)*.

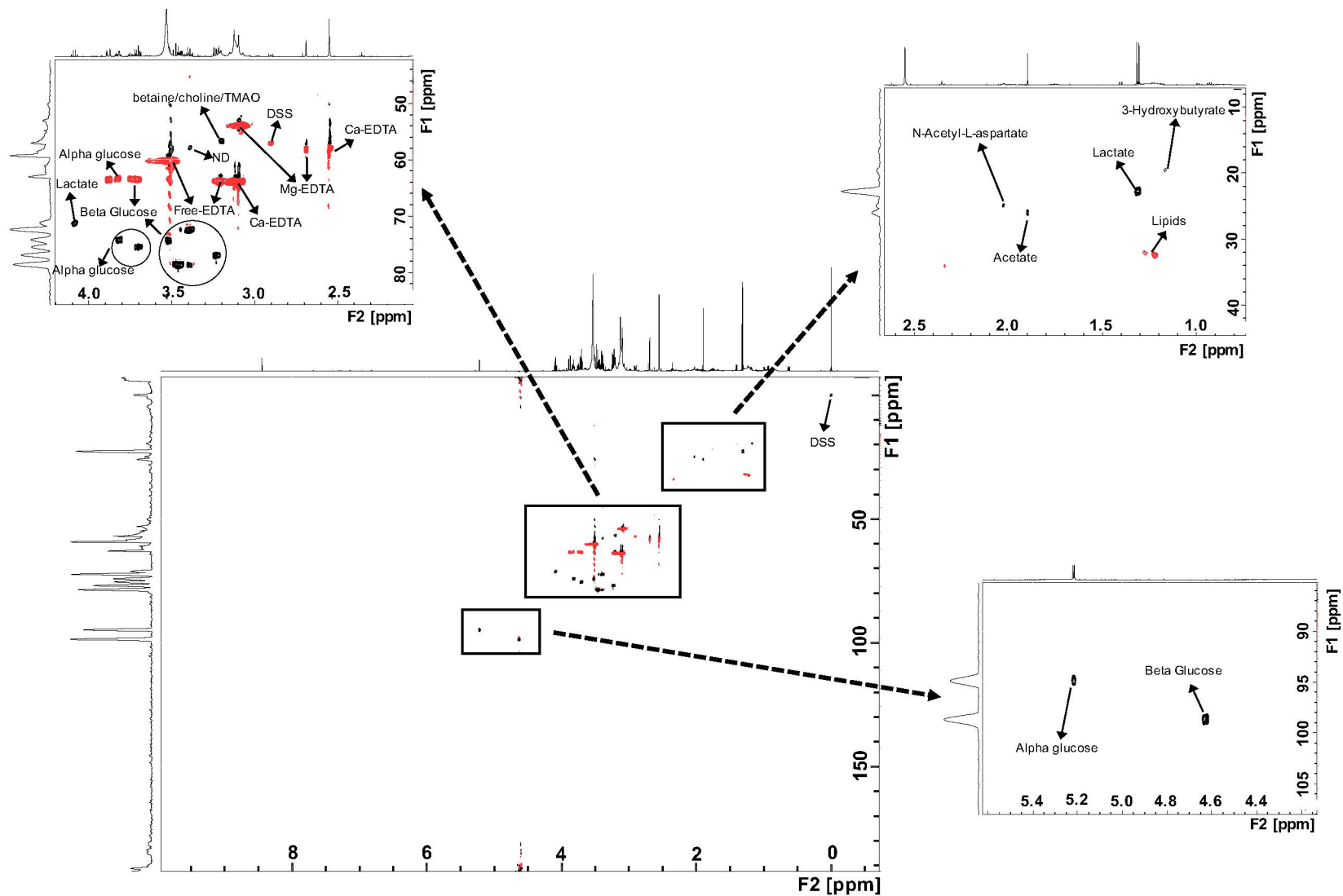


Figure 8. Direct correlation map ^1H - ^{13}C HSQC edited (HSQCed) spectrum from the control group pool plasma samples (^1H : 600.13 MHz, ^{13}C 150.61 MHz; 310 K; D_2O containing 0.1% of DSS). Chemical shifts are referenced to DSS at 0.00 ppm. ND = not determined.

