



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

KÉLCIA ROSANA DA SILVA QUADROS

PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA E METABOLISMO ÓSSEO
EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

*ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS AND BONE METABOLISM IN
PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE*

CAMPINAS
2023

KÉLCIA ROSANA DA SILVA QUADROS

PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA E METABOLISMO ÓSSEO
EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

*ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS AND BONE METABOLISM IN
PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências na
área de concentração em Clínica Médica.

*Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the State
University of Campinas as part of the requirements for obtaining
the degree of Doctor of Sciences in the field of Internal Medicine.*

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA KÉLCIA ROSANA DA SILVA QUADROS E ORIENTADA PELO PROF. DR.
RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA

CAMPINAS
2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Q22p Quadros, Kélcia Rosana da Silva, 1970-
Produtos finais da glicação avançada e metabolismo ósseo em pacientes com doença renal crônica / Kélcia Rosana da Silva Quadros. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Rodrigo Bueno de Oliveira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Produtos finais de glicosilação avançada. 2. Distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica. 3. Insuficiência renal crônica. I. Oliveira, Rodrigo Bueno de, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Advanced glycation end products and bone metabolism in patients with chronic kidney disease

Palavras-chave em inglês:

Glycosylation end products, Advanced
Mineral and bone disorder in chronic kidney disease
Chronic kidney disease
Renal insufficiency, Chronic

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Rodrigo Bueno de Oliveira [Orientador]
Aluizio Barbosa de Carvalho
Melani Ribeiro Custodio
Lício Augusto Velloso
Wilson Nadruz Junior

Data de defesa: 06-12-2023

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4510-4674>
- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/9260719097480697>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO
KÉLCIA ROSANA DA SILVA QUADROS

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA**
- 2. PROF. DR. ALUÍZIO BARBOSA DE CARVALHO**
- 3. PROFA. DRA. MELANI RIBEIRO CUSTÓDIO**
- 4. PROF. DR. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO**
- 5. PROF. DR. WILSON NADRUZ JUNIOR**

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 06/12/2023

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Elza e Levison, cujo amor, apoio e orientação moldaram a pessoa que sou hoje. Embora não estejam mais fisicamente presentes, seu legado continua a me inspirar.

Ao meu amado marido, Plínio Trabasso, cujo apoio constante, encorajamento e compreensão foram vitais em cada etapa desta jornada, trazendo luz aos desafios e significado às conquistas.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Rodrigo Bueno de Oliveira, meu orientador, pelos valiosos ensinamentos, orientação e tempo dedicado à concretização desta tese. Sua paciência, atenção e estímulo nos momentos mais difíceis foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e para a conclusão deste importante marco.

À Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo, Número do processo **FAPESP: 2015/16544-5**, pelo suporte financeiro de auxílio à pesquisa.

Aos pacientes que participaram do estudo, permitindo-nos avançar na busca pelo conhecimento médico. Sua colaboração foi fundamental para que os nossos objetivos fossem alcançados.

Ao LEMON, Laboratório para o Estudo do Distúrbio Mineral e Ósseo em Nefrologia, que surgiu durante a execução deste projeto e o viabilizou, expresso minha sincera gratidão.

À disciplina de Nefrologia e aos seus professores pela oportunidade de realizar a Residência Médica em nefrologia e trabalhar desde então como médica nefrologista em um centro de excelência.

À Prof. Dra. Vanda Jorgetti, pela carinhosa acolhida no LIM 16, pelo apoio em diversas etapas deste trabalho, pela confiança em seu êxito e pelo exemplo de simplicidade e magnitude.

À Prof. Dra. Rosa Maria Affonso Moysés, pelo suporte abrangente e pela generosidade ao disponibilizar o laboratório LIM 16 para o desenvolvimento de parte desse trabalho. Sua notável competência como médica, pesquisadora e cientista foi uma fonte de inspiração constante ao longo desse percurso.

À Dra. Luciene dos Reis pela disponibilidade e colaboração inestimáveis em várias as fases do projeto.

À Ivone Braga, Wagner Dominguez e Luzia Furukawa, pelo fundamental apoio técnico e amizade. Minha gratidão se estende a toda a equipe do LIM 16, onde encontrei um ambiente acolhedor para o desenvolvimento de parte fundamental deste projeto.

À Professora Dra. Jacqueline Caramori, que colaborou de forma essencial para a realização do nosso projeto.

À Dra. Noemí Angélica Vieira Roza, pelo trabalho em equipe, pelo suporte e amizade.

À Célia Regina Pavan, pelo valioso auxílio nos procedimentos de bancada no laboratório de pesquisa no LEMON.

Aos companheiros de pós-graduação, André, Renata e Cinthia, agradeço por terem compartilhado e colaborado neste projeto. Sem dúvidas o suporte de todos foi essencial para que me mantivesse perseverante durante a trajetória.

À toda equipe do Centro Integrado de Nefrologia, essencial para a realização desse trabalho.

Ao meu irmão, Helvison e ao meu padrasto Ivan, por todo o apoio e amor incondicionais. Eles são a minha base e o meu porto seguro.

À amiga Patrícia Schincariol, por ter despertado em mim o desejo de estudar distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica e pelo companheirismo na nossa longa trajetória.

À amiga Lika, por ter sido professora, colega, sócia, e principalmente amiga leal e confidente desde que cheguei em Campinas.

Às instituições que possibilitaram a minha formação profissional superior: Universidade Federal da Bahia (UFBA) e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

RESUMO

O acúmulo dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) pode estar envolvido na progressão de distúrbios ósseos relacionados à doença renal crônica (DRC). Buscamos determinar a relação entre AGEs mensurados no sangue, pele e osso com parâmetros de histomorfometria, proteínas ósseas, expressão gênica e biomarcadores séricos do metabolismo ósseo em pacientes com DRC estágios 3 a 5D. Os níveis séricos de AGEs foram estimados por pentosidina, hemoglobina glicada (A1c) e N-carboximetil lisina (CML). O acúmulo de AGEs na pele foi estimado a partir da autofluorescência da pele (SAF). O acúmulo de AGEs e a expressão de receptores multiligantes para AGEs (RAGEs) nos ossos foram avaliados por imuno-histoquímica; amostras ósseas foram utilizadas para avaliar a expressão de proteínas e genes e para a análise histomorfométrica. Os dados são de 86 pacientes (idade: 51 ± 13 anos; 60 [70%] em diálise). Os níveis séricos de pentosidina, CML, A1c e SAF foram de 71,6 pmol/mL, 15,2 ng/mL, 5,4% e 3,05 unidades arbitrárias, respectivamente. AGEs cobriam 3,92% do osso trabecular e 5,42% da superfície do osso cortical, enquanto os RAGEs foram expressos em 0,7% e 0,83% das superfícies ósseas trabeculares e corticais, respectivamente. O acúmulo de AGEs no osso foi inversamente relacionado à relação RANK-L/PTH (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B/paratormônio sérico) ($R = 0,25$; $p = 0,03$), e a expressão de RAGE foi negativamente relacionada à fosfatase ácida resistente ao tartarato-5b/PTH sérico ($R = 0,31$; $p = 0,01$). Pacientes com maior acúmulo de AGEs apresentaram diminuição da expressão de proteínas ósseas (esclerostina [1,96 (0,11–40,3) vs. 89,3 (2,88–401) ng/mg; $p = 0,004$]; proteína relacionada a Dickkopf-1 [0,064 (0,03–0,46) vs. 1,36 (0,39–5,87) ng/mg; $p = 0,0001$]; FGF-23 [1,07 (0,4–32,6) vs. 44,1 (6–162) ng/mg; $p = 0,01$]; e osteoprotegerina [0,16 (0,08–2,4) vs. 6,5 (1,1–23,7) ng/mg; $p = 0,001$]), aumento da expressão do gene p53 e redução da expressão do gene Dickkopf-1. Pacientes com níveis elevados de A1c sérico apresentaram maior porosidade cortical e Mlt e redução da superfície osteoblástica, superfície de reabsorção, superfície osteoclástica, taxa de aposição mineral e área ajustada. A espessura cortical foi negativamente correlacionada com os níveis séricos de A1c ($R = 0,28$; $p = 0,02$) e pentosidina ($R = 0,27$; $p = 0,02$). O acúmulo de AGEs nos ossos de pacientes com DRC foi relacionado à diminuição da expressão de proteínas ósseas, alterações na expressão gênica e aumento da resistência esquelética ao PTH; os níveis de A1c e pentosidina foram relacionados à diminuição da espessura cortical; e os níveis de A1c foram relacionados ao aumento da porosidade cortical e Mlt.

Palavras-chave: produtos finais de glicação avançada; distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica; doença renal crônica.

ABSTRACT

The buildup of advanced glycation end products (AGEs) may play a role in the worsening of CKD-related bone conditions. Our study aimed to examine the link between AGEs present in blood, skin, and bone with histomorphometry parameters, bone proteins, gene expression, and serum biomarkers of bone metabolism in patients with CKD stages 3 to 5D. We assessed serum AGEs via indicators like pentosidine, A1c, and CML. Skin AGEs accumulation was gauged through skin autofluorescence (SAF). The accumulation of AGEs and the expression of multi-ligand receptors for AGEs (RAGEs) in the bone were evaluated by immunohistochemistry; bone samples were used for protein and gene expression evaluation and histomorphometric analysis. The study involved 86 patients (average age: 51 ± 13 years; 70% undergoing dialysis), median values were: pentosidine - 71.6 pmol/mL, CML - 15.2 ng/mL, A1c - 5.4%, and SAF - 3.05 units. AGEs covered 3.92% of trabecular bone and 5.42% of the cortical bone surface, whereas RAGEs were expressed in 0.7% and 0.83% of trabecular and cortical bone surfaces, respectively. A negative relationship existed between bone AGEs accumulation and the serum NF- κ B ligand/PTH ratio ($R=0.25$; $p=0.03$) and between RAGEs expression and serum acid phosphatase-5b/PTH ($R=0.31$; $p=0.01$). High AGEs accumulation corresponded to lower bone protein expressions, a rise in the p53 gene, and a decline in the Dickkopf-1 gene. Elevated serum A1c was linked with increased cortical porosity and Mlt and a reduction in various bone surfaces and mineral metrics. Cortical thickness had negative associations with serum A1c ($R=0.28$; $p=0.02$) and pentosidine ($R=0.27$; $p=0.02$). In conclusion, in CKD patients, bone AGEs accumulation is tied to altered bone protein and gene expressions, heightened PTH skeletal resistance. A1c and pentosidine concentrations correlate with thinner cortices, while A1c is associated with greater cortical porosity and Mlt.

Keywords: advanced glycation end products; chronic kidney disease-mineral and bone disorder; chronic kidney disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Fotografia histórica de Louis-Camille Maillard (1878-1936), capturada em seu laboratório, presumivelmente no ano de 1915.	17
Figura 2. Vias de formação de AGEs e ALEs.	19
Figura 3. Desenho do estudo. Subdivisão da coorte de pacientes com DRC.	26
Figura 4. Figura ilustrativa da aferição de AGEs com o AGE-Reader™.	28
Figura 5. Esquema da divisão do fragmento obtido por biópsia óssea de crista ilíaca.	30

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> e tamanhos dos <i>amplicons</i> dos genes SOST, Beta-catenina, OPG, RANKL, FGF-23, P53, RANK, DKK, Osterix, ALP-1, Collagen-1, BGLAP e GAPDH.	50
Tabela 2 - Parâmetros estáticos empregados na análise histomorfométrica das biópsias ósseas.	51
Tabela 3 - Parâmetros dinâmicos empregados na análise histomorfométrica das biópsias ósseas.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Autofluorescência
AGEs	Produtos finais da glicação avançada (do inglês, <i>Advanced glycation end-products</i>)
AGER1	Receptor oligossacaril transferase-48
ALEs	Produtos finais da lipoxidação avançada (do inglês, <i>Advanced lipoxidation end-products</i>)
ALP-I	Gene que codifica a fosfatase alcalina óssea
AVE	Acidente vascular encefálico
ASBMR	<i>American Society for Bone and Mineral Research</i>
BFR/BS	Taxa de formação óssea (do inglês, <i>bone formation rate</i>)
BGLAP	Gene que codifica a osteocalcina
BV/TV	Volume trabecular (do inglês, <i>bone volume / tissue volume</i>)
CIN	Centro Integrado de Nefrologia
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
CML	Carboximetil-lisina
Ct.Po	Porosidade cortical (do inglês, <i>cortical porosity</i>)
Ct.Th	Espessura cortical (do inglês, <i>cortical width</i>)
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
DCV	Doença cardiovascular
DEXA	Absortometria de raio-x de dupla energia (do inglês, <i>dual energy x-ray absorptiometry</i>)
DKK-1	Dickkopf-related protein 1
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMO	Distúrbio mineral-ósseo
DOA	Doença óssea adinâmica
DP	Diálise peritoneal
DRC	Doença renal crônica
ELISA	Imunoensaio enzimático (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunossorbent Assay</i>)
ES/BS	Superfície de reabsorção (do inglês, <i>eroded surface</i>)
Fb.V/TV	Fibrose medular (do inglês, <i>fibrous volume</i>)

FGF-23	Fator de crescimento do Fibroblasto 23
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
GAPDH	Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HC	Hospital de Clínicas
HD	Hemodiálise
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês, <i>High-density lipoprotein</i>)
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Intervalo de confiança
IL-1 β	Interleucina-1beta
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>Low-density lipoprotein</i>)
MG	Metilglioxal
MAR	Taxa de aposição mineral (do inglês, <i>mineral aposition rate</i>)
Mlt	Tempo de mineralização (do inglês, <i>mineralization lag time</i>)
MS/BS	Superfície mineralizante (do inglês, <i>mineralized surface</i>)
Ob.S/BS	Superfície osteoblástica (do inglês, <i>osteoblast surface</i>)
Oc.S/BS	Superfície osteoclástica (do inglês, <i>osteoclast surface</i>)
OF	Osteíte fibrosa
OPG	Osteoprotegerina
OR	Osteodistrofia renal
OS/BS	Superfície osteoide (do inglês, <i>osteoid surface</i>)
0.Th	Espessura osteoide (do inglês, <i>osteoid thickness</i>)
OV/BV	Volume osteoide (do inglês, <i>osteoid volume</i>)
p53	Gene p53
PTH	Paratormônio
PTHi	Hormônio intacto da paratireoide
RAGE	Receptor de AGE
RANK	Receptor ativador do fator nuclear Kappa-B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-B
sAF	Autofluorescência da pele
SOST	Gene que codifica a esclerostina
Tb.N	Número trabecular (do inglês, <i>trabecular number</i>)
Tb.Sp	Separação trabecular (do inglês, <i>trabecular separation</i>)

Tb Th	Espessura trabecular (do inglês, <i>trabecular thickness</i>)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF	Taxa de filtração glomerular
TRAP5b	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
UA	Unidades arbitrárias
UF	Ultrafiltração
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

Item	Página
1. Introdução	16
2. Objetivos	25
3. Metodologia	
3.1 Desenho do estudo e população	26
3.2 Dados clínicos e demográficos	27
3.3 Mensuração de AGEs por autofluorescência da pele (AGE-sAF)	27
3.4 Determinação dos níveis de AGE no soro	28
3.5 Análise bioquímica	29
3.6 Biópsia Óssea	29
3.7 Imuno-histoquímica e quantificação do acúmulo de expressão de AGEs e RAGEs no tecido ósseo	31
3.8 Quantificação de proteína óssea por multiplex	32
3.9 Expressão gênica	32
3.10 Histomorfometria	33
3.11 Análise Estatística	34
4. Resultados e Discussão (artigo publicado JBMR Plus)	35
5. Conclusão	44
6. Referências bibliográficas	45
7. Apêndices	
7.1 Sequência dos <i>primers</i> e tamanhos dos <i>amplicons</i> dos genes avaliados	50
7.2 Parâmetros estáticos empregados na análise histomorfométrica	51
7.3 Parâmetros dinâmicos empregados na análise histomorfométrica	52
8. Anexos	
8.1 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas	53
8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	70
8.3 Participações complementares durante a pós-graduação	72
8.4 Permissão/autorização junto à editora para a inclusão dos arquivos na Tese	79

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a doença renal crônica (DRC) representa um desafio para a saúde pública global, com aumento gradual de sua ocorrência e prevalência, apresentando evolução desfavorável e custo de cuidados elevado. Mais de 10% da população mundial apresenta esse problema de saúde (1). A prevalência da condição aumenta com o avançar dos anos, afetando mais de 20% dos indivíduos acima de 60 anos e 35% daqueles com mais de 70 anos (2). No Brasil, de acordo com o último censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia, em 2022 já existiam 153.831 pacientes em terapia renal substitutiva, com uma taxa de mortalidade de 17,1% ao ano (3).

Na DRC ocorrem alterações nos parâmetros do metabolismo mineral e ósseo que surgem precocemente durante a progressão da disfunção renal. Essas alterações representam uma causa significativa de morbidade e diminuição da qualidade de vida para os pacientes afetados (4, 5). Em 2006, o termo "distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica" (DMO-DRC) foi proposto pelo grupo de trabalho do *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) com o objetivo de descrever a disfunção geral do metabolismo mineral e ósseo causada pela DRC (6). O DMO é uma complicação importante da DRC e causa efeitos sistêmicos, resultando em doenças cardiovasculares, fraturas ósseas e aumento da mortalidade (4, 6-9).

A fisiopatologia do DMO-DRC é um processo complexo que engloba a interação de hormônios, citocinas, proteínas e diversas vias de sinalização celular (10). Esse distúrbio está diretamente relacionado ao acúmulo de várias toxinas urêmicas, como o fosfato, paratormônio (PTH) e fator de crescimento do fibroblasto 23 (FGF-23), as quais exercem efeitos deletérios em vários órgãos e tecidos, principalmente no sistema cardiovascular e ósseo (11, 12). Dentre as toxinas urêmicas, estão os produtos finais da glicação avançada (AGEs), cujo efeito no metabolismo ósseo de pacientes com DRC é pouco compreendido (13-15).

Geração de AGEs

Os AGEs representam uma classe diversificada de substâncias formadas pela reação não enzimática de glicação, que envolve a ligação de moléculas de açúcar a proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Essa reação ocorre por meio da via clássica de Maillard, uma sequência intrincada de transformações químicas, descrita pioneiramente pelo químico e médico francês Louis-Camille Maillard no início do século XX (16). (Figura 1).



Figura 1. Fotografia histórica de Louis-Camille Maillard (1878-1936), capturada em seu laboratório, presumivelmente no ano de 1915.

Louis-Camille Maillard foi um pioneiro na compreensão dos processos químicos envolvidos na formação de compostos de glicação. Ele observou que, quando aminoácidos e açúcares reagem em condições adequadas, ocorre a formação de produtos que conferem cor, aroma e sabor característicos a alimentos cozidos ou processados. Essa reação de glicação é responsável pela formação de pigmentos escuros e pelo desenvolvimento de sabores e aromas complexos em diversos alimentos, como o dourado da crosta do pão ou a cor e sabor característicos da carne grelhada (16).

A reação de Maillard, também conhecida como reação de glicação não enzimática, inicia-se com a fase de glicação. Durante este estágio, um grupo carbonila de um açúcar redutor (como a glicose) combina-se com um grupo amina presente em aminoácidos ou proteínas, resultando em uma base de Schiff instável e reversível. Este composto então sofre um rearranjo estrutural, dando origem a um produto intermediário mais estável denominado produto de Amadori. O produto de Amadori é caracterizado pela ligação covalente entre o açúcar e a proteína, sendo a hemoglobina glicada um exemplo conhecido deste tipo de produto. Posteriormente, em uma etapa conhecida como etapa de rearranjo e degradação, os produtos de Amadori podem sofrer diversas reações químicas, como oxidação, desidratação e polimerização, levando à formação dos AGEs (Figura 2) (17, 18). Em síntese, a reação de Maillard constitui um processo químico intrincado que engloba a glicação de proteínas e aminoácidos por açúcares redutores, resultando na formação de produtos intermediários de Amadori e, posteriormente, nos AGEs.

Uma rota alternativa para a formação de AGEs é a via do estresse carbonílico. Neste processo, lipídeos e carboidratos passam por oxidação, gerando compostos que podem ser classificados como produtos finais de lipoxidação (ALEs) ou produtos finais de glicoxidação avançada, dependendo da natureza dos substratos envolvidos. Este mecanismo inicia-se com a síntese de compostos dicarbonílicos ou aldeídos altamente reativos, tais como metilglioxal (MG) e glioxal. Estas moléculas reativas interagem com aminoácidos, promovendo a formação adicional de AGEs. É a ligação covalente entre as estruturas dicarbonílicas e os aminoácidos que facilita a geração de AGEs nesta via de estresse carbonílico. (19).