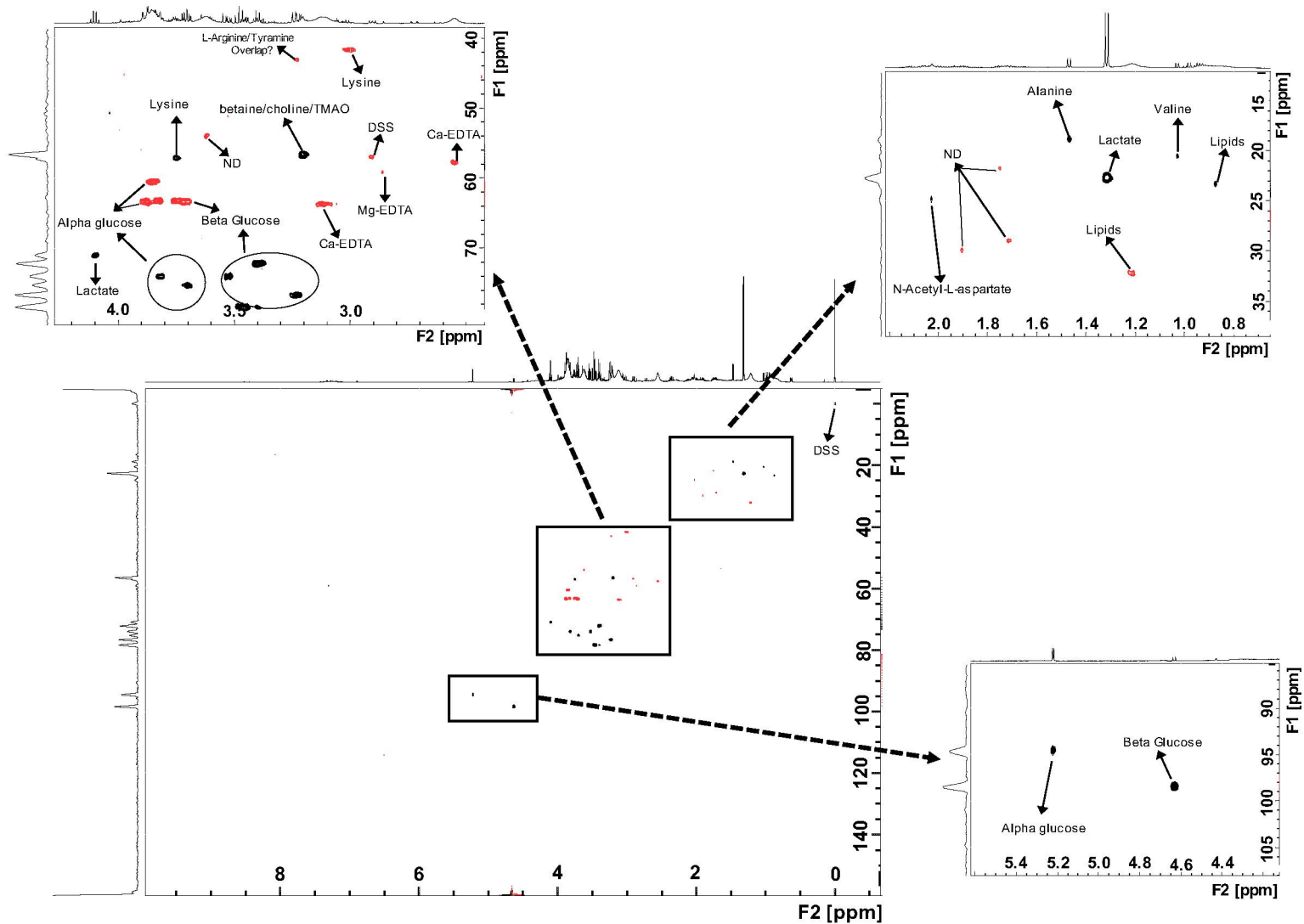


Figure 9. Direct correlation map ^1H - ^{13}C HSQC edited (HSQCed) spectrum from the G1 group pool plasma samples (^1H : 600.13 MHz, ^{13}C 150.61 MHz; 310 K; D_2O containing 0.1% of DSS). Chemical shifts are referenced to DSS at 0.00 ppm. ND = not determined.

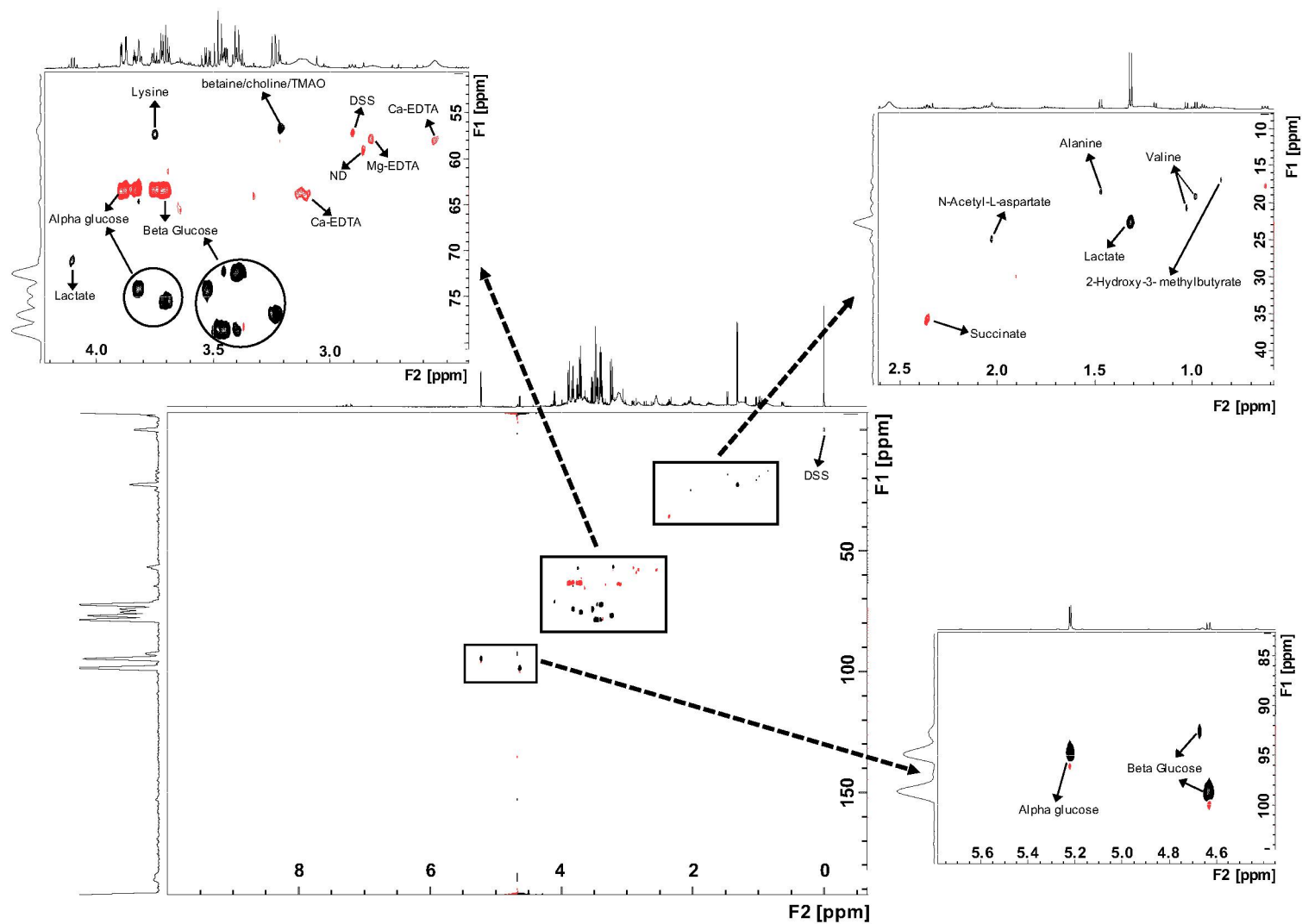


Figure 10. Direct correlation map ^1H - ^{13}C HSQC edited (HSQCed) spectrum from the G3b group pool plasma samples (^1H : 600.13 MHz, ^{13}C 150.61 MHz; 310 K; D_2O containing 0.1% of DSS). Chemical shifts are referenced to DSS at 0.00 ppm. ND = not determined.