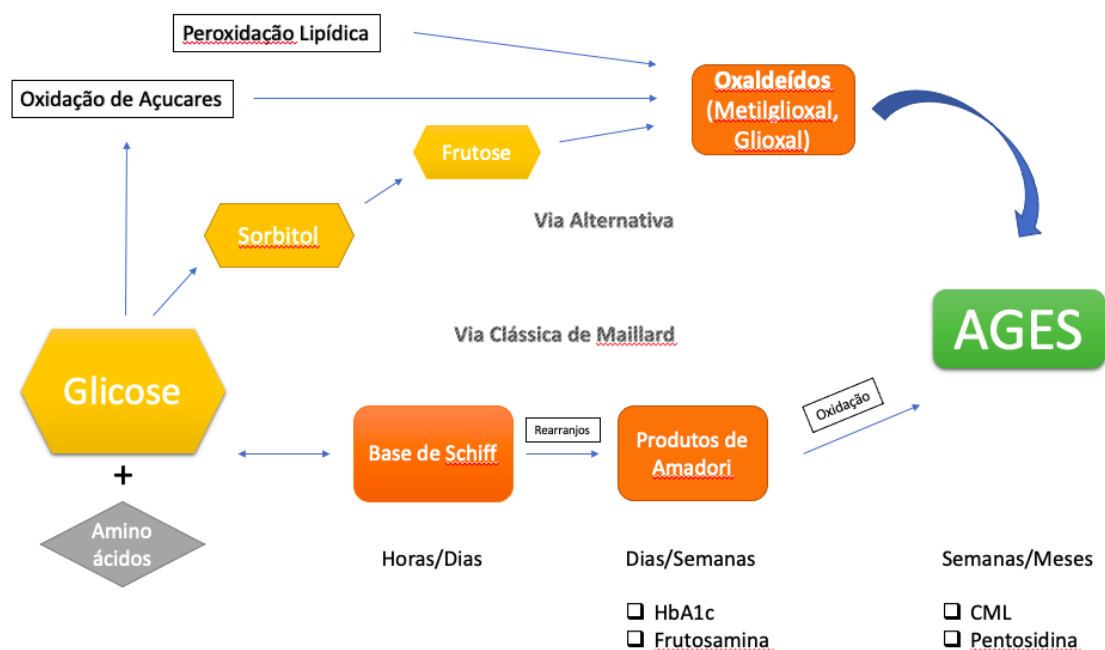


Figura 2. Vias de formação de AGEs e ALEs. Adaptado de Luevano-Contreras, 2010 (20).

Posteriormente, constatou-se que o fenômeno da glicação ocorre de maneira contínua no organismo humano, acumulando-se de maneira lenta e progressiva durante o processo de envelhecimento. Entretanto, a incidência de condições como diabetes mellitus (DM) e DRC pode precipitar uma formação e acúmulo mais rápidos de AGEs. No contexto do DM, essa aceleração ocorre primordialmente devido à exposição prolongada a altos níveis de glicose. Já em situações de uremia, a aceleração se deve majoritariamente à diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), sendo também potencializada pelo incremento na síntese de AGEs (13, 21, 22). Além da hemoglobina glicada, outras substâncias, como a pentosidina e a carboximetil-lisina, representam exemplos de AGEs que têm sido extensivamente investigados. A pentosidina tem origem na glicose, enquanto a carboximetil-lisina é originada a partir do açúcar metilglioxal. Estas moléculas são frequentemente utilizadas como biomarcadores para avaliar a presença e o acúmulo de AGEs em tecidos e fluidos biológicos (13, 23).

Estudos têm demonstrado que a pentosidina (PEN) e a carboximetil-lisina (CML) estão associadas a várias condições patológicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e doença renal crônica. Por exemplo, níveis elevados de pentosidina foram encontrados em ossos de pacientes em diálise, indicando uma relação entre a

acumulação de AGEs e a saúde óssea comprometida (24). Essas moléculas de AGEs se acumulam com a progressão da DRC e ativam sinais intracelulares por meio de receptores inespecíficos, específicos de AGEs (RAGEs) e mecanismos não mediados por receptores, levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas inflamatórias (15, 25).

Receptores dos AGEs

O sistema de receptores específicos para AGEs é intrincado e desempenha um papel fundamental na modulação das respostas inflamatórias e antioxidantes associadas aos AGEs. O receptor oligossacaril transferase-48 (AGER1) tem uma função proeminente na identificação e detoxificação dos AGEs, diminuindo suas concentrações tanto em ambientes intracelulares quanto extracelulares. Esta ação proporciona propriedades antioxidantes significativas e confere proteção contra os danos celulares induzidos pelos AGEs. Em contraste, o receptor RAGE, um receptor transmembranar presente na superfície celular e membro da família das imunoglobulinas, potencializa os sinais inflamatórios iniciados pelos AGEs, através de múltiplos mecanismos.

Em condições fisiológicas normais, a expressão do receptor RAGE é restrita em diversos tipos de células, incluindo células musculares lisas, células endoteliais, osteoclastos, osteoblastos e células paratireoideanas (13, 26-28). No entanto, em cenários patológicos específicos, como diabetes mellitus, doenças autoimunes e estados inflamatórios, nota-se um aumento significativo na expressão do RAGE, acompanhado de uma diminuição nos níveis de AGER1. Esse desequilíbrio resulta na supressão dos mecanismos antioxidantes de defesa, favorecendo a promoção de processos pró-oxidativos, o que facilita a progressão dessas enfermidades (29).

A interação entre os AGEs e o receptor RAGE potencializa as respostas inflamatórias na DRC ao estimular vias de sinalização, incluindo a via do fator nuclear- κ B (NF- κ B). Este estímulo eleva a produção de citocinas inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (13, 29). Este processo pode afetar negativamente as funções dos osteoblastos, comprometendo assim a homeostase óssea na DRC. Por outro lado, estudos sugerem que a inibição do receptor RAGE pode prevenir a ativação do NF- κ B, delineando uma possível estratégia terapêutica para o futuro (13). Ao intervir nesta via de sinalização

inflamatória, a inibição do RAGE pode ajudar a mitigar as respostas inflamatórias intensificadas associadas à DRC.

Degradação e remoção dos AGEs

É crucial destacar que os AGEs podem ser eliminados do organismo através de vias enzimáticas, como pela ação da glioxalase, e por mecanismos de defesa inata. A glioxalase é uma enzima que tem a capacidade de metabolizar e eliminar os AGEs do corpo, facilitando a diminuição de suas concentrações. Concomitantemente, mecanismos de defesa inata, como as lisozimas, têm um papel significativo na captura de AGEs, promovendo sua excreção acelerada pelos rins (13). Esses mecanismos trabalham em conjunto para mitigar os efeitos nocivos dos AGEs no organismo.

Marcadores do metabolismo ósseo e efeito dos AGEs no tecido ósseo

A remodelação óssea constitui um processo dinâmico, ocorrendo ao longo da vida de uma pessoa e abrangendo todas as regiões do esqueleto. Este processo, fundamental para substituir tecido ósseo antigo por novo, é coordenado meticulosamente por influências locais e hormonais, envolvendo células especializadas na reabsorção (osteoclastos) e formação óssea (osteoblastos). Qualquer desequilíbrio neste processo de reabsorção e formação pode culminar em perda significativa de massa óssea, com consequências sérias, como o risco elevado de fraturas (30, 31).

Indivíduos com DRC apresentam um risco particularmente elevado de desenvolver distúrbio mineral e ósseo. Essa condição é precipitada por desequilíbrios nos sistemas hormonais e locais que regulam a homeostase de cálcio e fósforo, ocasionando alterações na mineralização e propiciando calcificação vascular. Tais fatores são cruciais na fisiopatologia do DMO-DRC e já podem ser observados desde as fases iniciais da DRC (32).

Novas técnicas e marcadores estão sendo desenvolvidos com o objetivo de aprofundar a compreensão da regulação dos processos de remodelação e mineralização óssea. Além das análises histomorfométricas tradicionais e dos testes padrão, como a mensuração dos níveis de PTH e fosfatase alcalina, essas estratégias inovadoras aspiram fornecer uma perspectiva mais abrangente sobre a dinâmica e o estado atual do metabolismo ósseo. Tais estudos destacam a importância dos osteócitos, que funcionam

como mediadores centrais na coordenação das atividades entre os osteoblastos e osteoclastos (33).

Marcadores não convencionais do metabolismo ósseo, como FGF-23, ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK-L), fosfatase ácida resistente ao tartarato 5b (Trap 5b), osteoprotegerina, esclerostina e *Dickkopf-related protein 1* (DKK1) podem ser dosados no sangue e no tecido ósseo, tornando-se cada vez mais relevantes para a avaliação do estado do metabolismo ósseo em pacientes com doenças ósseas, incluindo a DRC. O FGF-23 é um hormônio que desempenha um papel crucial no controle do metabolismo do fósforo, influenciando a homeostase óssea (34-36). Osteócitos e osteoblastos secretam o FGF-23 no osso, e estudos mostraram que a superexpressão ou supressão do FGF-23 está associada a defeitos na mineralização (37, 38). RANK-L é uma molécula importante no processo de reabsorção óssea, atuando como um mediador chave no desenvolvimento da osteoporose (39-41). Trap 5b é uma enzima específica dos osteoclastos e é um marcador de reabsorção óssea. Osteoprotegerina, também conhecida como fator inibidor da osteoclastogênese, é expressa pelos osteoblastos e desempenha um papel central na regulação da massa óssea (42). Por fim, a esclerostina e a DKK1 são inibidores da via Wnt/ β -catenina e são considerados reguladores negativos da massa óssea. A esclerostina é produzida principalmente pelos osteócitos, enquanto a DKK1 é produzida principalmente pelos osteoblastos (43, 44). Esses marcadores, quando mensurados, podem fornecer informações valiosas sobre a atividade osteoblástica e osteoclástica, bem como sobre o desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, auxiliando no diagnóstico e monitoramento de doenças ósseas. Existem poucas informações disponíveis sobre a relação entre o acúmulo de AGEs e a expressão desses marcadores na DRC.

Além das proteínas e hormônios, a expressão e regulação de genes ósseos são processos complexos, e há escassez de estudos científicos sobre a relação entre AGEs e genes ósseos em pacientes com DRC (45-49), ressaltando a necessidade de mais pesquisas nessa área. Através de técnicas como reação em cadeia da polimerase em tempo real (rt-PCR), é possível analisar a expressão desses genes em amostras de tecido ósseo de pacientes com DRC e investigar a associação entre o acúmulo de AGEs e possíveis alterações na expressão dos genes envolvidos no metabolismo ósseo. Os genes específicos como SOST, DKK, β -catenina, FGF-23, Osterix, p53, RANK, RANK-L,

OPG, BGLAP e colágeno 1 desempenham papéis cruciais na regulação da formação e remodelação óssea. Ao analisar a expressão desses genes, é possível identificar desequilíbrios no metabolismo ósseo que podem levar ao desenvolvimento de doenças ósseas, como osteoporose, osteopenia e outras condições relacionadas.

No nível celular, os AGEs estão relacionados à diminuição da diferenciação e proliferação de osteoblastos, osteoclastos e à apoptose de células-tronco mesenquimais (50, 51). Os AGEs também afetam a produção de proteínas da matriz e levam a alterações estruturais do colágeno, através de ligações cruzadas (do inglês, *cross-linking*) (52). Alguns estudos clínicos identificaram uma ligação entre AGEs, osteoporose e fraturas ósseas (53-55).

A formação de AGEs no organismo é um processo bioquímico contínuo, inevitável e especialmente proeminente em tecidos com baixas taxas de renovação celular, onde o acúmulo de AGEs pode levar a danos estruturais e funcionais (13, 21). Deste modo, proteínas com tempo de meia-vida elevada, como o colágeno, tem maiores chances de serem glicadas. A formação e estabilização do tecido ósseo são processos complexos que implicam a interação de diversas células, minerais e matrizes proteicas, sendo o colágeno tipo I um dos componentes proteicos fundamentais da matriz óssea. As fibras de colágeno são estruturadas através da ligação entre moléculas individuais de colágeno, e essa estrutura é reforçada por ligações cruzadas, também conhecidas como *crosslinks*. Estas podem ser de natureza enzimática, catalisadas por enzimas específicas como a lisina hidroxilase e lisil-oxidase, ocorrendo em locais geneticamente predefinidos ao longo das cadeias de colágeno (56-58). Essas ligações enzimáticas aumentam a rigidez e a resistência do tecido ósseo, tornando-o mais robusto e menos suscetível a fraturas (59, 60). Por outro lado, *crosslink* não-enzimático de colágeno ocorre como um processo de glicação constante. Neste processo, açúcares circulantes no organismo reagem diretamente com os aminoácidos do colágeno, formando ligações estáveis, mas não enzimáticas. Pentosidina e carboximetil-lisina são AGEs bem reconhecidos que possuem resíduos de lisina e arginina. Estes aminoácidos, também presentes nas fibras colágenas do tecido ósseo, acabam sendo utilizados como substâncias precursoras da formação dos AGEs (61). Portanto, ao contrário da formação de *crosslink* enzimático, o *crosslink* não enzimático pelos AGEs prejudica a resistência óssea.

No entanto, as evidências dos efeitos dos AGEs na DRC são escassas e os mecanismos subjacentes não estão completamente compreendidos. Em um modelo animal de osteodistrofia renal induzida por adenina, Aoki et al. observaram um maior acúmulo de AGEs em osteoblastos peritrabeculares e supressão da expressão do fator de transcrição relacionado ao *runx 2* (RUNX2), fosfatase alcalina, fosfoproteína secretada-1 e níveis de mRNA da lisil oxidase em comparação com animais normais. Os autores sugerem que essas descobertas representam a supressão da diferenciação e função dos osteoblastos (14).

Chen et al. testaram os efeitos do fármaco ALT-711, redutor de AGEs, na aorta e nos ossos de um modelo animal. Eles observaram uma redução no conteúdo de AGEs ósseos, mas sem melhora na mecânica óssea (15). Em seres humanos, Mitome et al. observaram a presença significativa de pentosidina nos ossos de pacientes em diálise. A concentração de pentosidina estava inversamente relacionada à taxa de formação óssea e taxa de aposição mineral (BFR/BV e MAR) (24).

Em conjunto, esses estudos revelam a necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os efeitos dos AGEs no metabolismo ósseo, a fim de gerar novas hipóteses para compreender melhor sua contribuição para a fisiopatologia da DMO-DRC. Por esse motivo, realizamos uma ampla avaliação do impacto dos AGEs nos ossos de pacientes com DRC em diferentes estágios e tratamentos. Nossa hipótese de trabalho é que a DRC esteja associada ao acúmulo de AGEs, o que por sua vez resulta na disfunção do metabolismo ósseo, expressa por alterações morfológicas ósseas, redução da síntese proteica e alterações na expressão gênica.

2. OBJETIVOS

Nosso objetivo principal foi identificar e quantificar o acúmulo de AGEs e RAGEs nos ossos, além dos AGEs no sangue (níveis de pentosidina sérica, carboximetil-lisina e hemoglobina glicada) e na pele, para então estudar as relações entre o acúmulo de AGEs, histologia óssea, expressão de proteínas e genes, e marcadores séricos do metabolismo ósseo.

3. METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo e população

O presente estudo é de natureza clínica, transversal, envolvendo 86 pacientes com diferentes estágios de DRC, durante o período de fevereiro de 2016 a novembro de 2017. Os participantes foram recrutados no Centro Integrado de Nefrologia (CIN) do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e no HC da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Paulista (FMB-UNESP). A coorte de pacientes foi subdividida em três grupos: DRC 3-5, em tratamento conservador sem indicação clínica para diálise (N = 26), hemodiálise (HD, N = 32) e diálise peritoneal (DP, N = 28) (Figura 3). A seleção dos participantes foi realizada de forma sequencial e por conveniência, em estrita conformidade com os critérios de inclusão e exclusão definidos para o estudo. Importante ressaltar que nenhum dos pacientes havia participado de estudos prévios, e todos os procedimentos foram conduzidos conforme o protocolo de pesquisa estabelecido para este estudo.

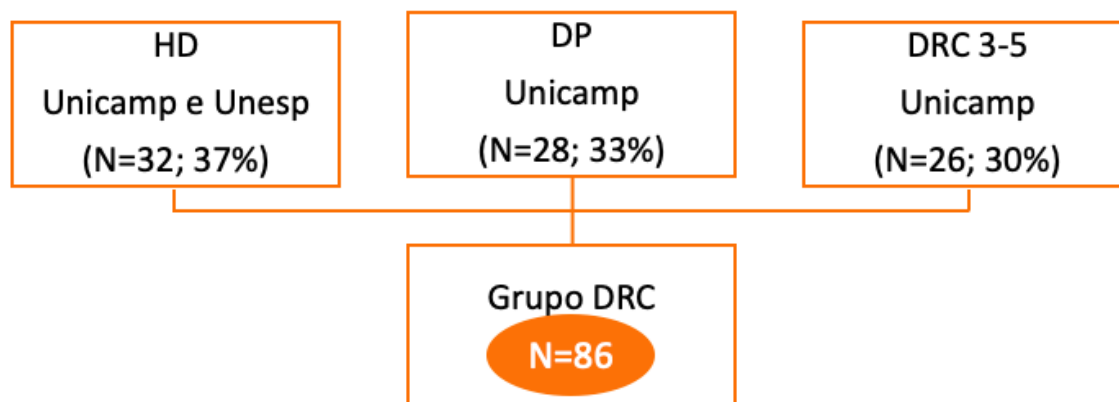


Figura 3. Desenho do estudo. Subdivisão da coorte de pacientes com DRC.

Os critérios de inclusão abrangeram: idade superior a 18 anos, diagnóstico de doença renal crônica (DRC) nos estágios 3-5D, de acordo com o sistema de classificação *Kidney Disease Outcomes Quality* (KDIGO) (62) e, especificamente para pacientes em terapia renal substitutiva, a necessidade de estar sob o mesmo tratamento (HD ou DP) por pelo menos 3 meses. A estimativa da taxa de filtração glomerular foi realizada mediante a utilização da equação CKD-EPI (63). No grupo HD, os pacientes estavam em tratamento crônico, com sessões realizadas três vezes por semana, com duração de 4 horas cada sessão, empregando dialisadores de alto fluxo e alta eficiência.

Os pacientes do grupo DP foram distribuídos entre DP automatizada (n = 18) e DP ambulatorial contínua (n = 10).

Os critérios de exclusão abrangeram: histórico anterior de paratireoidectomia, hiperparatireoidismo primário, doença inflamatória crônica, transplante de órgãos sólidos, evento cardiovascular agudo nos 3 meses anteriores à triagem para inclusão, comprometimento cognitivo, câncer, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e instabilidade clínica. No subgrupo de DRC 3-5 sem diálise, doze (46%) pacientes foram classificados como estágio 3 da DRC, onze (42%) como estágio 4 e três (12%) como estágio 5 sem diálise.

O estudo recebeu a aprovação do comitê de ética da UNICAMP por meio da Plataforma Brasil (CAAE: 38108314.6.0000.5404, 45943115.9.0000.5404 e 45777015.5.0000.5404) (Anexo 1), e todas as atividades clínicas e de pesquisa foram conduzidas em conformidade com a Declaração de Helsinki. O consentimento livre e esclarecido por escrito foi obtido de todos os participantes (Anexo 2).

3.2 Dados clínicos e demográficos

Informações clínicas e características demográficas foram adquiridas através de consultas clínicas e análise de registros médicos. Isso abrangeu detalhes como faixa etária, sexo, etnicidade, classificação do fototipo cutâneo, causas da DRC, antecedentes de consumo de tabaco, condições concomitantes, medicamentos prescritos e ocorrências cardiovasculares anteriores, incluindo condições como insuficiência arterial periférica, evento cerebrovascular, angina e infarto do miocárdio (IM). Para os participantes nos grupos HD e DP, também anotamos informações sobre a diurese restante (quantificada em mililitros diários), duração da terapia de diálise (em termos mensais), média de ultrafiltração (UF) por sessão (em litros), Kt/V, e o meio de acesso vascular utilizado (como cateter de curta duração, cateter tunelizado de longo prazo ou fístula arteriovenosa).

3.3 Mensuração de AGEs por autofluorescência da pele (AGE-sAF)

A análise dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) depositados na pele foi realizada de maneira indireta, medindo a autofluorescência cutânea (sAF) na área do antebraço. Esta mensuração foi feita com o aparelho AGE-ReaderTM (DiagnOptics, Groningen, Holanda), como demonstrado na Figura 4.



Figura 4. Figura ilustrativa da aferição de AGEs com o AGE-Reader™

O AGE-Reader™ é um dispositivo de espectroscopia por fluorescência. O equipamento emite luz ultravioleta de baixa energia em determinada área tecidual de interesse, sendo neste estudo, pele; as moléculas de AGE aí presentes absorvem parte dessa luz e, em contrapartida, emitem fluorescência em um determinado comprimento de onda. Através de um sistema óptico e um detector de fotodiodo sensível, o dispositivo mede a intensidade da luz de fluorescência emitida. Com base nessa intensidade, o AGE-Reader™ calcula um valor denominado *Skin Autofluorescence* (sAF), que indica a quantidade de AGEs armazenados nos tecidos e sua possível relação com doenças crônicas. A quantificação do acúmulo de AGEs é representada em unidades arbitrárias (UA). Áreas de pele com características ópticas ou de fluorescência alteradas e, portanto, com potencial de afetar a precisão da medição dos AGEs, como por exemplo a área do acesso vascular para HD, regiões da pele com manchas, verrugas ou tatuagens, foram intencionalmente evitadas. De acordo com informações fornecidas pelo fabricante, o AGE-Reader™ e seu *software* foram validados em pacientes com índice de reflexão de pele acima de 6% (Fitzpatrick classe de I a IV). Foram realizadas três leituras consecutivas e a média dessas mensurações foi o valor considerado para as análises estatísticas (64).