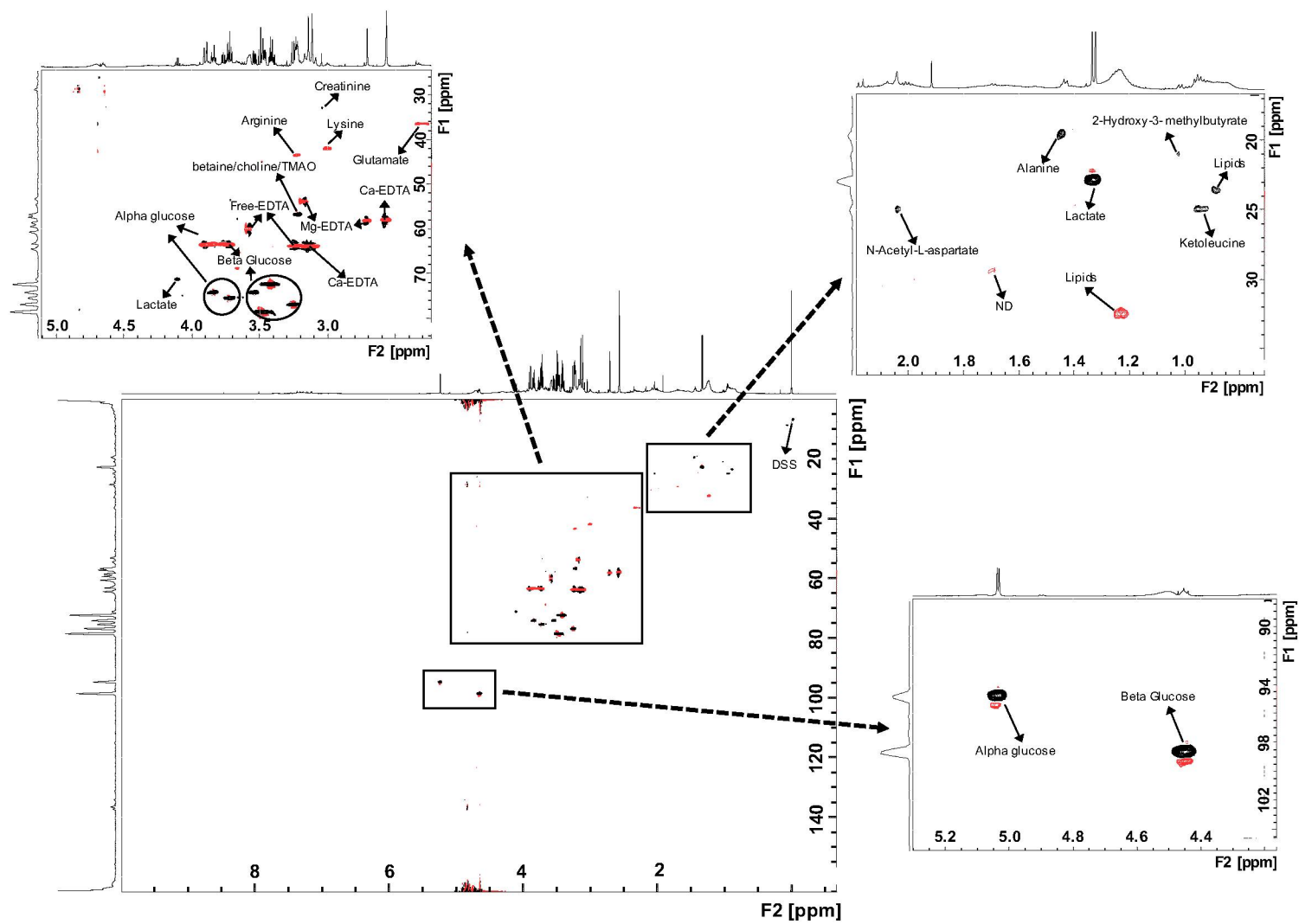


Figure 11. Direct correlation map ^1H - ^{13}C HSQC edited (HSQCed) spectrum from the G5 group pool plasma samples (^1H : 600.13 MHz, ^{13}C 150.61 MHz; 310 K; D_2O containing 0.1% of DSS). Chemical shifts are referenced to DSS at 0.00 ppm. ND = not determined.

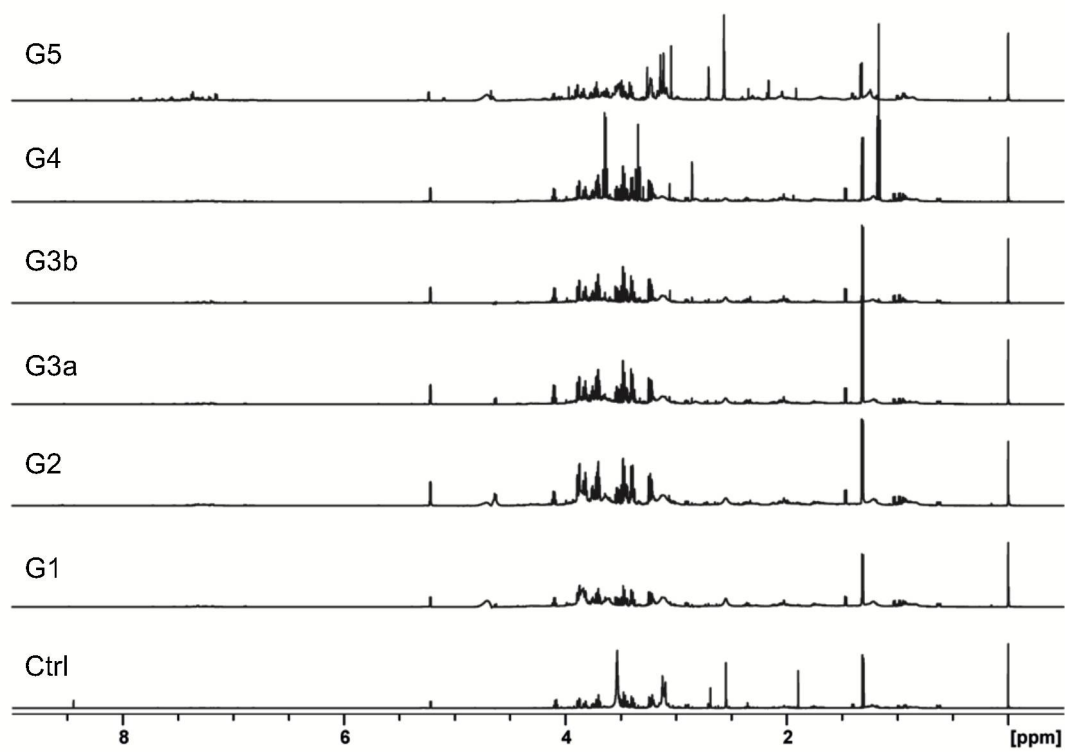


Figure 12. ^1H NMR spectra (^1H : 600.13 MHz, D_2O containing 0.1% of DSS) for CKD eGFR stages G1 – G5 and control (Ctrl). Chemical shifts are referenced to DSS at 0.00 ppm.