3.4 Determinação dos níveis de AGE no soro

A quantificação da hemoglobina glicada foi realizada por meio de um procedimento automatizado em laboratório, seguindo as diretrizes estabelecidas pelo centro de bioquímica do HC-UNICAMP (Equipamento Modular IIPR, Roche Diagnostics, Basel, Suíça). Os níveis séricos de pentosidina e N-carboximetil lisina foram quantificados seguindo as instruções do fabricante, utilizando ensaios

imunoenzimáticos (ELISA). Para a determinação da pentosidina, foi utilizado um kit fornecido pela Cusabio Biotech Co. Ltd., enquanto para a N-carboximetil lisina, foi utilizado um kit fornecido pela Blue Gene Biotech Co. Os intervalos de detecção dos kits utilizados para a análise da pentosidina e da N-carboximetil lisina foram, respectivamente, 25–2000 pmol/mL e 5–100 ng/mL.

3.5 Análise bioquímica

A quantificação dos níveis de paratormônio intacto (PTHi) no soro (faixa padrão: 15–65 pg/mL) foi realizada utilizando técnica de quimioluminescência (Equipamento Liaison N-tact PTH CLIAR, Diasorin, Stillwater, EUA). Já os níveis de 25-hidroxivitamina D (intervalo padrão: 30–100 ng/dL) foram determinados através de eletroquimioluminescência, enquanto a fosfatase alcalina (faixa padrão: 30–120 UI/L) foi quantificada usando método cinético colorimétrico (Aparelho Beckman Coulter OSR6104, Califórnia, EUA). As análises séricas de elementos como ureia, creatinina, potássio, sódio, fosfato, cálcio, ácido úrico, glicemia de jejum, colesterol total e subdivisões, triglicérides e albumina, juntamente com a hematimetria (incluindo hemoglobina e hematócrito), seguiram procedimentos automatizados convencionais do setor de bioquímica do Laboratório de Patologia Clínica do HC/UNICAMP (Sistema Modular IIPR, Roche Diagnostics, Basel, Suíça). A fosfatase ácida resistente ao tartarato 5b (TRACP-5b; intervalo padrão: 1,2–6,7 U/L) foi dosada usando um kit ELISA (Kit MicroVue, Quidel, Santa Clara, CA, EUA), enquanto a esclerostina foi determinada pelo teste Teco Sclerostin EIA (TecoMedical Group, Sissach, Suíça; faixa padrão: 0,2–0,6 ng/mL). O fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), a proteína 1 associada a Dickkopf (DKK1) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL) foram avaliados usando um kit de teste multiplex específico (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Para a análise, as amostras de plasma foram processadas utilizando o kit Milliplex Human Bone Magnetic Bead Panel (EMD Millipore Corp., Massachusetts, EUA), seguindo diretrizes do fabricante. A coleta de sangue foi organizada para datas específicas para pacientes dos grupos DRC 3–5 e DP e logo antes da segunda sessão semanal para aqueles em hemodiálise.

3.6 Biópsia Óssea

Amostras de biópsia óssea foram obtidas da crista ilíaca dos participantes, em ambiente ambulatorial, utilizando-se uma trefina com diâmetro de 7 mm, adaptada a

uma furadeira elétrica (De Walt™ e Rochester bone trephine™, EUA). Para avaliar a mineralização óssea, foram administrados dois ciclos de tetraciclina por 3 dias consecutivos (20 mg/kg/dia), seguidos de um intervalo de 10 dias. A coleta ocorreu entre o 3º e o 5º dia após a última dose do medicamento. Os indivíduos foram anestesiados localmente e sedados antes da obtenção do fragmento ósseo, através de uma pequena incisão. O fragmento foi considerado adequado quando continha osso trabecular e ambas as corticais.

Depois de extraído, o fragmento ósseo foi dividido em três seções: a primeira destinada à análise de histomorfometria, a segunda para imunohistoquímica, e a terceira seção foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80 °C, aguardando processamento, quantificação proteica e estudo da expressão gênica (Figura 5).

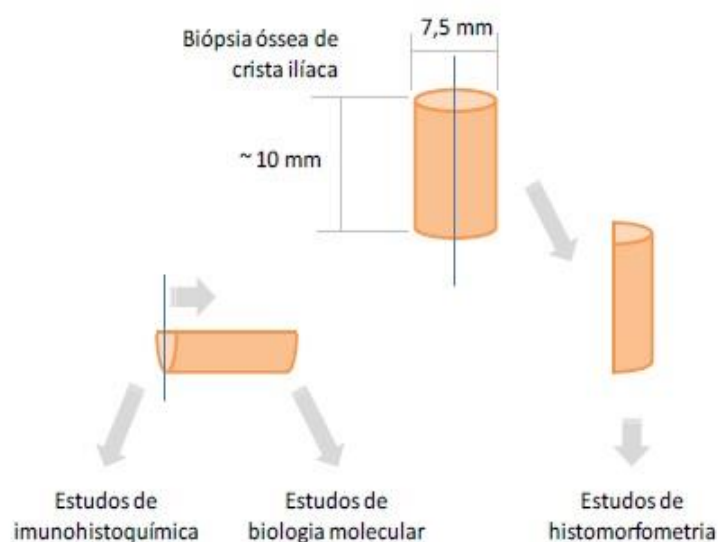


Figura 5 - Esquema da divisão do fragmento obtido por biópsia óssea de crista ilíaca.

Para misturar uniformemente o fragmento ósseo, utilizaram-se tubos com esferas metálicas de 2,8 mm de diâmetro (OMNI International, Kennesaw, USA). O processo de homogeneização envolveu três ciclos de agitação, com cada ciclo durando 60 segundos. Depois da homogeneização, tanto a proteína total quanto o RNA foram obtidos do material processado. O reagente Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, USA) foi utilizado para esta finalidade, e o procedimento de extração seguiu as diretrizes estabelecidas pelo fabricante do reagente.

3.7 Imuno-histoquímica e quantificação do acúmulo de expressão de AGEs e RAGEs no tecido ósseo

A quantificação imuno-histoquímica do acúmulo de expressão de AGEs e RAGEs no tecido ósseo foi realizada por meio da adaptação de um método previamente relatado por Gomes (65). Em resumo, duas seções de 5 µm de tecido ósseo foram colocadas lado a lado em cada lâmina. Os cortes ósseos foram submetidos a um processo de remoção do metacrilato, imersos em uma solução de xilol e clorofórmio na proporção de 1:1 por um período de 30 minutos. Após isso, os fragmentos foram progressivamente reidratados em soluções à base de álcool, submetidos a um breve tratamento de descalcificação parcial com ácido acético a 1% por 10 minutos e, em seguida, lavados duas vezes com água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi inibida mediante a utilização de uma mistura contendo peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, com um tempo de exposição de 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram submetidos a duas lavagens com água para remoção dessa solução. As amostras foram incubadas com bloqueador de proteína (DakoCytomation, Califórnia, EUA) para bloquear ligações inespecíficas. As amostras foram mantidas em incubação com anticorpos primários policlonais de coelho anti-AGE (ab23722, Abcam, Cambridge, UK) na proporção de 1:5000 e anti-RAGE (16346-1-AP, Proteintech Group, Manchester, UK) na proporção de 1:200 durante a noite a 4°C em ambiente umidificado. Seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário e, posteriormente, as amostras foram expostas ao complexo avidina/biotina HRP. A revelação foi desenvolvida utilizando o kit Vector (DAB Substrate Kit, Vector Laboratories, Burlingame, EUA) na proporção de 1 gota de DAB para cada 1 mL de substrato. Após o procedimento, as amostras foram lavadas com água destilada e posteriormente tingidas com Hemalumbre de Mayer (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Os controles negativos foram conduzidos excluindo a aplicação do anticorpo primário. Para a análise, as imagens foram capturadas usando um fotomicroscópio Olympus BX53 (Olympus Corp., Tóquio, Japão) integrado a um computador e analisadas usando o programa Image-Pro Premier® (Media Cybernetics, Rockville, EUA). A extensão completa das regiões de tecido ósseo trabecular e cortical foi fotografada com ampliações finais de 100 e 400. Através do programa de computador, as áreas de interesse imunomarcadas para anti-AGEs e anti-RAGEs foram quantificadas automaticamente por meio da criação de uma macro capaz de identificar, em cada pixel da imagem, a tonalidade da cor marrom definida como representativa da imunomarcação positiva em relação ao

controle negativo. A imunopositividade foi expressa como uma porcentagem do total de áreas classificadas pelo programa de computador.

3.8 Quantificação de proteína óssea por multiplex

Os lisatos proteicos foram obtidos a partir de biópsias ósseas. Utilizou-se um kit de ensaio multiplex (Human Bone Magnetic Bead Panel, Milliplex, EMD Millipore Corp., Darmstadt, Alemanha) para quantificar os níveis de esclerostina, osteocalcina, DKK1 e FGF-23 no osso. Esse kit opera com base na tecnologia Luminex™ xMAP e foi aplicado seguindo as diretrizes fornecidas pelo fabricante. Essa tecnologia emprega microesferas contendo dois distintos corantes fluorescentes, o que possibilita diversas combinações de cores. Estas microesferas são conjugadas a anticorpos específicos, e quando a amostra de estudo é adicionada, os anticorpos captam seus antígenos alvo. Assim, torna-se possível detectar diversos antígenos simultaneamente. Posteriormente, são introduzidos anticorpos específicos conjugados a biotina, que também se ligam aos seus antígenos alvo, formando um complexo do tipo "sanduíche" (anticorpo-antígeno-anticorpo). Na fase subsequente, a estreptavidina conjugada com ficoeritrina (PE) é integrada à reação, vinculando-se ao anticorpo conjugado com biotina. Este imunocomplexo é então pronto para ser detectado por um leitor específico (Luminex 200™, Luminex Inc., Austin, EUA). Este dispositivo reconhece tanto as microesferas quanto os complexos antígeno-anticorpo vinculados a elas, medindo ainda a luminosidade emitida pela estreptavidina-PE. Cabe ressaltar a ausência de um padrão consolidado para normalizar a quantificação destas proteínas no tecido ósseo.

3.9 Expressão gênica

Depois de extrair o RNA total da amostra óssea com Trizol, o espectrofotômetro Nano-Drop 1000 (Thermo Scientific) foi empregado para medir a quantidade de RNA. Utilizando a transcriptase reversa Improm-II Reverse Transcriptase (Promega Corp., Madison, WI, EUA), o cDNA foi sintetizado a partir do RNA total. Este processo foi realizado em um termociclador DNA Engine (MJ Research, Massachusetts, EUA). Avaliamos a expressão gênica a partir do cDNA por meio da técnica PCR quantitativo com o corante SYBR Green (Rotor-Gene SYBR Green PCR kit, Qiagen, Hilden, Alemanha). Os ensaios ocorreram no termociclador Rotor-Gene Q, também fornecido pela Qiagen. Examinamos os genes listados a seguir, indicando suas respectivas sequências de referência entre parênteses: SOST (AF_331844.1), RANKL

(NM_003701.3), OPG (U94332), beta-catenina (X_87838.1), FGF-23 (NM_020638.2), p53 (NM_001276760), DKK (NM_012242.4), Osterix (AF477981), ALP-1 (J04948.1), colágeno 1 (D21337.1), BGLAP (NM_199173) e o gene de referência proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase [GAPDH] (NM_002046.4). Os *primers* para cada gene foram projetados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA) (ver Material Suplementar, Tabela 1). Utilizamos o método $\Delta\Delta\text{Ct}$ para calcular a expressão gênica relativa. Os resultados são apresentados como um múltiplo da expressão em comparação com o valor do calibrador. Para comparações estatísticas entre grupos, usamos o software REST™ (*Relative Expression Software Tool*, Qiagen, Hilden, Alemanha).

3.10 Histomorfometria

A avaliação histomorfométrica foi feita por meio de um sistema semiautomatizado com o software OsteoMeasure™ (OsteoMetrics Inc., Decatur, GA, EUA). Os parâmetros histomorfométricos trabeculares analisados foram classificados em estáticos e dinâmicos. Os indicadores dinâmicos foram investigados com base na marcação de tetraciclina, observada sob um microscópio de luz ultravioleta. As denominações e abreviações desses parâmetros seguiram as diretrizes estabelecidas pela *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR) (66). Para os parâmetros estáticos, recorreu-se aos valores padrão descritos em um estudo nacional (67) (Material Suplementar, Tabela 2); Os parâmetros dinâmicos tiveram como referência dados presentes em literatura especializada internacional (68) (Material Suplementar, Tabela 3).

Utilizou-se o sistema OsteoMeasure™ (OsteoMetrics Inc., Decatur, GA, EUA) em ampliação de 50x para avaliar a espessura cortical (Ct.Th, μm) e a porosidade cortical (Ct.Po, %). A Ct.Po refere-se à proporção da área de porosidade cortical em relação à área total da cortical. A nomenclatura seguiu as diretrizes da *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR) (66). A espessura cortical (Ct.Th) foi classificada em baixa (menos de 520 μm), normal (entre 520 e 1650 μm) ou alta (mais de 1650 μm). Quanto à porosidade cortical (Ct.Po), foi categorizada em baixa (abaixo de 1,9%), normal (de 1,9 a 10%) ou alta (superior a 10%), conforme critérios estabelecidos (69).

3.11 Análise Estatística

Apresentamos as variáveis contínuas como média $\pm$ desvio padrão (SD) ou medianas e intervalos interquartis, a depender da distribuição dos dados. Relatamos as variáveis categóricas através de frequências e porcentagens. Utilizamos o teste *t* de Student, o teste de Mann-Whitney e o teste qui-quadrado para comparar variáveis contínuas, dados assimétricos e variáveis categóricas, respectivamente. Para detectar associações entre o acúmulo de AGEs e as alterações no metabolismo ósseo, o valor mediano dos parâmetros de acúmulo de AGEs (hemoglobina glicada, lisina N-carboximetilada, PEN, SAF e acúmulo/expressão de AGEs/RAGEs no osso) foi utilizado para fins de comparação. Utilizamos o teste do coeficiente de correlação de Spearman para determinar a significância da correlação entre variáveis não contínuas. Realizamos as análises estatísticas através do programa SPSS 22.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). Consideramos o valor de *p* bilateral $<0,05$ como estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESEARCH ARTICLE



Advanced Glycation End Products and Bone Metabolism in Patients with Chronic Kidney Disease

Kélcia R. S. Quadros,^{1,2} Noemi A. V. Roza,^{1,2} Renata A. França,² André B. A. Esteves,² Joaquim Barreto,² Wagner V. Dominguez,³ Luzia N. S. Furukawa,³ Jacqueline Teixeira Caramori,⁴ Andrei C. Sposito,⁵ and Rodrigo Bueno de Oliveira^{1,2}

¹Nephrology Division, School of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil

²Laboratory for Evaluation of Mineral and Bone Disorders in Nephrology (LEMON), School of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil

³Laboratory of Renal Pathophysiology, LIM-16, Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴Department of Internal Medicine, Botucatu School of Medicine, UNESP, São Paulo, Brazil

⁵Laboratory of Atherosclerosis and Vascular Biology, Cardiology Division, School of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil

ABSTRACT

Advanced glycation end products (AGEs) accumulation may be involved in the progression of CKD-bone disorders. We sought to determine the relationship between AGEs measured in the blood, skin, and bone with histomorphometry parameters, bone protein, gene expression, and serum biomarkers of bone metabolism in patients with CKD stages 3 to 5D patients. Serum levels of AGEs were estimated by pentosidine, glycated hemoglobin (A1c), and N-carboxymethyl lysine (CML). The accumulation of AGEs in the skin was estimated from skin autofluorescence (SAF). Bone AGEs accumulation and multiligand receptor for AGEs (RAGEs) expression were evaluated by immunohistochemistry; bone samples were used to evaluate protein and gene expression and histomorphometric analysis. Data are from 86 patients (age: 51 ± 13 years; 60 [70%] on dialysis). Median serum levels of pentosidine, CML, A1c, and SAF were 71.6 pmol/mL, 15.2 ng/mL, 5.4%, and 3.05 arbitrary units, respectively. AGEs covered 3.92% of trabecular bone and 5.42% of the cortical bone surface, whereas RAGEs were expressed in 0.7% and 0.83% of trabecular and cortical bone surfaces, respectively. AGEs accumulation in bone was inversely related to serum receptor activator of NF- κ B ligand/parathyroid hormone (PTH) ratio ($R = -0.25$; $p = 0.03$), and RAGE expression was negatively related to serum tartrate-resistant acid phosphatase-5b/PTH ($R = -0.31$; $p = 0.01$). Patients with higher AGEs accumulation presented decreased bone protein expression (sclerostin [1.96 (0.11–40.3) vs. 89.3 (2.88–401) ng/mg; $p = 0.004$]; Dickkopf-related protein 1 [0.064 (0.03–0.46) vs. 1.36 (0.39–5.87) ng/mg; $p = 0.0001$]; FGF-23 [1.07 (0.4–32.6) vs. 44.1 (6–162) ng/mg; $p = 0.01$]; and osteoprotegerin [0.16 (0.08–2.4) vs. 6.5 (1.1–23.7) ng/mg; $p = 0.001$]), upregulation of the p53 gene, and downregulation of Dickkopf-1 gene expression. Patients with high serum A1c levels presented greater cortical porosity and Mlt and reduced osteoblast surface/bone surface, eroded surface/bone surface, osteoclast surface/bone surface, mineral apposition rate, and adjusted area. Cortical thickness was negatively correlated with serum A1c ($R = -0.28$; $p = 0.02$) and pentosidine levels ($R = -0.27$; $p = 0.02$). AGEs accumulation in the bone of CKD patients was related to decreased bone protein expression, gene expression changes, and increased skeletal resistance to PTH; A1c and pentosidine levels were related to decreased cortical thickness; and A1c levels were related to increased cortical porosity and Mlt. © 2023 The Authors. *JBMR Plus* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of American Society for Bone and Mineral Research.

KEY WORDS: ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS; BONE METABOLISM; CHRONIC KIDNEY DISEASE

Introduction

Mineral and bone disorder (MBD) is a major complication of chronic kidney disease (CKD) and causes systemic effects, resulting in cardiovascular disease, bone fractures, and increased mortality.^(1–5)

MBD pathophysiology is related to the accumulation of many uremic toxins, such as phosphate and parathormone.^(6,7) Advanced glycation end products (AGEs) constitute one group of uremic toxins, whose effect on bone metabolism in CKD patients is poorly understood.^(8–10)

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Received in original form December 2, 2022; accepted January 13, 2023.

Address correspondence to: Rodrigo Bueno de Oliveira, MD, PhD, Nephrology Division, University of Campinas (Unicamp); Rua Tessália Vieira de Camargo 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13084-971, Campinas, São Paulo, Brazil. E-mail: rbo@unicamp.br

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

JBMR® Plus (WOA), Vol. 00, No. 00, Month 2023, e10727.

DOI: 10.1002/jbm4.10727

© 2023 The Authors. *JBMR Plus* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of American Society for Bone and Mineral Research.

AGEs represent a heterogeneous group of molecules, constituted by nonenzymatic glycation reactions reducing sugars, amino acids, lipids, or DNA. These AGEs molecules accumulate with the CKD progression and activate intracellular signals through nonspecific, specific receptors (RAGEs) and non-receptor-mediated mechanisms, leading to increased production of reactive oxygen species and inflammatory cytokines.^(10, 11)

At the cellular level, AGEs are related to the decreased differentiation and proliferation of osteoblasts, osteoclasts, and mesenchymal stem cell apoptosis. AGEs also affect matrix protein production and lead to collagen cross-linking activity alterations.^(12–14) Some studies have identified a link between AGEs, osteoporosis, and bone fractures in clinical settings.^(15–17)

However, evidence of the effects in CKD is scarce, and the underlying mechanisms are not fully understood. In a rat model of renal osteodystrophy induced by adenine, Aoki et al. observed a greater accumulation of AGEs in peritrabecular osteoblasts and suppressed expression of runt-related transcription factor 2 (RUNX2), alkaline phosphatase, secreted phosphoprotein-1, and lysyl oxidase mRNA levels than in normal animals. The authors suggest that these findings represent suppression of osteoblast differentiation and function.⁽⁹⁾ Chen et al. tested the effects of AGEs lowering drug ALT-711 in the aorta and bone. They observed bone AGEs content reduction without any improvement in bone mechanics.⁽¹⁹⁾ In humans, Mitome et al. observed a significant presence of pentosidine in bone from patients on dialysis. The pentosidine concentration was inversely related to the bone formation rate and volume.⁽¹⁸⁾

Together, these studies reveal the need to deepen knowledge of the effects of AGEs on bone metabolism to generate new hypotheses to better understand their contribution to the pathophysiology of CKD-MBD. For this reason, we performed an extensive examination of the impact of AGEs in bone from patients with CKD at different stages and treatments. Our working hypothesis is that CKD is associated with the accumulation of AGEs, which in turn results in the dysfunction of bone metabolism, expressed by bone morphological alterations, reduced protein synthesis, and changes in gene expression. Our primary aim was to identify and quantify the accumulation of AGEs and RAGEs in bone and AGEs in the blood (serum pentosidine, carboxymethyl lysine, and glycated hemoglobin levels) and skin and then study the relations between AGEs accumulation, bone histology, protein and gene expression, and serum markers of bone metabolism.