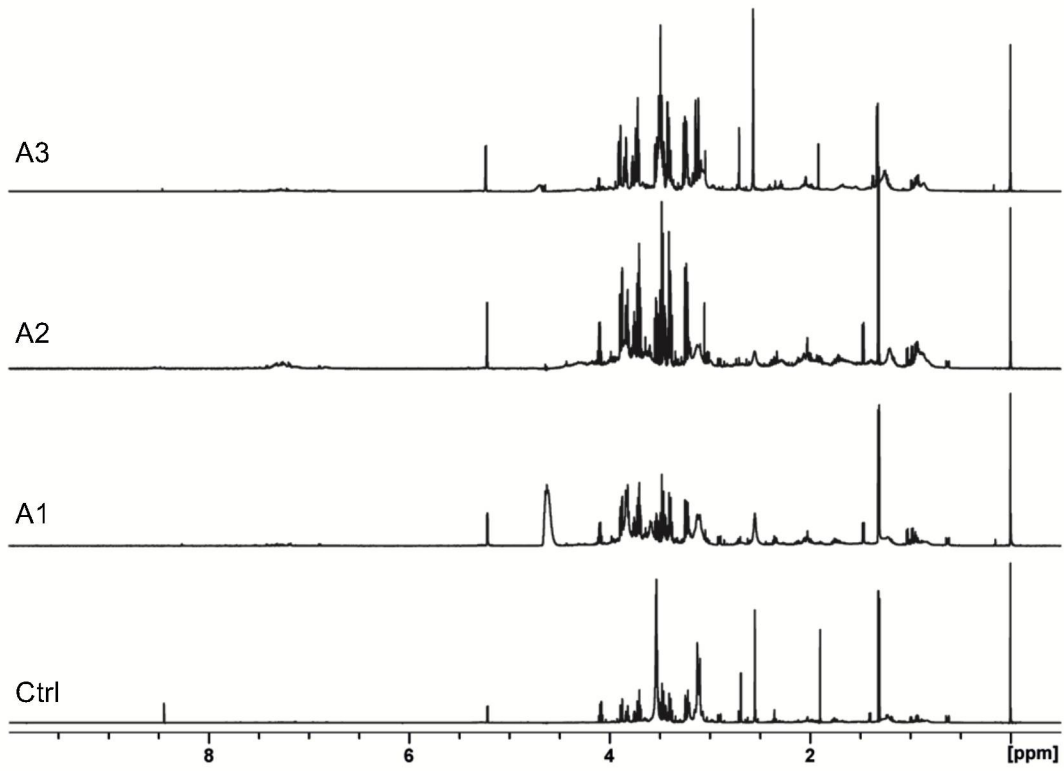


Figure 13. ^1H NMR spectra (^1H : 600.13 MHz, D_2O containing 0.1% of DSS) for CKD eGFR stages A1 – A3 and control (Ctrl). Chemical shifts are referenced to DSS at 0.00 ppm.

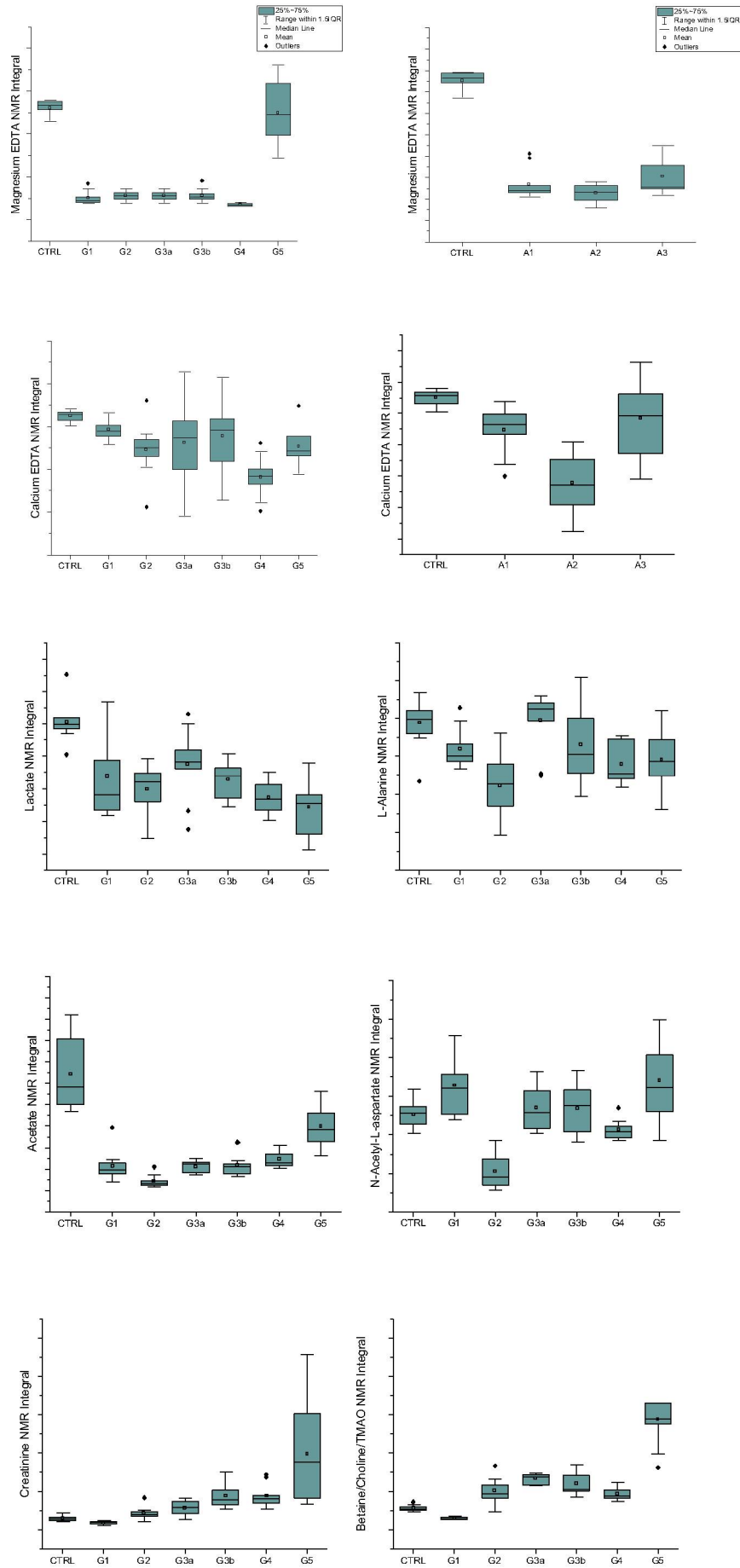


Figure 14. Relative concentrations of metabolites from CKD stages by One-way ANOVA. The relative intensities were obtained from the integration of the ^1H NMR spectra and normalized to DSS (p -value < 0.001).