Material and Methods

Study design and patient selection

Eighty-six patients at different CKD stages were enrolled in this observational and double-center study from February 2016 to November 2017. Patients were recruited from the Nephrology Department's outpatient clinics at the Hospital de Clínicas of the State University of Campinas (UNICAMP) and São Paulo State University (UNESP) and divided into the following CKD subgroups: CKD stages 3–5 nondialysis on conservative management but still without a clinical indication for dialysis ($n = 26$), hemodialysis (HD, $n = 32$), and peritoneal dialysis (PD, $n = 28$). Patients were selected for convenience, sequentially, and according to the established inclusion and exclusion criteria. They were not part of another study, and all tests performed were part of the research protocol provided for this study.

The inclusion criteria were age over 18 years, in CKD stages 3 to 5D according to *Kidney Disease Outcomes Quality (KDIGO)*,⁽¹⁹⁾ and, specifically for patients under HD/PD, to be under these treatments for at least 3 months. The CKD-EPI equation estimated the glomerular filtration rate.⁽²⁰⁾ Patients in the HD subgroup were on chronic HD treatment three times weekly, 4 hours/session, using high-flux and high-efficiency polysulfone dialyzers. Patients in the PD subgroup were on automated PD ($n = 18$) or continuous ambulatory PD ($n = 10$).

Exclusion criteria were the presence of chronic inflammatory disease, primary hyperparathyroidism, kidney transplantation, acute cardiovascular event in the 3 months before screening for inclusion, cognitive impairment, cancer, HIV, and clinical instability; 12 (46%) patients in the CKD 3–5 nondialysis subgroup were classified as having CKD stage 3, 11 (42%) stage 4, and three (12%) stage 5 nondialysis. Written informed consent was obtained from all patients; the local ethics committee approved the study protocol under numbers CAAE 38108314.6.0000.5404-45943115.9.0000.5404-45777015.5.0000.54-04, and the clinical and research activities being reported are consistent with the Declaration of Helsinki.

Measurement of AGEs levels by skin autofluorescence (AGE-sAF)

AGE skin deposition was evaluated by SAF using the AGE-ReaderTM (DiagOptics BV, Groningen, the Netherlands). This device measures fluorescence emitted from the skin influenced by the deposition of AGEs, and it calculates the ratio between emitted and reflected excitation light. The measurements were in triplicate on the ventral side of the forearm. Areas with arterial-venous fistulas, scars, and tattoos were avoided. The mean values were used for all statistical analyses and AGEs levels in skin expressed as arbitrary units (AU).

Measurement of serum AGE levels

In accordance with the manufacturer's instructions, serum pentosidine and N-carboxymethyl lysine levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (pentosidine, kit provided by Cusabio Biotech Co. Ltd.; N-carboxymethyl lysine, kit supplied by Blue Gene Biotech Co.). The detection ranges of the pentosidine and N-carboxymethyl lysine kits were 25–2000 pmol/mL and 5–100 ng/mL, respectively.

Biochemical analysis

Serum intact parathyroid hormone (PTH) levels (reference range: 15–65 pg/mL) were measured using a chemiluminescence assay (Liaison N-tact PTH CLIA, Diasorin, Stillwater, USA). Serum 25-hydroxyvitamin D levels (reference range: 30–100 ng/dL) were measured using a chemiluminescence method. Alkaline phosphatase (reference range: 30–120 IU/L) was measured using a kinetic colorimetric test (Beckman Coulter OSR6104, California, USA). Serum calcium and phosphate levels and a general serum biochemistry profile were assayed by standard autoanalyzer techniques in an on-site biochemistry laboratory (Modular IPR system, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP-5b) levels were determined using an ELISA kit (MicroVue, Quidel, Santa Clara, CA, USA), normal range: 1.2–6.7 U/L; sclerostin was assessed by Tecro Sclerostin EIA Kit (enzyme-linked immunosorbent assay; Tecro Medical Group, Sisach, Switzerland, reference range: 0.2–0.6 ng/mL). Intact fibroblast growth factor 23 (FGF-23), Dickkopf-related protein 1 (DKK1), and

receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) were measured using a multiplex assay kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Plasma specimens were prepared for analysis utilizing a multiplex assay kit (Milliplex Human Bone Magnetic Bead Panel, EMD Millipore Corp., Massachusetts, USA) according to specific protocols provided by the company. Blood samples were collected on a previously scheduled date for patients in the CKD 3–5 nondialysis and PD groups. Blood samples of hemodialysis patients were collected immediately before the week's second session.

Bone biopsy

Bone biopsy samples were obtained from the right or left iliac crests through a trephine for bone biopsy (diameter = 7 mm), adapted to an electrical drill (dewalt™ and Rochester bone trephine™, USA). A double labeling tetracycline course for 3 days (20 mg/kg/d), with a 10-day interval, was used. The biopsy was performed 3–5 days after the last tetracycline dose. A bone fragment was divided into three parts for histomorphometry, immunohistochemistry, and molecular biology studies. The undecalcified bone fragments were submitted to histological processing and analysis. Bone histomorphometry was performed through a semiautomatic method (Osteomeasure™, Osteometrics, Atlanta, GA, USA). The static, dynamic, and structural histomorphometric indices were reported using international nomenclature.⁽²¹⁾

Immunohistochemistry and quantification of accumulation of AGEs and RAGEs expression

Immunohistochemical quantification of the accumulation of AGEs and RAGEs expression in bone was performed by adapting a method previously reported by Gomes.⁽²²⁾ In brief, two adjacent 5-μm sections of bone tissue were placed side by side on each slide. Bone sections were deacrylated in a 1:1 mixture of xylene and chloroform for 30 minutes, rehydrated in graded alcohol solutions, submitted to a quick semidecalcification with 1% acetic acid for 10 minutes, and rinsed twice with distilled water. Endogenous peroxidase activity was inhibited by a mixture of 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes, followed by two water washes. The samples were incubated with protein block (DakoCytomation, California, USA) to block nonspecific binding. Sections were incubated overnight at 4°C in a humidified chamber using the primary rabbit polyclonal antibodies anti-AGE (ab23722, Abcam, Cambridge, UK) (dilution 1:5000) and anti-RAGE (16346-1-AP, Proteintech Group, Manchester, UK) (dilution 1:200). After incubation with the secondary antibody, the slides were incubated with the avidin/biotin HRP complex. The revelation was developed with a Vector kit (DAB Substrate Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) (1 drop DAB + 1 mL of the substrate). The sections were rinsed in distilled water and counterstained with Mayer's hemalum solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Negative controls were performed by omitting the primary antibody. For analysis, the images were captured using an Olympus BX53 photomicroscope (Olympus Corp., Tokyo, Japan) integrated into a computer and analyzed using Image-Pro Premier® software (Media Cybernetics, Rockville, USA). The entire extent of the trabecular and cortical bone tissue regions were photographed with final magnifications of ×100 and ×400, and through the software, the areas of interest immunostained for anti-AGEs and anti-RAGEs were automatically quantified through the creation of a macro capable of

identifying in each pixel of the image the shade of the brown color defined as being representative of positive immunostaining, in relation to the negative control. The immunopositivity was expressed as a percentage of the total software-classified areas.

Quantification of bone protein by multiplex

Protein lysates were extracted from bone samples. The bone contents of sclerostin, osteocalcin, DKK1, and FGF-23 were measured with a multiplex assay kit (Human Bone Magnetic Bead Panel, Milliplex, EMD Millipore Corp., Darmstadt, Germany) based on Luminex™ xMAP technology according to the manufacturer's instructions.

Gene expression

After total RNA extraction from bone sample using trizol, a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) was used to determine the total RNA amount. cDNA was synthesized from total RNA by reverse transcriptase (Improm-II Reverse Transcriptase, Promega Corp., Madison, WI, USA) using a thermocycler (DNA Engine, MJ Research, Massachusetts, USA).

Gene expression was determined from the cDNA through quantitative PCR using SYBR Green (Rotor-Gene SYBR Green PCR kit, Qiagen, Hilden, Germany) and a Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen, Hilden, Germany). The genes analyzed were SOST (AF_331844.1), RANKL (NM_003701.3), OPG (U94332), β-catenin (X_87838.1), FGF-23 (NM_020638.2), p53 (NM_001276760), DKK (NM_012242.4), Osterix (AF477981), ALP-1 (J04948.1), collagen 1 (D21337.1), BGLAP (NM_199173), and the reference gene GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-NM_002046.4) with their respective primers designed from IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA). Gene expression was calculated by the ΔΔCt method of

Table 1. General Clinical and Biochemical Data

N = 86	
Age (years)	51 ± 13
Male (N, %)	48 (56)
Caucasian (N, %)	41 (48)
Etiology of chronic kidney disease (N, %)	
Hypertension	23 (27)
Chronic glomerulonephritis	16 (19)
Diabetes mellitus	9 (10)
Dialysis vintage (months)	21 (10–44)
Body mass index (kg/m ²)	26 ± 4.8
Hemoglobin (g/dL)	12.1 (11–13.6)
Albumin (g/dL)	3.7 (3.3–4.0)
Total calcium (mg/dL)	8.9 ± 0.8
Phosphate (mg/dL)	5 ± 1.6
25-vitamin D (ng/mL)	28.1 (20.8–34.5)
FGF-23 (ng/mL)	1570 (273–6499)
Sclerostin (ng/mL)	1.46 (0.94–2.19)
Alkaline phosphatase (IU/mL)	90 (71–112)
Parathormone (pg/mL)	228 (117–439)
RANKL (pg/mL)	0.19 (0.01–0.75)
TRACP-5b (U/L)	5.1 (3.3–7.7)

Abbreviations: FGF-23, fibroblast growth factor-23; RANKL, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; TRACP-5b, tartrate-resistant acid phosphatase 5b.

relative quantification. Values are expressed as a multiple (fold) of the expression compared to the value of the calibrator. The statistical analysis between groups was performed using REST™ software (Qiagen, Hilgen, Germany).

Statistical analysis

The continuous variables are reported as the mean $\pm$ SD or medians and interquartile intervals. Categorical data are

reported as frequencies and percentages. Comparisons between the continuous variables, skewed data, and categorical variables were performed using the Student's *t* test, the Mann-Whitney test, and the chi-square test. To detect associations between AGEs accumulation and changes in bone metabolism, the median value of AGEs accumulation parameters (glycated hemoglobin, N-carboxymethyl lysine, pentosidine, SAF, and AGEs/RAGEs accumulation/expression in bone) was used for the purpose of comparison. Spearman's coefficient test provided the

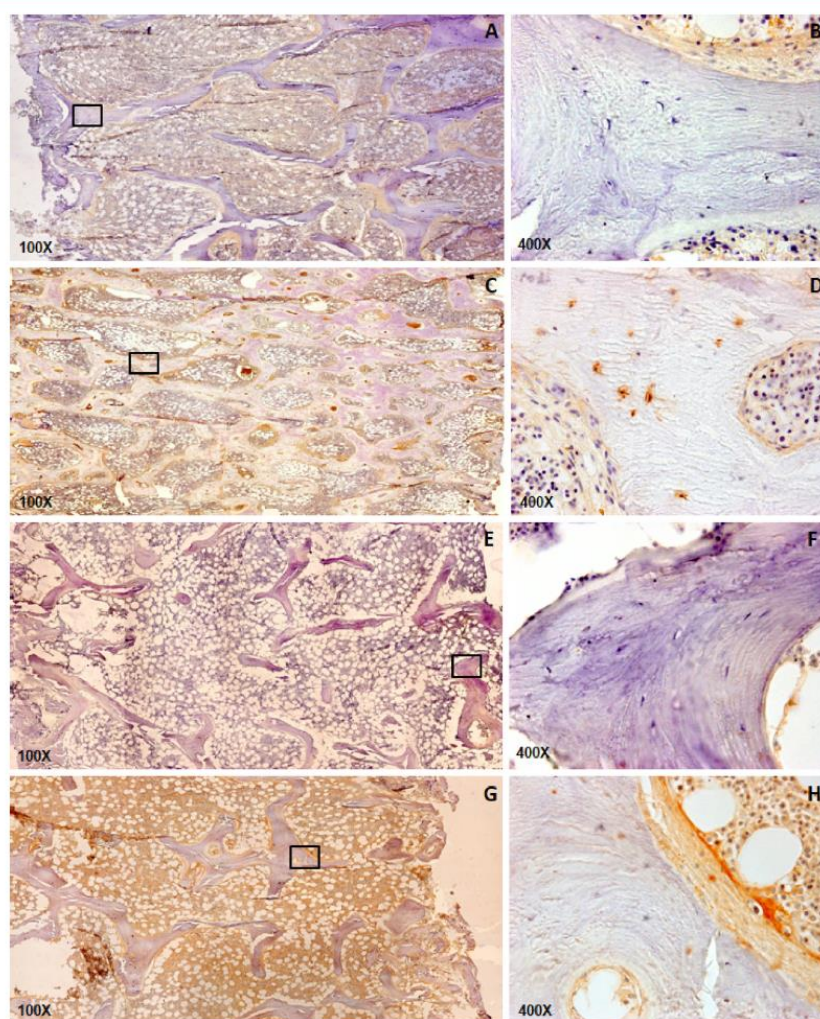


Fig. 1. Trabecular and cortical bone AGEs accumulation and RAGEs expression in patients with CKD (AGEs accumulation (A–D); RAGEs expression (E–H)).

significance of the correlation between noncontinuous variables. Statistical analyses were performed using SPSS 22.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). A two-sided p -value <0.05 was considered statistically significant.

Results

General findings and accumulation of AGEs in serum, skin, and bone

We considered data from 86 individuals for analysis; this was a population with a mean age of 51 ± 13 years; 48 (56%) were male, 41 (48%) were Caucasian, and 16 (19%) had type 2 diabetes. All participants had CKD; 32 (37%) were on HD, 28 (33%) were on PD, and 26 (30%) were on conservative management, displaying an estimated glomerular filtration rate of 26.9 (17.2 – 34.5) mL/min/ 1.73 m². The baseline characteristics of the study population are summarized in Table 1. Clinical, demographic, and biochemical findings of all CKD populations and subgroups are summarized in supplementary data (Table S1).

AGEs were detected in blood, skin, and bone in all patients. No correlation was found between measurements of AGEs in blood, skin, and bone.

In serum, the median levels of pentosidine, N-carboxymethyl lysine, and glycated hemoglobin were 71.6 (44.2 – 121.2) pmol/mL, 15.2 (9.7 – 32.4) ng/mL, and 5.4% (5 – 6.1%), respectively. In skin, the median value of SAF was 3.05 (2.5 – 3.4) AU and was positively correlated with age ($R = 0.55$; $p = 0.0001$) and dialysis vintage ($R = 0.30$; $p = 0.04$).

In bone, accumulation of AGEs and expression of RAGEs were detected in both trabecular and cortical surfaces in all patients. AGEs in trabecular and cortical bone covered 3.92% (1.6 – 15.3%) and 5.42% (3 – 12.1%) of its surface, respectively. RAGE

expression in trabecular and cortical bone covered 0.7% (0.13% – 2.88%) and 0.83% (0.2 – 2.3%) of its surface, respectively (Fig. 1A–H). Of note, AGEs accumulation seems to demonstrate affinity with osteocytes (Fig. 1, detail D).

AGEs in trabecular bone were positively correlated with AGEs in cortical bone ($R = 0.77$; $p = 0.0001$) and dialysis vintage ($R = 0.31$; $p = 0.03$) and negatively correlated with the serum RANKL/PTH ratio ($R = -0.25$; $p = 0.03$).

RAGEs expression in trabecular bone was positively correlated with RAGEs expression in cortical bone ($R = 0.76$; $p = 0.0001$), dialysis vintage ($R = 0.49$; $p = 0.03$), phosphate ($R = 0.26$; $p = 0.03$), and parathormone ($R = 0.40$; $p = 0.001$) and negatively correlated with serum glycated hemoglobin levels ($R = -0.26$; $p = 0.03$) and the TRACP-Sb/PTH ratio ($R = -0.31$; $p = 0.01$).

Serum and skin AGEs levels: associations with bone morphology and metabolism

Patients presenting high serum glycated hemoglobin levels displayed greater cortical porosity [1.9 (1.2 – 3.1) vs. 1.18 (0.47 – 2.22); $p = 0.02$], mineralization lag time [24.8 (18 – 54.2) vs. 19.1 (9.8 – 34.7); $p = 0.03$], reduced osteoblast surface/bone surface [1.7 (1 – 3.6) vs. 3.6 (1.4 – 6.7); $p = 0.04$], eroded surface/bone surface [2.4 (1.5 – 3.9) vs. 4.9 (3.2 – 7.9); $p = 0.0001$], osteoclast surface/bone surface [0.1 (0.04 – 0.18) vs. 0.29 (0.11 – 0.52); $p = 0.0001$], mineral apposition rate [0.59 (0.47 – 0.71) vs. 0.78 (0.48 – 0.98); $p = 0.02$] and adjusted apposition rate/bone area [0.26 (0.12 – 0.42) vs. 0.38 (0.25 – 0.68); $p = 0.009$]. Cortical thickness was negatively correlated with serum glycated hemoglobin ($R = -0.28$; $p = 0.02$) and with pentosidine levels ($R = -0.27$; $p = 0.02$). No differences were observed in bone parameters according to median levels of N-carboxymethyl lysine.

Table 2. Histomorphometric Bone Parameters According to Median AGEs Accumulation and RAGEs Expression in Trabecular Bone

	Accumulation of AGEs in trabecular bone (%)			RAGEs expression in trabecular bone (%)		
	<3.92	≥ 3.92	p	<0.707	≥ 0.707	p
BV/TV (%)	18.8 (16–28)	23.9 (19.3–29)	0.09	18.9 (15.4–24.4)	26.2 (19.2–30.7)	0.002
Tb.Th (μ m)	123 (104–145)	132 (118–147)	0.2	118 (107–136)	135 (125–154)	0.003
Tb.Sp (μ m)	478 (383–591)	430 (363–568)	0.22	531 (410–595)	398 (316–531)	0.016
Tb.N (mm/mm)	1.6 (1.4–1.9)	1.8 (1.38–2.1)	0.21	1.5 (1.4–1.9)	1.8 (1.5–2.1)	0.04
OV/BV (%)	1.75 (0.6–3.2)	1.15 (0.6–2.1)	0.2	1.19 (0.6–2.2)	1.42 (0.6–2.7)	0.54
O.Th (μ m)	7.2 (5.5–8.3)	6.3 (5.2–7.5)	0.16	6 (5.2–7.7)	6.9 (5.9–8.5)	0.12
OS/BS (%)	15.1 (6.7–23.6)	10.8 (7–19.7)	0.32	10.9 (6.6–20.8)	12.7 (7.0–23.1)	0.70
Ob.S/BS (%)	1.51 (1.05–4.38)	2.23 (1.36–6.5)	0.13	1.49 (0.97–3.31)	2.38 (1.38–6.31)	0.05
ES/BS (%)	3.06 (2.08–4.39)	4.03 (2.14–6.37)	0.23	2.83 (1.99–4.98)	3.73 (2.21–6.58)	0.22
Oc.S/BS (%)	0.16 (0.09–0.38)	0.10 (0–0.29)	0.053	0.1 (0.04–0.20)	0.21 (0.05–0.47)	0.06
MS/BS (%)	5.49 (3.81–10.56)	5.41 (2.97–10.09)	0.78	4.48 (2.00–9.06)	5.81 (3.96–11.8)	0.21
MAR (μ m/dia)	0.64 (0.48–0.92)	0.63 (0.47–0.74)	0.53	0.62 (0.47–0.72)	0.64 (0.48–0.94)	0.32
BFR/BS (μ m ³ /μ ² /d)	0.041 (0.019–0.092)	0.035 (0.025–0.558)	0.61	0.03 (0.015–0.054)	0.0492 (0.027–0.098)	0.08
Aj.Ar (μ m/d)	0.29 (0.13–0.63)	0.3 (0.22–0.55)	0.67	0.27 (0.14–0.52)	0.36 (0.2–0.57)	0.28
Mlt (d)	23.7 (11.5–54.3)	19.8 (12.1–35.2)	0.4	22.1 (13.2–45.3)	19.8 (10.8–47.6)	0.58
Fb.V/TV (%)	0.03 (0.01–0.14)	0.03 (0.006–0.13)	0.89	0.02 (0.003–0.05)	0.04 (0.11–0.29)	0.04
Ct.V/BV (μ m ³)	22.5 (13.1–28)	21.3 (17–26)	0.95	21.7 (12.2–28)	21.4 (16.1–25.8)	0.80
Ct.Th (μ m)	626 (423–782)	627 (499–729)	0.78	606 (416–723)	630 (514–779)	0.33
Ct. Po (%)	1.89 (1.1–2.8)	1.4 (0.7–2.7)	0.44	1.71 (1.03–2.83)	1.27 (0.77–2.55)	0.44

Abbreviations: Aj.Ar, adjusted area; BFR/BS, bone formation rate/bone surface; BV/TV, bone volume/tissue volume; Ct.Po, cortical porosity; Ct.Th, cortical thickness; Ct.V/BV, cortical volume/bone volume; ES/BS, eroded surface/bone surface; Fb.V/TV, fibrose volume/tissue volume; MAR, mineral apposition rate; Mlt, mineralization lag time; MS/BS, mineralized surface/bone surface; O.Th, osteoid thickness; Ob.S/BS, osteoblast surface/bone surface; Oc.S/BS, osteoclast surface/bone surface; OS/BS, osteoid surface/bone surface; OV/BV, osteoid volume/bone volume; Tb.Sp, trabecular separation; trabecular number; Tb.Th, trabecular thickness.

Table 3. Comparisons of Bone Protein Expression Based on Median of Trabecular Bone AGEs Accumulation or RAGEs Expression

	AGEs accumulation in trabecular bone (%)			RAGEs expression in trabecular bone (%)		
	<3.92	≥3.92	<i>p</i>	<0.707	≥0.707	<i>p</i>
Sclerostin (ng/mg)	89.3 (2.88–401.2)	1.96 (0.11–40.3)	0.004	38.5 (0.37–344.7)	19.9 (0.53–196)	0.944
DKK1 (ng/mg)	1.36 (0.39–5.87)	0.064 (0.03–0.46)	0.0001	0.51 (0.06–4.46)	0.77 (0.06–3.11)	0.907
FGF-23 (ng/mg)	44.1 (6–161.9)	1.07 (0.4–32.6)	0.012	13.0 (0.7–151)	27.4 (0.8–106)	0.851
Osteoprotegerin (ng/mg)	6.49 (1.13–23.7)	0.16 (0.08–2.4)	0.001	2.4 (0.14–22.2)	2.45 (0.18–14.7)	0.963
Osteocalcin (μg/mg)	172.4 (35–439.7)	225.9 (74.6–497.3)	0.593	177 (82–420)	147 (42.9–733)	0.814

Abbreviations: FGF-23, fibroblast growth factor-23.

No differences in bone protein expression were observed according to serum AGEs levels. Bone histomorphometric parameters, bone protein, and gene expression were similar among groups defined by the median skin AGEs accumulation.

Bone AGEs accumulation and RAGEs expression: associations with bone morphology and metabolism

Bone histology was similar among groups defined by the median AGEs accumulation in trabecular bone (Table 2). Patients with high levels of AGEs in trabecular bone had decreased bone levels of sclerostin [1.96 (0.11–40.3) vs. 89.3 (2.88–401) ng/mg; $p = 0.004$], DKK1 [0.064 (0.03–0.46) vs. 1.36 (0.39–5.87) ng/mg; $p = 0.0001$], FGF-23 [1.07 (0.4–32.6) vs. 44.1 (6–162) ng/mg; $p = 0.01$] and osteoprotegerin [0.16 (0.08–2.4) vs. 6.5 (1.1–23.7) ng/mg; $p = 0.001$] compared with patients presenting low trabecular bone AGEs levels (Table 3). Above-median trabecular bone AGEs accumulation upregulated the p53 gene and downregulated DKK1 gene expression. Comparisons of bone gene expression according to median of accumulation of AGEs in skin, trabecular bone and expression of RAGEs in trabecular bone are summarized in supplementary data (Table S2).

Patients above the median of trabecular RAGEs expression had increased bone volume/tissue volume [26.2% (19.2–30.7%) vs. 18.9% (15.4–24.4%); $p = 0.002$], trabecular thickness [135 (125–154) vs. 118 (107–136) μm; $p = 0.003$], trabecular number [1.83 (1.5–2.1) vs. 1.5 (1.4–1.9) mm/mm; $p = 0.04$], and fibrosis volume/bone volume [0.04% (0.11–0.29%) vs. 0.02% (0.003–0.05%); $p = 0.04$], and decreased trabecular separation [398 (316–531) vs. 531 (410–595) μm; $p = 0.02$] (Table 2).

Bone proteins and gene expression did not reveal differences according to the median trabecular bone RAGEs expression (Table 3). Patients above the median of trabecular bone RAGEs expression had increased serum levels of parathormone [277 [152–416] vs. 206 [71–456] pg/mL; $p = 0.01$] and FGF-23 [1431 [400–7319] vs. 1120 [123–9985] ng/mL; $p = 0.003$].

Treatment regimen

To evaluate differences across treatment regimens regarding AGEs levels, we compared individuals on HD, PD, and conservative treatment. Only a few differences were noted between the treatment regimens.

N-Carboxymethyl lysine levels were higher in PD patients than HD and conservative patients [25 [12–52] vs. 13 [9–22] and 10 [9–25] ng/mL, respectively; $p = 0.009$]. Serum glycated hemoglobin levels were higher in HD than in PD and conservative treatment [5.9% [5.5–6.7%] vs. 5.7% [5.1–6.2%] vs. 5.2% [5–5.4%], respectively; $p = 0.0001$]. RAGEs expression in trabecular bone was higher in HD than in conservative treatment [1.21 [0.23–4.67]

vs. 0.18 [0.06–1.44]; $p = 0.030$), whereas no differences across groups were reported for cortical bone. No difference was found among groups regarding serum pentosidine levels, AGEs in skin, AGEs in bone surface, and RAGEs expression in cortical bone.

Discussion

Our study confirmed that bone AGEs accumulation occurred in patients with CKD and might be an early event in the CKD course since no significant differences in their levels were noted across distinct CKD stages or treatments. The AGEs accumulation in bone was related to decreased bone protein expression and changes in gene expression. The relationship observed between bone AGEs accumulation and a decreased serum RANKL/PTH ratio suggests that AGEs contribute to skeletal resistance to the actions of PTH. Although bone and skin AGEs accumulation were not related to significant histological changes, serum pentosidine and glycated hemoglobin levels were related to decreased cortical thickness; glycated hemoglobin levels were related to increased cortical porosity and mineralization lag time. Trabecular bone RAGEs expression was related to better structural bone parameters.

As far as we know, this is the first study to reveal bone AGEs accumulation along CKD stages and treatments and its impact on histology, bone protein, and gene expression. In animals with CKD, Aoki et al. detected AGEs in peritrabecular osteoblasts by immunohistochemistry and western blot techniques.⁽⁹⁾ In humans with CKD, pentosidine-induced cross-links by HPLC were detected in the bones of 21 patients under HD and one in PD. The authors observed a negative correlation between pentosidine in bone and bone-formation rate (BFR)/bone volume (BV) and MAR, but the number of subjects in this analysis was limited to 10.⁽¹⁸⁾

Our findings reveal a relation between bone AGEs accumulation and a marked reduction in key bone protein expression, namely, osteoprotegerin, FGF-23, sclerostin, and DKK1. Osteoprotegerin, also known as osteoclastogenesis inhibitory factor, is expressed by osteoblasts and plays a central role in regulating bone mass. Osteocytes and osteoblasts mainly secrete FGF-23 in bone, and studies have shown that FGF-23 overexpression or suppression is associated with defects in skeletal mineralization.^(23–25) Sclerostin and DKK1 are Wnt/β-catenin pathway inhibitors and are considered negative regulators of bone mass. Sclerostin is produced mainly by osteocytes, while DKK1 is mainly produced by osteoblasts.^(26,27) It is worth highlighting that bone AGEs accumulation was detected mainly around osteocytes and osteoblasts (Fig. 1D–H). The reduction in proteins synthesized by osteocytes and osteoblasts maybe reflects the important dysfunction of these cells due, at least partially, to AGEs accumulation.^(12,13) The reduction in bone protein expression, such as FGF-23 and sclerostin, was

observed based on intragroup comparison according to the median AGEs accumulation in trabecular bone. However, we do not know whether there is a certain cut-off level related to the reduction expression of these proteins after which the circulating levels of these molecules would be affected. As expected in CKD patients, in our study we observed elevated serum levels of FGF-23 and sclerostin, regardless of the level of AGEs accumulation in trabecular bone or protein expression.

Bone gene expression and regulation are complex processes, and scientific reports about AGEs and bone genes in patients with CKD is scarce.^(28–32) In our study, we observed that AGEs may upregulate p53 and downregulate DKK1 gene expression in patients who presented above-median trabecular bone AGEs accumulation.

p53 is a well-known tumor suppressor that promotes cell cycle arrest, programmed cell death, and cell senescence and acts as a transcriptional repressor.⁽²⁹⁾ Verma et al. observed that AGEs impair the autophagy process in p53-negative cells and then promote apoptosis via regulation of NF- κ B. The authors claim that p53 acts antagonistically to prevent this impairment.⁽³⁰⁾ It is plausible to think that this mechanism may explain our cohort's observed upregulation of the p53 gene.

In contrast to our findings about AGEs-mediated downregulation of DKK1 gene expression, Li et al. observed an AGEs-induced inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway in vitro.⁽³¹⁾ Notsu et al. demonstrated that incubating osteocyte-like cells with AGEs increased the sclerostin-producing gene *Sost* transcription in a dose-dependent manner.⁽³²⁾ Both studies were performed under controlled conditions, while our data were from patients. This contrasting finding probably occurs because regulation of bone metabolism depends on several factors in complex systems. Other factors that alter sclerostin or DKK1, such as parathyroid hormone, FGF-23, or even AGEs, may play a role.^(33, 34)

Tominaga et al. examined factors related to bone responsiveness to PTH in patients undergoing chronic hemodialysis. They proposed the TRACP-5b/intact PTH (iPTH) ratio as an index that reflects bone responsiveness to PTH.⁽³⁵⁾ In our cohort, we observed that patients with an AGEs accumulation and RAGEs expression in trabecular bone above the median presented decreased RANKL/PTH and TRACP-5b/PTH ratios, respectively. These findings suggest that AGEs could be another factor for skeletal resistance to PTH in patients with CKD.

Our study found no correlation between serum, skin, and bone levels of AGEs. This finding agrees with previous observations; in human body tissues, organs and structures seem to present different affinities for AGEs accumulation, either by constitution itself as due to metabolism particularities. For example, the proteins in the human eye are highly susceptible to the formation of AGEs, which accumulate at a higher rate in diseases such as cataracts. As bone turnover is lower than other tissues, some authors hypothesized that bone was potentially more susceptible to AGEs accumulation and effects. AGEs measurement in serum samples remains a challenge because of the lack of standardized methods and because circulating AGEs may not accurately reflect their accumulation in body tissues, which results from long-term exposure. Skin measurement using SAF attenuates this effect, since AGEs accumulation in the skin may be more closely related to AGEs deposition in the bone, yet the differences affect the correlation between these events in the intracellular synthesis of AGEs that vary across tissues.^(36–39)

Our results showed that serum pentosidine and glycated hemoglobin levels were related to decreased cortical thickness, increased cortical porosity, and mineralization lag time. We

observed that glycated hemoglobin affected cortical bone differently than pentosidine. Previous studies in animals and humans showed direct relationships between glycated hemoglobin and cortical microarchitecture alteration.^(40, 41) However, Sroga et al. observed differences in the progression of bone pathologies related to protein glycation by different sugars: in vitro glycation of bone using glucose leads to the formation of lower levels of AGEs, whereas ribosylation appears to support a pathway toward pentosidine formation.⁽⁴²⁾ This observation suggests differential actions of different AGEs in cortical bone.

This study had limitations. It was an observational and, essentially, descriptive study able to generate new hypotheses. The conclusions suggest relationships between bone AGEs accumulation and a decrease in essential bone proteins, changes in bone gene expression, potential increased skeletal resistance to PTH, and negative effects of serum AGEs on cortical bone. To overcome the lack of a control group, we attempted to perform statistical analyses through intragroup comparisons of AGEs accumulation parameters according to their respective medians; since there is no standardization of serum pentosidine and CML levels measurements at CKD setting, as well comparisons with more accurate methods such as HPLC, the results on these parameters must be interpreted with caution; we cannot exclude the possibility that the lack of correlation between AGEs accumulation in trabecular bone and BFR/bone surface (BS) was modified by serum PTH levels due to potential sample selection bias. Further interventional studies are required to confirm the mechanisms involved in these associations.

Our study also had some strengths. Most importantly, (i) it demonstrated, using bone biopsy, that AGEs and RAGEs accumulate in the bone of CKD subjects; (ii) a myriad of morphofunctional and genetic parameters was analyzed, providing insightful data on the mechanisms involved in renal osteodystrophy; and (iii) skin, serum, and bone AGEs levels were evaluated, and their associations with bone metabolism impairment were explored.

Conclusions

We demonstrated that bone accumulation of AGEs occurs in patients with CKD and might affect the metabolism of this tissue. A possible mechanism would be a reduction in the synthesis of essential bone proteins and changes in gene expression. Cortical bone seems to be affected by different serum AGEs. The mechanisms behind these interactions, including differential effects according to AGEs types, should be explored in specific studies. Reducing AGEs accumulation may be a therapeutic target that would modify the progression of skeletal disorders in patients with CKD.⁽¹⁰⁾ Pharmacological studies or dietary approaches should be proposed to test the effects of lowering AGEs on outcomes involving skeletal disease caused by CKD.

Acknowledgments

IBO, for technical assistance with immunohistochemistry experiments; RABC and JHC, for technical assistance with bone sample handling. This research was founded by FAPESP (No. 2015/16544-5) from São Paulo State Research Support Foundation and FAEPEX-UNICAMP (Nos. 1071-15, 0408-16, 0033-17, 0011-18, 2038-19, 2044-20). ACS was supported by a Research Career Awards grant (No. 301465/2017-7) from the Brazilian National Research Council (CNPq).

Author Contributions

Kélcia R. S. Quadros: Conceptualization; data curation; formal analysis; investigation; writing – original draft; writing – review and editing. **Noemi A. V. Roza:** Data curation; formal analysis; methodology; writing – review and editing. **Renata A. França:** Investigation; writing – review and editing. **André B. A. Esteves:** Investigation; writing – review and editing. **Joaquim Barreto:** Formal analysis; methodology; writing – original draft; writing – review and editing. **Wagner V. Domingues:** Formal analysis; methodology; writing – review and editing. **Luzia N. S. Furukawa:** Formal analysis; methodology; writing – review and editing. **Jacqueline Teixeira Caramori:** Investigation; writing – review and editing. **Andrei C. Sposito:** Conceptualization; writing – review and editing. **Rodrigo Bueno de Oliveira:** Conceptualization; data curation; formal analysis; funding acquisition; project administration; resources; supervision; writing – original draft; writing – review and editing.

Conflict of Interest

The authors declare there are no competing financial interests.

Peer Review

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/jbm4.10727>.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

References

- Moe S, Drüeke T, Cunningham J, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from kidney Disease: Improving global outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006;69(11):1945-1953.
- Alem AM, Sherrard DJ, Gillen DL, et al. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2000;58(1):396-399.
- Moe SM, Nickolas TL. Fractures in patients with CKD: time for action. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(11):1929-1931.
- Paloian NJ, Giachelli CM. A current understanding of vascular calcification in CKD. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;307(8):F891-F900.
- Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(8):2208-2218.
- Fusaro M, Holden R, Lok C, et al. Phosphate and bone fracture risk in chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2021;36(3):405-412.
- Custódio MR, Koike MK, Neves KR, et al. Parathyroid hormone and phosphorus overload in uremia: impact on cardiovascular system. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(4):1437-1445.
- Stinghen AE, Massy ZA, Vlassara H, Striker GE, Boullier A. Uremic toxicity of advanced glycation end products in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(2):354-370.
- Aoki C, Uto K, Honda K, Kato Y, Oda H. Advanced glycation end products suppress lysyl oxidase and induce bone collagen degradation in a rat model of renal osteodystrophy. *Lab Invest.* 2013;93(11):1170-1183.
- Chen NX, Srinivasan S, O'Neill K, et al. Effect of advanced glycation end-products (AGE) lowering drug ALT-711 on biochemical, vascular, and bone parameters in a rat model of CKD-MBD. *J Bone Miner Res.* 2020;35(3):608-617.
- Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2014;2:411-429.
- Park SY, Choi KH, Jun JE, Chung HY. Effects of advanced glycation end products on differentiation and function of osteoblasts and osteoclasts. *J Korean Med Sci.* 2021;36(37):e239.
- Kim S, Kwon J. COMP-Ang1 inhibits apoptosis as well as improves the attenuated osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by advanced glycation end products. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(10):4928-4934.
- Haus JM, Carrithers JA, Trappe SW, Trappe TA. Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1985;103(6):2068-2076.
- Tang SY, Vashishth D. The relative contributions of non-enzymatic glycation and cortical porosity on the fracture toughness of aging bone. *J Biomech.* 2011;44(2):330-336.
- Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr Drug Targets.* 2011;12(14):2096-2102.
- Willett TL, Pasquale J, Grynias MD. Collagen modifications in postmenopausal osteoporosis: advanced glycation endproducts may affect bone volume, structure and quality. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12(3):329-337.
- Mitome J, Yamamoto H, Saito M, Yokoyama K, Marumo K, Hosoya T. Nonenzymatic cross-linking pentosidine increase in bone collagen and are associated with disorders of bone mineralization in dialysis patients. *Calcif Tissue Int.* 2011;88(6):521-529.
- Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) CKD work group: KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(1):1-150.
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604-612.
- Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry nomenclature committee. *J Bone Miner Res.* 2013;28(11):2-17.
- Gomes SA, dos Reis LM, Noronha IL, Jorgetti V, Heilberg IP. RANKL is a mediator of bone resorption in idiopathic hypercalcaemia. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(5):1446-1452.
- Nozawa S, Inubushi T, Irie F, et al. Osteoblastic heparan sulfate regulates osteoprotegerin function and bone mass. *JCI Insight.* 2018;3(3):e89624.
- Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, et al. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res.* 2008;23(6):939-948.
- Sitara D, Razzaque MS, St-Arnaud R, et al. Genetic ablation of vitamin D activation pathway reverses biochemical and skeletal anomalies in Fgf-23-null animals. *Am J Pathol.* 2006;169(6):2161-2170.
- Hay E, Bouaziz W, Funck-Brentano T, Cohen-Solal M. Sclerostin and bone aging: a mini-review. *Gerontology.* 2016;62(6):618-623.
- Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood.* 2009;113(3):517-525.
- Piccoli A, Cannata F, Strollo R, et al. Sclerostin regulation, microarchitecture, and advanced glycation end-products in the bone of elderly women with type 2 diabetes. *J Bone Miner Res.* 2020;35(12):2415-2422.
- Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 1996;10(9):1054-1072.
- Verma N, Manna SK. Advanced glycation end products (AGE) potentiates cell death in p53 negative cells via upregulation of NF-kappa B and impairment of autophagy. *J Cell Physiol.* 2017;232(12):3598-3610.
- Li Y, Wang L, Zhang M, et al. Advanced glycation end products inhibit the osteogenic differentiation potential of adipose-derived stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signalling pathway via DNA methylation. *Cell Prolif.* 2020;53(6):e12834.
- Notsu M, Kanazawa I, Takeno A, et al. Advanced glycation end product 3 (AGE3) increases apoptosis and the expression of Sclerostin by

- stimulating TGF- β expression and secretion in osteocyte-like MLO-Y4-A2 cells. *Calcif Tissue Int*. 2017;100(4):402-411.
33. Schiavi SC, Moysés RM. Turning over renal osteodystrophy dogma: direct actions of FGF23 on osteoblast β -catenin pathway. *Kidney Int*. 2016;90(1):17-20.
 34. Carrillo-López N, Panizo S, Alonso-Montes C, et al. Direct inhibition of osteoblastic Wnt pathway by fibroblast growth factor 23 contributes to bone loss in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2016;90(1):77-89.
 35. Tominaga N, Yonaha T, Yamanouchi M, et al. Bone responsiveness to parathyroid hormone is negatively associated with parathyroid hormone-lowering drug use in patients undergoing hemodialysis: a cross-sectional study. *BMC Nephrol*. 2021;22(1):275.
 36. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia*. 2004;47(7):1324-1330.
 37. Hammes HP, Brownlee M, Lin J, Schleicher E, Bretzel RG. Diabetic retinopathy risk correlates with intracellular concentrations of the glycoxidation product Nepsilon-(carboxymethyl) lysine independently of glycohaemoglobin concentrations. *Diabetologia*. 1999;42(5):603-607.
 38. Nagaraj RH, Linetsky M, Stitt AW. The pathogenic role of Maillard reaction in the aging eye. *Amino Acids*. 2012;42:1205-1220.
 39. Hein GE. Glycation endproducts in osteoporosis—is there a pathophysiologic importance? *Clin Chim Acta*. 2006;371:32-36.
 40. Campbell GM, Tiwari S, Picke AK, et al. Effects of insulin therapy on porosity, non-enzymatic glycation and mechanical competence in the bone of rats with type 2 diabetes mellitus. *Bone*. 2016;10(91):186-193.
 41. Mitchell DM, Caksa S, Joseph T, Bouxsein ML, Misra M. Elevated HbA1c is associated with altered cortical and trabecular microarchitecture in girls with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(4):e1648-e1656.
 42. Sroga GE, Siddula A, Vashishth D. Glycation of human cortical and cancellous bone captures differences in the formation of Maillard reaction products between glucose and ribose. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117240.