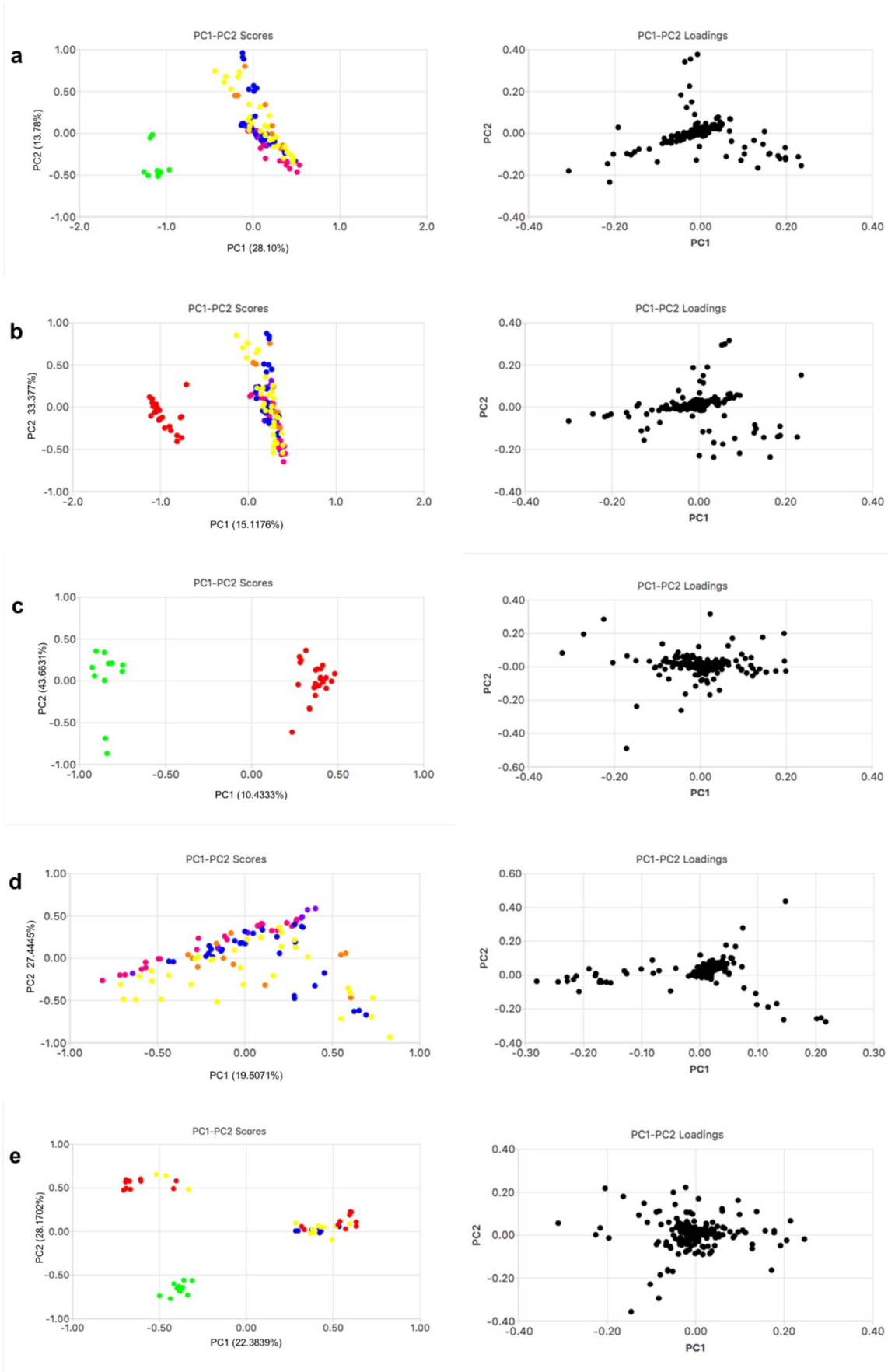


Figure 15. PCA assignments of the ^1H NMR signals from the plasma samples of the S1 – S4 CKD eGRF classification and control patients (a), S1 – S5 CKD eGRF classification (b), S5 CKD eGRF classification and control patients (c), S1 – S4 CKD eGRF classification (d) and A1 – A3 CKD albuminuria classification and control patients (e).

*Legend: Control patients (green), S1 (purple), S2 (pink), S3a (orange), S3b (blue), S4 (yellow), S5 (red), A1 (blue), A2 (yellow) and A3 (red).

13. APÊNDICES

13.1 APÊNDICE I

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 900.959

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Com o desenvolvimento da Doença Renal Crônica (DRC) e consequente acúmulo de toxinas urêmicas, como p-cresilsulfato e indoxilsulfato, ocorre uma ativação da resposta inflamatória sistêmica e especialmente vascular. A fim de entender os mecanismos celulares e moleculares no ambiente urêmico, as células serão tratadas com pool urêmico de pacientes em diferentes estágios da DRC. Assim, pode-se compreender em qual estágio da DRC inicia-se o rompimento das junções intercelulares.

Serão utilizadas neste estudo amostras congeladas de plasma de aproximadamente 100 pacientes em tratamento no Ambulatório de Nefrologia da Escola de Medicina da PUC-PR, que serão obtidas durante consulta de rotina. Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes serão obtidos pelo Prof. Dr. Felipe Barreto e Prof. Dr. Roberto Pecois Filho, nefrologistas do ambulatório. As amostras serão previamente selecionadas e obedecerão a critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos. As amostras de plasma serão estocadas em freezer a -80°C até o momento das análises dos marcadores de ativação endotelial e inflamatório. O mesmo material será utilizado nos estudos *In vitro* devidamente descritos no projeto. As amostras serão transportadas até o Departamento de Patologia Básica da UFPR, onde permanecerão armazenadas até o término no estudo quando serão destruídas. O Laboratório onde será realizado os experimentos (LabNefro) e o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR dispõem de equipamentos de biologia celular e molecular para a realização da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram apresentados. Foi anexada a declaração final modelo CONEP, onde o Coparticipante declara ter lido e concordar com o Parecer deste CEP/SD.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 900.959

reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CURITIBA, 11 de Março de 2015

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Pedro Camargo, 280
Bairro: 2º andar CEP: 80.060-340
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7250 E-mail: cometica.saude@ufpr.br

12.2 APÊNDICE II



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação


Curitiba, 26 de junho de 2005
Of. 226/05/CEP-PUCPR

Ref. "Modulação fenotípica induzida por soro urêmico em células vasculares".

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio deste informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 01 de junho do corrente ano aprovou o Projeto intitulado "Modulação fenotípica induzida por soro urêmico em células vasculares", pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP n° 577 e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,


Profª M. Sc Ana Cristina Miguez Ribeiro
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilma Sra.
Lia Sumie Nakao