5. CONCLUSÃO

Demonstramos que ocorre acúmulo de AGEs nos ossos de pacientes com DRC e isso pode afetar o metabolismo desse tecido. Um possível mecanismo seria a redução da síntese de proteínas ósseas essenciais e alterações na expressão gênica. O osso cortical parece ser afetado por diferentes AGEs presentes no sangue. Os mecanismos por trás dessas interações, incluindo efeitos diferenciais de acordo com os tipos de AGEs, devem ser explorados em estudos específicos. A redução do acúmulo de AGEs pode ser um alvo terapêutico que modificaria a progressão de distúrbios esqueléticos em pacientes com DRC. Estudos farmacológicos ou abordagens dietéticas devem ser propostos para testar os efeitos da redução de AGEs nos desfechos relacionados às doenças esqueléticas causadas pela DRC.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. James MT, Hemmelgarn BR, Tonelli M. Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *Lancet*. 2010;375(9722):1296-309.
2. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2007;298(17):2038-47.
3. Nerbass FB, Lima HDN, Thomé FS, Vieira Neto OM, Lugon JR, Sesso R. Brazilian Dialysis Survey 2020. *J Bras Nefrol*. 2022;44(3):349-57.
4. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(8):2208-18.
5. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296-305.
6. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2006;69(11):1945-53.
7. Alem AM, Sherrard DJ, Gillen DL, Weiss NS, Beresford SA, Heckbert SR, et al. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2000;58(1):396-9.
8. Moe SM, Nickolas TL. Fractures in Patients with CKD: Time for Action. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(11):1929-31.
9. Palioian NJ, Giachelli CM. A current understanding of vascular calcification in CKD. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;307(8):F891-900.
10. Ott SM. Renal insufficiency and bone loss. *Curr Opin Rheumatol*. 2019;31(4):394-9.
11. Fusaro M, Holden R, Lok C, Iervasi G, Plebani M, Aghi A, et al. Phosphate and bone fracture risk in chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2021;36(3):405-12.
12. Custódio MR, Koike MK, Neves KR, dos Reis LM, Graciolli FG, Neves CL, et al. Parathyroid hormone and phosphorus overload in uremia: impact on cardiovascular system. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(4):1437-45.
13. Stingham AE, Massy ZA, Vlassara H, Striker GE, Boullier A. Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(2):354-70.
14. Aoki C, Uto K, Honda K, Kato Y, Oda H. Advanced glycation end products suppress lysyl oxidase and induce bone collagen degradation in a rat model of renal osteodystrophy. *Lab Invest*. 2013;93(11):1170-83.
15. Chen NX, Srinivasan S, O'Neill K, Nickolas TL, Wallace JM, Allen MR, et al. Effect of Advanced Glycation End-Products (AGE) Lowering Drug ALT-711 on Biochemical, Vascular, and Bone Parameters in a Rat Model of CKD-MBD. *J Bone Miner Res*. 2020;35(3):608-17.
16. Maillard LC. Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *CR Acad Sci*1912. p. 66-8.

17. Meerwaldt R, Links T, Zeebregts C, Tio R, Hillebrands JL, Smit A. The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2008;7:29.
18. Castro E. O Papel dos Produtos Finais de Glicosilação Avançada na Nefropatia Diabética. *Arq Med*. 2011;25(1):10.
19. JHP B, IT S, AEG S, MOF G. Determination of Advanced Glycation (AGEs) and Lipoxidation (ALEs) End Products in Foods and Biological Systems: Advances, Challenges and Perspectives. *Química Nova*. 2016.
20. Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients*. 2010;2(12):1247-65.
21. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010;65(9):963-75.
22. Schwedler S, Schinzel R, Vaith P, Wanner C. Inflammation and advanced glycation end products in uremia: simple coexistence, potentiation or causal relationship? *Kidney Int Suppl*. 2001;78:S32-6.
23. Zhang Q, Ames JM, Smith RD, Baynes JW, Metz TO. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J Proteome Res*. 2009;8(2):754-69.
24. Mitome J, Yamamoto H, Saito M, Yokoyama K, Marumo K, Hosoya T. Nonenzymatic cross-linking pentosidine increase in bone collagen and are associated with disorders of bone mineralization in dialysis patients. *Calcif Tissue Int*. 2011;88(6):521-9.
25. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411-29.
26. Franke S, Ruster C, Pester J, Hofmann G, Oelzner P, Wolf G. Advanced glycation end products affect growth and function of osteoblasts. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(4):650-60.
27. Zhou Z, Immel D, Xi CX, Bierhaus A, Feng X, Mei L, et al. Regulation of osteoclast function and bone mass by RAGE. *J Exp Med*. 2006;203(4):1067-80.
28. Yamamoto T, Ozono K. [Role of advanced glycation endproducts in adynamic bone disease]. *Clin Calcium*. 2001;11(8):1044-7.
29. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. *Amino Acids*. 2012;42(4):1151-61.
30. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746.
31. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 7):991-8.
32. Sabbagh Y, Graciolli FG, O'Brien S, Tang W, dos Reis LM, Ryan S, et al. Repression of osteocyte Wnt/ β -catenin signaling is an early event in the progression of renal osteodystrophy. *J Bone Miner Res*. 2012;27(8):1757-72.
33. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev*. 2013;34(5):658-90.

34. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6500-5.
35. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest*. 2007;117(12):4003-8.
36. Moysés RM, Schiavi SC. Sclerostin, Osteocytes, and Chronic Kidney Disease - Mineral Bone Disorder. *Semin Dial*. 2015;28(6):578-86.
37. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, et al. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res*. 2008;23(6):939-48.
38. Sitara D, Razzaque MS, St-Arnaud R, Huang W, Taguchi T, Erben RG, et al. Genetic ablation of vitamin D activation pathway reverses biochemical and skeletal anomalies in Fgf-23-null animals. *Am J Pathol*. 2006;169(6):2161-70.
39. Teti A. Mechanisms of osteoclast-dependent bone formation. *Bonekey Rep*. 2013;2:449.
40. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. 2011;17(10):1231-4.
41. Evenepoel P, D'Haese P, Brandenburg V. Sclerostin and DKK1: new players in renal bone and vascular disease. *Kidney Int*. 2015;88(2):235-40.
42. Nozawa S, Inubushi T, Irie F, Takigami I, Matsumoto K, Shimizu K, et al. Osteoblastic heparan sulfate regulates osteoprotegerin function and bone mass. *JCI Insight*. 2018;3(3).
43. Hay E, Bouaziz W, Funck-Brentano T, Cohen-Solal M. Sclerostin and Bone Aging: A Mini-Review. *Gerontology*. 2016;62(6):618-23.
44. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood*. 2009;113(3):517-25.
45. Piccoli A, Cannata F, Strollo R, Pedone C, Leanza G, Russo F, et al. Sclerostin Regulation, Microarchitecture, and Advanced Glycation End-Products in the Bone of Elderly Women With Type 2 Diabetes. *J Bone Miner Res*. 2020;35(12):2415-22.
46. Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. 1996;10(9):1054-72.
47. Verma N, Manna SK. Advanced glycation end products (AGE) potentiates cell death in p53 negative cells via upregulation of NF-kappa B and impairment of autophagy. *J Cell Physiol*. 2017;232(12):3598-610.
48. Li Y, Wang L, Zhang M, Huang K, Yao Z, Rao P, et al. Advanced glycation end products inhibit the osteogenic differentiation potential of adipose-derived stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signalling pathway via DNA methylation. *Cell Prolif*. 2020;53(6):e12834.
49. Notsu M, Kanazawa I, Takeno A, Yokomoto-Umakoshi M, Tanaka KI, Yamaguchi T, et al. Advanced Glycation End Product 3 (AGE3) Increases Apoptosis and the Expression of Sclerostin by Stimulating TGF- β Expression and Secretion in Osteocyte-Like MLO-Y4-A2 Cells. *Calcif Tissue Int*. 2017;100(4):402-11.

50. Park SY, Choi KH, Jun JE, Chung HY. Effects of Advanced Glycation End Products on Differentiation and Function of Osteoblasts and Osteoclasts. *J Korean Med Sci.* 2021;36(37):e239.
51. Kim S, Kwon J. COMP-Ang1 inhibits apoptosis as well as improves the attenuated osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by advanced glycation end products. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(10):4928-34.
52. Haus JM, Carrithers JA, Trappe SW, Trappe TA. Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2007;103(6):2068-76.
53. Tang SY, Vashishth D. The relative contributions of non-enzymatic glycation and cortical porosity on the fracture toughness of aging bone. *J Biomech.* 2011;44(2):330-6.
54. Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr Drug Targets.* 2011;12(14):2096-102.
55. Willett TL, Pasquale J, Grynblas MD. Collagen modifications in postmenopausal osteoporosis: advanced glycation endproducts may affect bone volume, structure and quality. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12(3):329-37.
56. Eyre DR, Paz MA, Gallop PM. Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem.* 1984;53:717-48.
57. Uzawa K, Grzesik WJ, Nishiura T, Kuznetsov SA, Robey PG, Brenner DA, et al. Differential expression of human lysyl hydroxylase genes, lysine hydroxylation, and cross-linking of type I collagen during osteoblastic differentiation in vitro. *J Bone Miner Res.* 1999;14(8):1272-80.
58. Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev.* 1998;106(1-2):1-56.
59. Depalle B, Qin Z, Shefelbine SJ, Buehler MJ. Influence of cross-link structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;52:1-13.
60. Monnier VM, Sell DR, Nagaraj RH, Miyata S, Grandhee S, Odetti P, et al. Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes.* 1992;41 Suppl 2:36-41.
61. Hein G, Wiegand R, Lehmann G, Stein G, Franke S. Advanced glycation end-products pentosidine and N epsilon-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42(10):1242-6.
62. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group: KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(1):1-150.
63. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604-12.
64. Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaff R. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther.* 2010;12(5):399-403.
65. Gomes SA, dos Reis LM, Noronha IL, Jorgetti V, Heilberg IP. RANKL is a mediator of bone resorption in idiopathic hypercalciuria. *Clin J Am Soc Nephrol.*

- 2008;3(5):1446-52.
66. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 2013;28(1):2-17.
 67. Dos Reis LM, Batalha JR, Muñoz DR, Borelli A, Correa PH, Carvalho AB, et al. Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex, and race. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(6):400-6.
 68. Melsen F, Mosekilde L. Tetracycline double-labeling of iliac trabecular bone in 41 normal adults. *Calcif Tissue Res.* 1978;26(2):99-102.
 69. Malluche HH, Mawad HW, Monier-Faugere MC. Renal osteodystrophy in the first decade of the new millennium: analysis of 630 bone biopsies in black and white patients. *J Bone Miner Res.* 2011;26(6):1368-76.

7. APÊNDICES

7.1 Sequência dos *primers* e tamanhos dos *amplicons* dos genes avaliados

Tabela 1 - Sequência dos *primers* e tamanhos dos *amplicons* dos genes SOST, Beta-catenina, OPG, RANKL, FGF-23, P53, RANK, DKK, Osterix, ALP-1, colágeno-1, BGLAP e GAPDH.

Gene	Sequência 5' - 3'	Tamanho do amplicon
SOST (sense)	GGGCAACTGTAGATGTGGTT	84
SOST (antisense)	GTCCCGAAGGAGAATTGTGTAG	
Beta-catenina (sense)	CTTCACCTGACAGATCCAAGTC	98
Beta-catenina(antisense)	CCTTCCATCCCTTCCTGTTTAG	
OPG (sense)	GATGTCCAGATGGGTTCTTCTC	95
OPG (antisense)	CTGAGTTAGCAGGAGACCAAAG	
RANKL (sense)	CCCAAGTTCTCATACCCTGATG	118
RANKL (antisense)	TTCCTCTCCAGACCGTAACT	
FGF-23 (sense)	ACCACATGGTCAGGCTCTTG	111
FGF-23 (antisense)	TCCAAGGGGATTGAGACCCA	
GAPDH (sense)	CAAGAGCACAAGAGGAAGAGAG	102
GAPDH (antisense)	CTACATGGCAACTGTGAGGAG	
p53 (Sense)	AGGGATGTTTGGGAGATGTAAG	99
p53 (Antisense)	CCTGGTTAGTACGGTGAAGTG	
RANK (Sense)	CCTCCCAAAGTACTGGGATTAC	117
RANK (Antisense)	CAATGAACACACACTGGGAAAG	
DKK-1 (Sense)	AGCACCTTGGATGGGTATTC	94
DKK-1 (Antisense)	CTGATGACCGGAGACAAACA	
Osterix (Sense)	CATTCTGGGCTTGGGTATCT	93
Osterix (Antisense)	GGCCTGAGATGAGAGTTTGT	
ALP-1 (Sense)	GGGCAGAAGAAGGACAAACT	104
ALP-1 (Antisense)	TCTGGCACATGCTTGTCTAC	
Collagen-1 (Sense)	CTGGAGATAAAGGCAAGGATGG	109
Collagen-1 (Antisense)	GGAAATCCTGATGGACCGTATG	
BGLAP (Sense)	TGCAGAGTCCAGCAAAGG	93
BGLAP (AntiSense)	CCCAGCCATTGATACAGGTAG	

SOST, esclerostina; OPG, osteoprotegerina; RANKL, ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-B; FGF-23, Fator de crescimento do fibroblasto 23; BGLAP, proteína óssea contendo ácido gama-carboxiglutâmico; GAPDH, Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; RANK, Receptor ativador do fator nuclear kappa-B; DKK-1, Proteína relacionada à Dickkopf-1; Osterix, fator de transcrição SP7; ALP-1, Fosfatase alcalina; Collagen-1, Colágeno tipo I alfa 1; BGLAP, proteína óssea contendo ácido gama-carboxiglutâmico (osteocalcina).

7.2 Parâmetros estáticos empregados na análise histomorfométrica

Tabela 2 - Parâmetros estáticos empregados na análise histomorfométrica das biópsias ósseas.

Parâmetro	Sigla	Unidade	Interpretação	Valores de referência	
				Mulheres	Homens
Volume trabecular	BV/TV	%	Proporção do volume ocupado pelo osso trabecular, seja mineralizado ou não, em relação ao volume ocupado pela medula óssea e as trabéculas	21,8 ± 7,2	24 ± 6,1
Espessura trabecular	Tb. Th	µm	Média da espessura das trabéculas	126 ± 28,8	127,9 ± 29,7
Separação trabecular	Tb.Sp	µm	Distância média entre as trabéculas	498,3 ± 195,9	420,6 ± 124,1
Número de trabéculas	Tb.N	/mm ou mm ⁻¹	Quantidade de trabéculas ósseas por milímetro do tecido avaliado, calculado a partir da relação entre o volume trabecular e sua espessura	1,76 ± 0,52	1,89 ± 0,42
Volume osteóide	OV/BV	%	Volume ocupado pelo osso não-mineralizado (matriz osteóide), em relação ao volume trabecular (mineralizado e não-mineralizado).	1,55 ± 1,9	2,9 ± 2,7
Espessura osteóide	O. Th	µm	Espessura da matriz osteóide	10,8 ± 3,2	11,7 ± 3,5
Superfície osteóide	OS/BS	%	Porcentagem da superfície trabecular recoberta por matriz osteóide em relação à superfície total do osso trabecular	9,2 ± 8,4	16,1 ± 12,6
Superfície osteoblástica	Ob.S/BS	%	Porcentagem da superfície trabecular coberta por células osteoblásticas em relação à superfície total do osso trabecular	1,2 ± 3,2	1,2 ± 1,4
Superfície reabsorvida	ES/BS	%	Porcentagem da superfície trabecular que apresenta lacunas de reabsorção óssea, com ou sem a presença de osteoclastos, em relação à superfície total do osso trabecular	2,3 ± 2,4	1,75 ± 1,21
Superfície osteoclástica	Oc.S/BS	%	Porcentagem da superfície trabecular coberta por células osteoclásticas em relação à superfície total do osso trabecular	0,03 ± 0,06	0,03 ± 0,11
Volume de fibrose	Fb.V/TV	%	Porcentagem do volume da medula óssea ocupado por tecido fibroso em relação à área avaliada	0	0

7.3 Parâmetros dinâmicos empregados na análise histomorfométrica

Tabela 3 - Parâmetros dinâmicos empregados na análise histomorfométrica das biópsias ósseas.

Parâmetro	Sigla	Unidade	Interpretação	Valores de referência	
				Mulheres	Homens
Superfície mineralizante	MS/BS	%	Proporção da superfície trabecular que apresenta marcações duplas e simples pela tetraciclina em relação à superfície total trabecular do osso trabecular	12 ± 5	18 ± 8
Taxa de aposição mineral	MAR	$\mu\text{m}/\text{dia}$	Quantidade de mineral depositado durante o período entre as duas marcações pela tetraciclina	$0,65 \pm 0,12$	$0,65 \pm 0,12$
Taxa de formação óssea	BFR/BS	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$	Taxa de formação de osso mineralizado por dia ou um ano. É o produto da taxa de aposição mineral (MAR) e a superfície mineralizante (MS/BS) em 365 dias ou um ano.	$0,07 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,07$
Intervalo de tempo para a mineralização	MIt	Dia	Intervalo de tempo entre deposição e a mineralização da matriz osteóide	$23,7 \pm 2,7$	$21,3 \pm 2,3$

8. ANEXOS

8.1 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos produtos finais da glicosilação avançada (AGEs) medidos por autofluorescência da pele e sua associação com calcificação vascular e distúrbio mineral ósseo em pacientes em diálise peritoneal.

Pesquisador: Rodrigo Bueno de Oliveira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 38108314.6.0000.5404

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 957.634

Data da Relatoria: 23/02/2015

Apresentação do Projeto:

O pesquisador esclarece que a doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de mortalidade em pacientes com doença renal crônica (DRC) e que fatores relacionados à uremia podem contribuir para a piora das lesões cardiovasculares preexistentes ou induzir o aparecimento das mesmas. Dentre eles destacam-se os produtos finais da glicosilação avançada (AGEs), que parecem estar relacionados à DCV e distúrbios mineral e ósseo (DMO). Recentemente foi desenvolvida uma técnica não invasiva para avaliar a deposição tecidual de AGEs através da autofluorescência da pele (AF) (AGE-Reader™). A AF da pele está elevada em pacientes com diabetes melito (DM) e DRC. Existem poucos estudos que avaliaram a AF da pele em pacientes com DRC em diálise peritoneal (DP). Visando quantificar AGEs através de AF da pele em pacientes com DRC em DP e estabelecer relações com parâmetros clínicos, bioquímicos, de DCV e de DMO, serão avaliados 40 pacientes com DRC em DP no Centro Integrado de Nefrologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Serão incluídos apenas participantes maiores de idade e que estejam em DP há pelo menos três meses. Os critérios de exclusão definem indivíduos com tons de pele tipos V e VI de acordo com a classificação de Fitzpatrick (contraindicação para o uso do dispositivo), presença de icterícia, peritonite há menos de um mês, gestante, portador de neoplasia avançada ou apresentar qualquer instabilidade clínica. Os procedimentos com os participantes compreendem a aplicação de um

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 957.634

recordatório alimentar consecutivamente por três dias para avaliar o conteúdo dietético de AGEs, a coleta de dados demográficos, clínicos, laboratoriais, biopsia óssea, da região do quadril (crista ilíaca), sob anestesia local, com dupla marcação por tetraciclina, exames de imagem, de diálise e comorbidades, que serão avaliados e comparados com a AF da pele. A análise dos dados será descritiva e em tabela de frequências representadas como média $\pm$ desvio-padrão, ou mediana e intervalos interquartis. Comparações serão realizadas por teste t Student, ANOVA, Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Correlações pelos métodos de Pearson ou Spearman.

Objetivo da Pesquisa:

Quantificar AGEs através de AF da pele em pacientes com DRC e em tratamento crônico por DP e estabelecer relações com características clínicas e parâmetros bioquímicos, marcadores de DCV e parâmetros de DMO, além de relacionar o consumo dietético de AGEs com a medida de AGEs por autofluorescência da pele.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O uso do equipamento é superficial e não incorre em maiores riscos, desde que respeitadas as especificações do fabricante quanto ao tom de pele e áreas com hiperpigmentação (sardas, tatuagens ou vascularizadas, p. ex.). A coleta de exames de sangue incorre em desconforto hematoma ou inchaço temporário, além de remota possibilidade de infecção. A biopsia óssea, também incorre em riscos semelhantes, além de dor, que será minimizada pelo uso de anestesia local. Não haverá benefícios diretos aos participantes, porém o estudo poderá gerar maior conhecimento científico, portanto com benefícios coletivos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo observacional, transversal, a ser realizado em grupo de pacientes com DRC em tratamento por DP no Centro Integrado de Nefrologia (CIN) do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de Dezembro de 2014 a Abril de 2015.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto corretamente preenchida e assinada pelo pesquisador e pelo coordenador de assistência do HC/Unicamp. Também foram encaminhados o protocolo do estudo na versão do pesquisador e no resumo das informações geradas pela PB, o regulamento do biorrepositório e o modelo de TCLE.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nos pareceres anteriores (886.436 e 940.996), as seguintes pendências foram listadas:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126		
Bairro: Barão Geraldo	CEP: 13.083-887	
UF: SP	Município: CAMPINAS	
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 957.634

1. O TCLE seguiu o modelo recomendado pelo CEP, entretanto não foi acrescentada a frase que esclarece aos sujeitos de pesquisa em quais situações não deverão participar (critérios de exclusão). Mesmo que isso seja abordado pelo pesquisador no processo de seleção dos participantes, solicita-se que conste no TCLE com um frase do tipo "Você NÃO deverá participar deste estudo se...".

Resposta: O pesquisador acrescentou a frase "Você não deverá participar deste estudo se o aparelho (AGE-Reader™) não conseguir dosar a quantidade de AGEs no seu tipo de pele, se estiver com a pele amarelada (icterícia), se teve peritonite há menos de um mês, se estiver gestante, for portador(a) de neoplasia, ou se apresentar qualquer instabilidade clínica."

Análise: pendência atendida.

2. No resumo das informações geradas pela PB foi mencionado que não haverá benefícios diretos aos participantes, mas no TCLE consta que "a participação neste estudo poderá alterar o seu tratamento relativo ao controle dos distúrbios do cálcio, fosfato e hormônio da paratireoide (PTH)...". Solicita-se que o pesquisador esclareça se essas eventuais modificações no tratamento ocorrerão apenas em decorrência dos procedimentos desta pesquisa, ou se refletem a realização de exames bioquímicos que seriam realizados nos pacientes, mesmo que não incluídos no estudo. Se for esta segunda opção, tal frase deverá ser retirada do TCLE pois não reflete benefício do estudo, mas sim do atendimento médico em si.

Resposta: Este tópico continua discrepante entre o resumo das informações geradas pela PB e o TCLE, sendo que neste último consta que "sua participação neste estudo poderá alterar o seu tratamento relativo ao controle dos distúrbios do cálcio, fosfato e hormônio da paratireoide (PTH), a partir dos resultados da biópsia óssea. Com base nos resultados obtidos, esperamos conhecer mais sobre a ação dos produtos finais da glicosilação avançada nos pacientes com DRC em diálise peritoneal e gerar maior conhecimento científico sobre a doença renal."

Análise: este CEP considera que as informações constantes no TCLE são as que refletem a descrição dos benefícios aos participantes. Pendência atendida.

3. No TCLE, no item "acompanhamento e assistência", não basta mencionar que os participantes serão reavaliados em uma semana para saber se houve algum desconforto ou risco. O que se espera do pesquisador é que ele se comprometa a atender os participantes a qualquer momento caso hajam intercorrências relacionadas aos procedimentos do estudo, as formas como essa

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 957.634

assistência será realizada e a maneira como o participante poderá contatá-lo. Assim, mesmo que remota, na eventual ocorrência de infecção no local da biopsia, como o pesquisador dará suporte ao participante?

Resposta: foram disponibilizados os contatos da Dra. Kécia Rosana da Silva Quadros, incluindo número de celular, em caso de intercorrências.

Análise: pendência atendida.

4. O estudo prevê armazenamento de material biológico "para análises biológicas posteriores", de modo que deverão ser contemplados os ajustes referentes à resolução 441/2011 CNS/MS para tal, incluindo regulamento do biorrepositório e adequações no TCLE.

Resposta: O TCLE contempla as opções referentes ao armazenamento de material biológico, e o regulamento do biorrepositório (resolução 441/2011 artigo 1o, item 4) foi encaminhado na 3a versão do protocolo.

Análise: pendência atendida.

Conclusão: aprovado após respostas às pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 957.634

previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

CAMPINAS, 20 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICOSILAÇÃO AVANÇADA (AGES) MEDIDOS POR AUTOFLUORESCÊNCIA DA PELE E SUA ASSOCIAÇÃO COM DOENÇA CARDIOVASCULAR E DISTÚRBO MINERAL E ÓSSEO EM PACIENTES EM HEMODIÁLISE

Pesquisador: Renata de Almeida França

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 45943115.9.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.273.816

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores esclarecem que a emenda no projeto supracitado se refere à inclusão da biópsia óssea transilíaca, com análise histomorfométrica do tecido ósseo nos pacientes com doença renal crônica em hemodiálise, com o intuito de estudar de forma mais profunda a relação entre AGEs e os diversos tipos de osteodistrofia renal. Justificam que a biópsia óssea representa o exame de padrão-áureo no diagnóstico do tipo de osteodistrofia renal, e é um procedimento considerado seguro, com baixas taxas de complicações (<1%). Além disso, foi reduzido para 30 o número de pacientes incluídos no estudo, sendo metade destes selecionados a partir do Centro Integrado de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas e a outra metade, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Objetivo da Pesquisa:

Quantificar indiretamente e de maneira não-invasiva os níveis teciduais de AGEs por meio da medida da AF da pele de pacientes com DRC, em tratamento crônico por HD. Estabelecer relações entre os níveis de AGEs e características clínicas, bioquímicas, marcadores de DCV e parâmetros de DMO, incluindo análise histomorfométrica de tecido ósseo a partir de biópsia óssea transilíaca, em

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 957.634

recordatório alimentar consecutivamente por três dias para avaliar o conteúdo dietético de AGEs, a coleta de dados demográficos, clínicos, laboratoriais, biopsia óssea, da região do quadril (crista ilíaca), sob anestesia local, com dupla marcação por tetraciclina, exames de imagem, de diálise e comorbidades, que serão avaliados e comparados com a AF da pele. A análise dos dados será descritiva e em tabela de frequências representadas como média $\pm$ desvio-padrão, ou mediana e intervalos interquartis. Comparações serão realizadas por teste t Student, ANOVA, Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Correlações pelos métodos de Pearson ou Spearman.

Objetivo da Pesquisa:

Quantificar AGEs através de AF da pele em pacientes com DRC e em tratamento crônico por DP e estabelecer relações com características clínicas e parâmetros bioquímicos, marcadores de DCV e parâmetros de DMO, além de relacionar o consumo dietético de AGEs com a medida de AGEs por autofluorescência da pele.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O uso do equipamento é superficial e não incorre em maiores riscos, desde que respeitadas as especificações do fabricante quanto ao tom de pele e áreas com hiperpigmentação (sardas, tatuagens ou vascularizadas, p. ex.). A coleta de exames de sangue incorre em desconforto hematoma ou inchaço temporário, além de remota possibilidade de infecção. A biopsia óssea, também incorre em riscos semelhantes, além de dor, que será minimizada pelo uso de anestesia local. Não haverá benefícios diretos aos participantes, porém o estudo poderá gerar maior conhecimento científico, portanto com benefícios coletivos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo observacional, transversal, a ser realizado em grupo de pacientes com DRC em tratamento por DP no Centro Integrado de Nefrologia (CIN) do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de Dezembro de 2014 a Abril de 2015.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto corretamente preenchida e assinada pelo pesquisador e pelo coordenador de assistência do HC/Unicamp. Também foram encaminhados o protocolo do estudo na versão do pesquisador e no resumo das informações geradas pela PB, o regulamento do biorrepositório e o modelo de TCLE.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nos pareceres anteriores (886.436 e 940.996), as seguintes pendências foram listadas:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.273.816

regulamento do biorrepositório entra em vigor a partir da aprovação desta emenda e não na data indicada no documento (05/2012), uma vez que a aprovação do armazenamento de material biológico não é retroativa.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.273.816

apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_563338 E1.pdf	06/10/2015 16:38:15		Aceito
Outros	Regulamento_de_biorrepositorio.pdf	06/10/2015 16:36:32	Renata de Almeida França	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_PENDENCIA.pdf	06/10/2015 16:33:25	Renata de Almeida França	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_inclusao_de_biorepositorio.pdf	06/10/2015 16:30:23	Renata de Almeida França	Aceito
Outros	JUSTIFICATIVA DA EMENDA.pdf	04/08/2015 15:54:30		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Franca RA - AGES HD - inclusão de biópsia óssea.pdf	04/08/2015 11:40:07		Aceito
Outros	Carta Resposta - CEP UNICAMP.pdf	30/06/2015 16:39:08		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Franca RA - AGES HD.pdf	30/06/2015 16:35:01		Aceito
Outros	Carta do co-orientador.pdf	08/06/2015 09:43:55		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	03/06/2015 16:04:51		Aceito
Outros	AUTORIZAUNESP.pdf	25/05/2015 16:34:02		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.273.816

CAMPINAS, 09 de Outubro de 2015

Assinado por:

Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos produtos finais da glicosilação avançada (AGEs) medidos por autofluorescência da pele e sua associação com risco cardiovascular e distúrbio mineral ósseo em pacientes com doença renal crônica categorias 3 e 4.

Pesquisador: ANDRÉ DE BARROS ALBUQUERQUE ESTEVES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45777015.5.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.129.533

Data da Relatoria: 23/06/2015

Apresentação do Projeto:

Adequada. A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morbimortalidade em pacientes com doença renal crônica (DRC). O risco de óbito por DCV nessa população é de dez a trinta vezes maior do que na população geral. A alta prevalência de DCV nos pacientes com DRC é devida, em parte, a alta incidência a fatores de risco tradicionais como diabetes melito (DM), dislipidemia, hipertensão arterial, idade avançada e sedentarismo. Estes fatores tem relação com o aparecimento e progressão da lesão aterosclerótica e calcificação vascular. Porém, a ocorrência desses fatores clássicos de risco não é suficiente para explicar completamente a forte associação entre DCV e DRC. Fatores relacionados à uremia podem contribuir para a piora das lesões cardiovasculares preexistentes ou induzir o aparecimento das mesmas. Na DRC, os produtos metabólicos que se acumulam no corpo são chamados de toxinas urêmicas. Têm efeito deletério sobre vários órgãos e tecidos, principalmente no sistema cardiovascular. Dentre as diversas toxinas urêmicas implicadas na patogênese da DCV, destacam-se os produtos finais da glicosilação avançada (AGEs, Advanced Glycation End products). Os AGEs compreendem vários produtos com atividade biológica resultantes da ligação não-enzimática entre carboidratos-proteínas (reação de Maillard), carboidratos-lipídeos podendo ser detectados no plasma ou em tecidos. AGEs podem ser gerados em indivíduos saudáveis de forma lenta, acumulando-se com a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.129.533

idade. Entretanto, em indivíduos com DM e uremia são gerados de forma acelerada. Podem também ser derivados de fonte exógena, como alimentos processados a altas temperaturas. Em um estudo que avaliou a absorção oral de AGEs, a administração de uma única refeição rica nesses produtos foi capaz de produzir elevação dos níveis plasmáticos e urinários, tanto em indivíduos saudáveis como em diabéticos, com ou sem DRC. A principal via de eliminação dos AGEs é através da filtração glomerular, observando-se o seu acúmulo conforme o decaimento da função renal. Outra causa de aumento de formação dos AGEs em pacientes com DRC é o estresse oxidativo gerado pelo desequilíbrio entre forças pró-oxidantes e o sistema de defesa anti-oxidante. Os AGEs exercem vários efeitos potencialmente deletérios no corpo, que podem ser notados no sistema cardiovascular e tecido ósseo. No sistema cardiovascular o seu acúmulo contribui para alterações miocárdicas, disfunção endotelial, rigidez arterial e formação de placa aterosclerótica. Quando estas moléculas se ligam ao colágeno e a elastina eles se acumulam na matriz dos vasos sanguíneos de forma desordenada e disfuncional, mudando o tônus de modulação vasomotora endotelial, adesão plaquetária e proliferação celular. Suas ações no sistema vascular dão-se através da ligação com um receptor específico chamado RAGE. A Ativação do RAGE induz uma resposta inflamatória com liberação de citocinas levando aos efeitos descritos e a produção de moléculas de adesão, aumentando a proliferação da camada íntima dos vasos, angiogênese e estresse oxidativo. A geração de AGEs é um processo contínuo e inevitável in vivo sendo seu acúmulo e dano resultante mais evidente em tecidos de baixo turnover. Especula-se que os AGEs desempenham efeito negativo sobre o tecido ósseo e seu papel sobre a reabsorção e mineralização óssea são controversos. O conteúdo de AGEs aumenta durante o envelhecimento em todos os tecidos, incluindo os ossos. Contribui para mudanças estruturais e funcionais de proteínas ósseas levando a ligações cruzadas intramoleculares ou intermoleculares que explicam parcialmente os efeitos deletérios dos AGEs nas propriedades biomecânicas do osso. Níveis elevados de AGEs são encontrados no tecido ósseo de pacientes com osteoporose. Em um estudo clínico com mulheres na pós-menopausa, os níveis elevados de AGEs no plasma foram associados ao comprometimento da formação óssea e foi fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose. Em pacientes com DM, os AGEs foram associados a fragilidade óssea por deterioração de sua qualidade. AGEs podem regular a proliferação e diferenciação dos osteoblastos. RAGE na presença de AGEs, é capaz de provocar em osteoblastos, a ativação do factor nuclear kappa-B resultando no aumento da expressão de citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão. Em outros experimentos, AGEs suprimem a mineralização das células do estroma ST2 de ratos e inibem parcialmente a diferenciação dos osteoblastos por meio da ligação

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.129.533

de RAGE e aumento da expressão e secreção de TGF β . Portanto, o acúmulo de AGEs no osso tem sido associado a uma redução de propriedades biomecânicas cortical e trabecular e com comprometimento funcional das células ósseas. Especula-se se intervenções dietéticas, medicamentosas ou dialíticas podem ter efeito sobre o seu nível sérico e impregnação nos tecidos, com impacto benéfico dessa modulação sobre o sistema cardiovascular e tecido ósseo. Qualquer intervenção terapêutica em relação aos AGEs necessita da quantificação do seu nível sérico ou tecidual ao longo do tempo. Recentemente, foi desenvolvida e validada uma técnica não invasiva para quantificar AGEs tecidual medindo a autofluorescência (AF) da pele (AGE-Reader™). O método foi validado com biópsias de pele de pacientes com DM, DRC e controles saudáveis. A AF da pele é elevada em função de AGEs em pacientes com DM e DRC, e está associada com maior mortalidade cardiovascular, independente de fatores de risco conhecidos para DCV. A medida de AGEs pela AF da pele também parece estar correlacionada com desfecho cardiovascular em pacientes em hemodiálise (HD). A quantificação dos AGEs nos tecidos pode ser preferível em relação ao plasma, uma vez que eles se acumulam nos tecidos e os níveis plasmáticos podem não refletir os níveis teciduais. Apesar dos níveis séricos de AGEs estarem aumentados nos pacientes com DRC, a AF se qualifica como foram inversamente associadas a células endoteliais progenitoras capazes de reparar o dano cardiovascular. Porém, em análise de regressão múltipla, somente a AF foi relacionada às células endoteliais progenitoras. Da mesma forma demonstrada por outros autores onde somente a AF e não o AGE plasmático se mostrou fortemente associada a disfunção miocárdica diastólica. Os AGEs também se acumulam em pacientes urêmicos não-diabéticos, apesar de seus níveis normais de glicose no soro. Nas classes mais baixas de DRC, uma relação entre os níveis de AGEs, [Ne-carboximetil-lisina (CML)] e função renal também é evidente, tanto em grupos selecionados quanto na comunidade. Entre os pacientes em diálise, ambos os diabéticos e os não-diabéticos apresentam níveis elevados de pentosidina e CML no plasma. O aumentado estresse glicêmico da nefropatia diabética contribui para níveis elevados de AGEs tecidual e plasmático, enquanto que, na DRC o estresse oxidativo de baixo grau é comumente presente e contribui para formação de AGEs, independentemente da condição de DM. Autores mediram e compararam a AF da pele usando o AGE-Reader™ em 115 pacientes em diálise [62 em HD e 53 em diálise peritoneal (DP)]. Os valores da AF da pele foram semelhantes em pacientes em HD e DP, e fortemente correlacionados com a carga de exposição à glicose na DP. A AF da pele foi ainda correlacionada com a idade nos dois grupos e com o tempo em diálise apenas no grupo DP. Jiang e colaboradores avaliaram 2.388 pacientes em diálise (1775 em HD e 613 em DP) e evidenciaram o aumento da AF da pele, tanto em pacientes em DP convencional, quanto em

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.129.533

pacientes em HD. Este aumento foi correlacionado com a duração da DP, exposição à glicose e DCV. A mesma autora em uma coorte de 1.707 pacientes DRC estágio III observou a associação entre vários fatores de risco cardiovascular e renal com a AF. Entre eles estão a taxa de filtração glomerular (TFG), hemoglobina, idade, tabagismo, colesterol total, pressão diastólica, proteína-C reativa (PCR), relação cintura quadril, albuminemia, velocidade de onda de pulso e DM. A AF da pele, em outros estudos, tende a ser associada a fatores de risco de mortalidade cardiovascular ou a evidência direta de dano cardiovascular como a correlação positiva com a espessura média-intimal da artéria carótida.[32] Finalmente, nenhum destes estudos avaliou simultaneamente AGEs e suas associações com distúrbios do metabolismo mineral e ósseo (DMO) e risco CV em pacientes DRC categorias 3 e 4. O presente estudo se propõe a investigar as possíveis associações entre AGEs avaliados indiretamente por AF da pele por meio do AGE-Reader™ e suas possíveis interações com parâmetros de DMO e marcadores de DCV em uma população de pacientes em tratamento conservador de DRC categorias 3 e 4.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Quantificar AGEs através de AF da pele em pacientes com DRC categorias 3 e 4 e estabelecer relações com características clínicas, parâmetros bioquímicos, marcadores de DCV e parâmetros do metabolismo mineral e ósseo.

Objetivo Secundário:

Comparar as medidas de AGEs por AF da pele com as medidas séricas de AGEs na população de pacientes brasileiros com DRC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Agulhas intravenosas e exames de sangue: desconforto, possibilidade de infecção, além de hematoma ou edema temporário. Biópsia óssea: alguns riscos conhecidos, embora pouco frequentes, como hematoma, sangramento ou infecção local e potencial risco de dispepsia causada pelo antibiótico usado para a marcação do tecido ósseo, antes da biópsia óssea. Benefícios: A participação neste estudo poderá alterar o tratamento relativo ao controle dos distúrbios mineral e ósseo, a partir dos resultados da biópsia óssea. Com base nos resultados obtidos, esperamos conhecer mais sobre a ação dos produtos finais da glicosilação avançada nos pacientes com DRC categorias 3 e 4 em tratamento conservador e gerar maior conhecimento científico sobre a doença renal.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.129.533

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo está bem escrito, detalhado e claro. A metodologia é adequada e factível. Estudo clínico observacional, transversal, a ser realizado em um grupo de 15 pacientes com diagnóstico DRC categoria 3 e outro grupo do mesmo tamanho com DRC categoria 4 em tratamento ambulatorial no Centro Integrado de Nefrologia (CIN) do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de Maio de 2015 a Maio de 2016 que serão comparados a um grupo controle. Serão analisados Dados demográficos: idade, gênero, raça, etiologia da DRC; Comorbidades: presença de DM, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva, tabagismo, eventos cardiovasculares prévios, pelo menos um dos seguintes: infarto agudo do miocárdio, angina, acidente vascular encefálico, dissecação de aorta, aneurisma de aorta, doença arterial periférica. Avaliação cardiovascular: Escore de risco de Framingham, EcoDopplercardiograma, espessura médio intimal da carótida por ultrassonografia; Dados clínicos: peso, estatura, índice de massa corporal (IMC), índice tornozelo-braquial (ITB) e circunferência abdominal; Dados laboratoriais gerais como níveis séricos de ureia, creatinina, potássio, hemoglobina, hematócrito, ferro, ferritina, saturação de transferrina, glicemia de jejum, hemoglobina glicada, colesterol total e frações, triglicérides, ácido úrico, PCR, albumina, bicarbonato, β 2-microglobulina, relação albumina-creatinina em amostra de urina, TFG estimada pela equação MDRD e CKD-Epi. Avaliação DMO por níveis séricos de cálcio, fosfato, hormônio da paratireoide (PTHrP), fosfatase alcalina (FA), 25-hidroxivitamina D (25VitD), alumínio, fosfatase alcalina óssea, esclerostina (TECOmedical, EUA), C-telopeptídeo de colágeno tipo-I [-CTX (Antibodies-Online, EUA)] e Deoxipiridinolina (Quidel Corporation, EUA), ambos marcadores de reabsorção óssea; Exames de imagem para avaliação de calcificação vascular: radiografias de mãos, e pelve (incidência pósterio-anterior), e abdome (incidência lateral); Tecido ósseo: por meio de biópsia óssea de crista ilíaca com análise histomorfométrica e densitometria óssea por DEXA (dual-energy X-ray absorptiometry); Titulação de AGEs: AGE-Reader™ - AF da pele: uma medida da deposição de AGE da pele será avaliada no antebraço usando um dispositivo AGE Reader™ (DiagnOptics, Groningen, Holanda). Três leituras serão tomadas e a média calculada. Áreas da pele tatuadas, fortemente sardentas ou com vasos perto a superfície de leitura serão evitadas. De acordo com o fabricante, o AGE Reader e seu software foram validados em pacientes com índice de reflexão de pele 6% (Fitzpatrick classe de I a IV). Apesar da medida da AF da pele não ser operator-dependente, todas as medidas serão realizadas pelo mesmo pesquisador. Os valores de AF da pele são expressos em unidades arbitrárias (UA). Dosagem dos níveis séricos de CML (Antibodies-Online, EUA) e pentosidina (Antibodies-Online, EUA). Avaliação do consumo de AGEs na dieta

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.129.533

(KU/dia): um registro alimentar será preenchido pelo paciente pelo período de três dias e o conteúdo de AGEs da dieta será calculado de acordo com tabela de conteúdo de AGEs em 549 alimentos (disponível online a partir de [http://www.andjrn.org/article/S0002-8223\(10\)00238-5/abstract](http://www.andjrn.org/article/S0002-8223(10)00238-5/abstract). O presente método foi validado por Uribarri e colaboradores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além do relatório de pesquisa, foi encaminhada a folha de rosto da CONEP assinada pela pesquisadora e complementada por autorização do Coordenador de Assistência do HC/UNICAMP. Com relação ao TCLE, a linguagem está clara. No TCLE constam o título completo da pesquisa e o nome do pesquisador responsável. Constam a justificativa, uma descrição dos procedimentos envolvidos, riscos e benefícios. Está explicado como será feito o acompanhamento, e que poderá haver esclarecimentos se necessário. Está claro o direito de recusa e a confidencialidade dos dados. Está claro no TCLE que o sujeito irá receber uma cópia. Há dados do CEP e formas de contato com o pesquisador. Está claro que serão obtidas fotos dos pacientes, e como estas serão tratadas garantindo a confidencialidade.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.129.533

ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

CAMPINAS, 29 de Junho de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa "Avaliação dos produtos finais da glicosilação avançada (AGEs) medidos por autofluorescência da pele e sua associação com calcificação vascular e distúrbio mineral ósseo em pacientes em diálise peritoneal".

Nome dos responsáveis Kécia Rosana da Silva Quadros, Carolina Urbini dos Santos e Rodrigo Bueno de Oliveira.

Número do CAAE: 38108314.6.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo científico. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), visa esclarecer a finalidade do estudo, dúvidas, e assegurar seus direitos e deveres como paciente participante da pesquisa, e é elaborado em duas vias, uma delas ficará com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos: Os produtos finais da glicosilação avançada (AGEs, em inglês) são componentes que estão associados a doenças, quando encontrados no corpo humano. Essas substâncias químicas inflamatórias estão relacionadas com a progressão da doença coronariana, dos danos causados pelo diabetes e pela doença renal. Os seres humanos estão expostos a duas principais fontes de AGEs. A fonte externa, que vem da dieta e a fonte interna, quando são formados no próprio organismo, principalmente em pacientes com doenças dos rins. Existe um aparelho capaz de medir, de forma rápida e indolor, a quantidade dessas substâncias na pele. O objetivo deste estudo é dosar a quantidade de AGEs através da pele em pacientes com doença renal crônica (DRC) e em tratamento crônico por diálise peritoneal (DP) e relacionar essa medida com dados clínicos e exames de sangue, marcadores de doença cardiovascular e de doença mineral óssea.

Procedimentos:

1. Será preenchida uma ficha com algumas informações suas, tais como idade, sexo, dados da diálise peritoneal, doenças associadas como hipertensão e diabetes melito, tabagismo e medicações em uso, além de um recordatório alimentar de três dias, que será preenchido por você, na sua casa.
2. Será utilizado um aparelho, chamado AGE-Reader™, para medidas das substâncias chamadas AGEs em sua pele. O método é rápido, não-invasivo e indolor.
3. Os exames de sangue e imagens que serão analisados são os rotineiramente pedidos para pacientes com DRC em tratamento dialítico, além da guarda de 2 ml de soro para posterior análises bioquímicas. Se você não tiver feito recentemente, serão solicitados radiografias de mãos, pelve e abdome, densitometria mineral óssea e ecocardiograma.
4. Será realizada uma biópsia óssea, da região do quadril (crista ilíaca), sob anestesia local, com dupla marcação por tetraciclina (antibiótico que se liga ao osso e serve para estimativa da taxa de formação de tecido ósseo ao longo do tempo).

Desconfortos e riscos:

Agulhas intravenosas e exames de sangue: alguns riscos conhecidos, embora raros, estão associados à colocação de uma agulha na veia. Entre esses riscos estão: desconforto, a possibilidade de infecção, além de hematoma ou inchaço temporário.

Biópsia óssea: alguns riscos conhecidos, embora pouco frequentes, como hematoma, sangramento ou infecção local, e potencial risco de dispepsia causada pelo antibiótico usado por 2 dias seguidos, 10 dias e 3 dias antes da biópsia óssea. Não será necessária

internação hospitalar para a realização da biópsia, que será feita no centro de diálise. Você poderá ir embora após 2 horas de observação, devendo realizar repouso relativo por 24 horas após a biópsia óssea.

Benefícios: sua participação neste estudo poderá alterar o seu tratamento relativo ao controle dos distúrbios do cálcio, fosfato e hormônio da paratireoide (PTH), a partir dos resultados da biópsia óssea, ou pode simplesmente, não lhe trazer benefício algum. Entretanto, com base nos resultados obtidos, esperamos conhecer mais sobre a ação dos produtos finais da glicosilação avançada nos pacientes com DRC em diálise peritoneal e gerar maior conhecimento científico sobre a doença renal.

Acompanhamento e assistência: você será reavaliado pela equipe de pesquisadores logo após e uma semana depois da coleta do seu sangue, para verificar a ocorrência dos desconfortos e riscos citados acima para que, caso necessário, uma conduta terapêutica adequada possa ser adotada.

Sigilo e privacidade: você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Ressarcimento: você não terá ressarcimento de despesas ao participar do estudo, mas a coleta de exames será realizada dentro da sua rotina de comparecimento ao hospital para o seu tratamento habitual, exceto uma visita extra para coleta de dados e leitura de AGEs na pele com o aparelho já citado (AGE-Reader™).

Armazenamento de material: o seu sangue não será descartado, e haverá armazenamento para análises biológicas posteriores.

Contato: em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com:

Dra. Kélcia Rosana da Silva Quadros
Centro Integrado de Nefrologia – Unicamp, Rua Vital Brazil, 251, Cidade Universitária
“Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo – Campinas, SP,
Telefones: (19) 3521-7881 e (19) 98142-8477

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação no estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome e assinatura do(a) participante:

_____ Data: ____/____/____

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____

8.3 Participações complementares durante a pós-graduação

8.3.1 Publicações em coautoria - Artigos em revistas indexadas

8.3.1.1 Barreto J *et al.* *J Nephrol*, 2023; DOI: 10.1007/s40620-023-01705-w

Journal of Nephrology
https://doi.org/10.1007/s40620-023-01705-w

RESEARCH LETTER



Reference values of skin autofluorescence advanced glycation end-products in healthy and chronic kidney disease individuals: a propensity score matching analysis

Joaquim Barreto¹ · Rafael Y. Sano² · Cynthia Borges² · Wilson Nadruz Jr³ · Kelcia Quadros² · Andrei C. Sposito¹ · Rodrigo Bueno de Oliveira²

Received: 31 January 2023 / Accepted: 9 June 2023
© The Author(s) under exclusive licence to Italian Society of Nephrology 2023

Skin autofluorescence (SAF) as a proxy of advanced glycation end-product (AGE) levels has been pursued as a target for early prediction of adverse clinical outcomes [1]. Robust evidence supports that individuals with high SAF values display a higher risk of all-cause mortality, cardiovascular events, and kidney failure, compared to subjects with low SAF [1]. As SAF measurements demand a rapid, non-invasive assessment using validated AGE Reader devices, growing attention has been directed to the determination of reference values aimed at early detection of individuals at higher risk of long-term complications [1].

Skin autofluorescence values are predominantly determined by a finely regulated balance between AGE synthesis, which is increased by chronic metabolic stress (i.e., diabetes and smoking), and metabolic clearance, which is impaired by aging and kidney failure [1]. In line with this complex, multifactorial determination of SAF, in prior studies SAF has varied significantly across populations even after adjustment by potentially confounding factors [2–4]. For example, the SAF values of healthy subjects were higher in Saudi Arabia and Slovakia than in the Netherlands and China, whereas the presence of hypertension and diabetes were related to increased SAF in a recent study conducted in Tunisia [3, 5, 6]. At least partially, this may result from differences in

skin reflectance and dietary patterns, a known predictor of SAF that is susceptible to wide variations even across subjects from the same ethnic group [7]. Nevertheless, whether predicted SAF values from algorithms derived from studies conducted in ethnically diverse populations correlate to the SAF observed in Brazilian individuals is still unexplored.

To tackle this, we hereby analyzed SAF results collected from outpatient clinics located in Sao Paulo, Brazil. All participants signed an informed consent form, and this study was approved by the local ethics committee. Skin autofluorescence was measured in triplicate using the AGE-Reader mu device, and we carried out a dedicated interview for medical history, as well as physical examination, and peripheral blood sample collection. For each subject, the observed SAF was compared to the SAF predicted by the formula derived from a Dutch cohort (D-SAF) [2]. Methods are detailed in Supplementary material.

To assess the reference values of SAF for Brazilians, 736 individuals who were non-smokers and without diabetes or CKD were considered. This group had a mean $\pm$ standard deviation (SD) age of 44 ± 14 years, 406 (45%) were female and the mean $\pm$ SD SAF was 2.06 ± 0.52 AU. Age and SAF were linearly correlated (R square = 39.4%, $p < 0.001$), and gender influenced the effect of age on SAF ($p < 0.001$). After controlling for age, SAF was found to be higher in females (2.10 ± 0.02 AU), compared to males (1.99 ± 0.02 AU), with a mean standardized difference (MSD) of 0.11 ± 0.03 AU ($p < 0.001$). The equations that best predicted SAF based on age were $y = 1.22 + 0.020 \cdot x$ for females and $y = 0.87 + 0.026 \cdot x$ for males. (Fig. 1) Compared to D-SAF, SAF values were higher after controlling for age both in females (MSD: 0.27 ± 0.02 AU, $p = 0.001$) and males (MSD: 0.16 ± 0.02 AU, $p = 0.001$).

The SAF values of 163 individuals with CKD were compared to age- and gender- propensity matched controls (matching 1:1). The mean $\pm$ SD age was 54 ± 16 years

✉ Joaquim Barreto
joaquimbarretoantunes@gmail.com

¹ Laboratory of Atherosclerosis and Vascular Biology, Division of Cardiology, Unicamp, Rua Tessalia Vieira Camargo, 126 – Cidade Universitária–Campinas, Sao Paulo, SP, Brazil

² Laboratory for Evaluation of Mineral and Bone Disorders in Nephrology (LEMON), Division of Nephrology, Unicamp, Sao Paulo, Brazil

³ Division of Cardiology, Clinic Hospital, Unicamp, Sao Paulo, Brazil

8.3.1.2 Carbonara CEM *et al.* *PLOS One*, 2023; 18(4): e0284123. pp. 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0284123

PLOS ONE

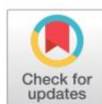
RESEARCH ARTICLE

Effect of aluminum accumulation on bone and cardiovascular risk in the current era

Cinthia E. M. Carbonara^{1,2}, Noemi A. V. Roza^{1,2}, Kelcia R. S. Quadros^{1,2}, Renata A. França², André B. A. Esteves², Celia R. Pavan², Joaquim Barreto^{2,3}, Luciane M. dos Reis⁴, Vanda Jorgetti⁴, Andrei C. Sposito³, Rodrigo Bueno Oliveira^{1,2*}

1 Nephrology Division, School of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil, **2** Laboratory for Evaluation of Mineral and Bone Metabolism in Nephrology (LEMON), School of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil, **3** Laboratory of Atherosclerosis and Vascular Biology, Cardiology Division, School of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil, **4** Laboratory of Renal Pathophysiology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

* rbo@unicamp.br



Abstract

Background

The prevalence of aluminum (Al) intoxication has declined over the past 3 decades. However, different groups still report on the diagnosis of Al in bone. Prolonged and low-intensity exposures to Al may not be captured by serum Al measurements, preventing its proper diagnosis. We hypothesize that bone Al accumulation may be related to bone and cardiovascular events in the current Era.

Aims

To detect the diagnosis of bone Al accumulation; to explore bone and cardiovascular consequences of Al accumulation.

Methods

This is a sub-analysis of *The Brazilian Registry of Bone Biopsy*, a prospective, multicentre cohort, with a mean follow-up of 3.4 years, including patients with CKD undergoing bone biopsy; bone fracture and major cardiovascular events (MACE) were adjudicated; Al accumulation was identified by solochrome-azurine staining; history of previous Al accumulation was registered based on information provided by the nephrologist who performed the bone biopsy; bone histomorphometry parameters, clinical data, and general biochemistry were registered.

Results

275 individuals were considered; 96 (35%) patients have diagnosed with bone Al accumulation and were younger [50 (41–56) vs. 55 (43–61) years; $p = 0.026$], had lower body mass index [23.5 (21.6–25.5) vs. 24.3 (22.1–27.8) kg/m^2 ; $p = 0.017$], higher dialysis vintage [108 (48–183) vs. 71 (28–132) months; $p = 0.002$], presented pruritus [23 (24%) vs. 20 (11%); p

OPEN ACCESS

Citation: Carbonara CEM, Roza NAV, Quadros KRS, França RA, Esteves ABA, Pavan CR, et al. (2023) Effect of aluminum accumulation on bone and cardiovascular risk in the current era. *PLoS ONE* 18(4): e0284123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284123>

Editor: Robert Daniel Blank, Medical College of Wisconsin, UNITED STATES

Received: July 29, 2022

Accepted: March 24, 2023

Published: April 20, 2023

Copyright: © 2023 Carbonara et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

8.3.1.3 Fonseca LF *et al.* *Braz J Nephrol*, 2021; 43(2):191-199. DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-2020-0119

ORIGINAL ARTICLE | ARTIGO ORIGINAL

AGEs accumulation is related to muscle degeneration and vascular calcification in peritoneal dialysis patients

O acúmulo de AGEs está relacionado à degeneração muscular e calcificação vascular em pacientes em diálise peritoneal

Authors

Lais de Faria Fonseca¹
 Anna Beatriz Araújo²
 Kécia Rosana da Silva Quadros^{1,2}
 Cinthia Esbrile Moraes Carbonara^{1,2}
 Sérgio San Juan Dertkigil³
 Andrei Carvalho Sposito²
 Rodrigo Bueno de Oliveira^{1,2}

¹Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Laboratório para o Estudo do Distúrbio Mineral e Ósseo em Nefrologia, Campinas, SP, Brasil.

²Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Clínica Médica, Campinas, SP, Brasil.

³Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Radiologia, Campinas, SP, Brasil.

Submitted on: 05/25/2020.
 Approved on: 11/20/2020.

Correspondence to:
 Rodrigo Bueno de Oliveira.
 E-mail: rbo@unicamp.br

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2020-0119>

ABSTRACT

Background: Patients with chronic kidney disease (CKD) are affected by dynapenia, sarcopenia, and vascular calcification. Advanced glycation end products (AGEs) may accumulate in peritoneal dialysis (PD) patients and favor sarcopenia via changes in collagen cross-linking, muscle protein breakdown, and the calcification of arterial smooth muscle cells via p38-MAPK activation. The aim of this study is to explore the relationships between AGEs, muscle degeneration, and coronary artery calcification. **Methods:** This was a clinical observational study in patients with CKD undergoing PD, in which serum and skin AGEs (AGEs-sAF), cumulative glucose load, muscle strength and functional tests, muscle ultrasounds with elastography, coronary artery calcium (CAC) quantification, and muscle density by multislice computed tomography were measured. **Results:** 27 patients aged 48±16 years, dialysis vintage of 27±17 months, had AGEs-sAF levels of 3.09±0.65 AU (elevated in 13 [87%] patients), grip strength levels of 26.2±9.2 kg (11 [42%] patients with dynapenia), gait speed of 1.04±0.3 m/s (abnormal in 14 [58%] patients) and “timed-up-and-go test” (TUG) of 10.5±2.2s (abnormal in 7 [26%] patients). Correlations between AGEs-sAF levels and femoral rectus elastography (R=-0.74; p=0.02), anterior-tibialis elastography (R=-0.68; p=0.04) and CAC (R=0.64; p=0.04) were detected. Cumulative glucose load correlated with femoral rectal elastography (R=-0.6; p=0.02), and serum glycated hemoglobin concentrations correlated with psoas muscle density (R=-0.58; p=0.04) and CAC correlated with psoas muscle density (R=0.57; p=0.01) and lumbar square muscle density (R=-0.63; p=0.005). **Conclusions:** The study revealed associations between AGEs

RESUMO

Histórico: Pacientes com doença renal crônica (DRC) são afetados pela dinapenia, sarcopenia e calcificação vascular. Produtos finais da glicação avançada (AGEs) podem se acumular em pacientes em diálise peritoneal (DP) e favorecer a sarcopenia por meio de alterações em ligações cruzadas do colágeno, quebra da proteína muscular e calcificação das células do músculo liso arterial por meio da ativação da p38-MAPK. O objetivo deste estudo é explorar as relações entre AGEs, degeneração muscular e calcificação da artéria coronária. **Métodos:** Este foi um estudo clínico observacional em pacientes com DRC submetidos à DP, no qual foram medidos os AGEs séricos e teciduais (AGEs-sAF), a carga cumulativa de glicose, a força muscular e testes funcionais, ultrassonografias musculares com elastografia, quantificação do cálcio da artéria coronária (CAC), e a densidade muscular por tomografia computadorizada multislice. **Resultados:** 27 pacientes com idade entre 48±16 anos, tempo de diálise entre 27±17 meses, tinham níveis de AGEs-sAF de 3,09±0,65 UA (elevado em 13 [87%] pacientes), níveis de força de prensão de 26,2±9,2 kg (11 [42%] pacientes com dinapenia), velocidade de marcha de 1,04±0,3 m/s (anormal em 14 [58%] pacientes) e teste “timed-up-and-go” (TUG) de 10,5±2,2s (anormal em 7 [26%] pacientes). Foram detectadas correlações entre os níveis AGEs-sAF e a elastografia do reto femoral (R=-0,74; p=0,02), a elastografia tibial anterior (R=-0,68; p=0,04) e a CAC (R=0,64; p=0,04). A carga cumulativa de glicose se correlacionou com a elastografia do reto femoral (R=-0,6; p=0,02), as concentrações séricas de hemoglobina glicada se correlacionaram com a densidade muscular do psoas (R=-0,58; p=0,04) e o CAC se correlacionou com a densidade do músculo psoas (R=0,57; p=0,01) e a densidade do músculo quadrado lombar (R=-0,63; p=0,005). **Conclusões:** O



8.3.1.4 Carbonara CEM *et al.* *Braz J Nephrol*, 2020; 42(2):138-146. DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-2019-0045

ORIGINAL ARTICLE | ARTIGO ORIGINAL

AGEs accumulation is related to muscle degeneration and vascular calcification in peritoneal dialysis patients

O acúmulo de AGEs está relacionado à degeneração muscular e calcificação vascular em pacientes em diálise peritoneal

Authors

Lais de Faria Fonseca¹
 Anna Beatriz Araújo²
 Kécia Rosana da Silva Quadros^{1,2}
 Cinthia Esbrile Moraes Carbonara^{1,2}
 Sérgio San Juan Dertkigil³
 Andrei Carvalho Sposito²
 Rodrigo Bueno de Oliveira^{1,2}

¹Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Laboratório para o Estudo do Distúrbio Mineral e Ósseo em Nefrologia, Campinas, SP, Brasil.

²Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Clínica Médica, Campinas, SP, Brasil.

³Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Radiologia, Campinas, SP, Brasil.

Submitted on: 05/25/2020.
 Approved on: 11/20/2020.

Correspondence to:
 Rodrigo Bueno de Oliveira.
 E-mail: rbo@unicamp.br

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2020-0119>

ABSTRACT

Background: Patients with chronic kidney disease (CKD) are affected by dynapenia, sarcopenia, and vascular calcification. Advanced glycation end products (AGEs) may accumulate in peritoneal dialysis (PD) patients and favor sarcopenia via changes in collagen cross-linking, muscle protein breakdown, and the calcification of arterial smooth muscle cells via p38-MAPK activation. The aim of this study is to explore the relationships between AGEs, muscle degeneration, and coronary artery calcification. **Methods:** This was a clinical observational study in patients with CKD undergoing PD, in which serum and skin AGEs (AGEs-sAF), cumulative glucose load, muscle strength and functional tests, muscle ultrasounds with elastography, coronary artery calcium (CAC) quantification, and muscle density by multislice computed tomography were measured. **Results:** 27 patients aged 48±16 years, dialysis vintage of 27±17 months, had AGEs-sAF levels of 3.09±0.65 AU (elevated in 13 [87%] patients), grip strength levels of 26.2±9.2 kg (11 [42%] patients with dynapenia), gait speed of 1.04±0.3 m/s (abnormal in 14 [58%] patients) and “timed-up-and-go test” (TUG) of 10.5±2.2s (abnormal in 7 [26%] patients). Correlations between AGEs-sAF levels and femoral rectus elastography (R=-0.74; p=0.02), anterior-tibialis elastography (R=-0.68; p=0.04) and CAC (R=0.64; p=0.04) were detected. Cumulative glucose load correlated with femoral rectal elastography (R=-0.6; p=0.02), and serum glycated hemoglobin concentrations correlated with psoas muscle density (R=-0.58; p=0.04) and CAC correlated with psoas muscle density (R=0.57; p=0.01) and lumbar square muscle density (R=-0.63; p=0.005). **Conclusions:** The study revealed associations between AGEs

RESUMO

Histórico: Pacientes com doença renal crônica (DRC) são afetados pela dinapenia, sarcopenia e calcificação vascular. Produtos finais da glicação avançada (AGEs) podem se acumular em pacientes em diálise peritoneal (DP) e favorecer a sarcopenia por meio de alterações em ligações cruzadas do colágeno, quebra da proteína muscular e calcificação das células do músculo liso arterial por meio da ativação da p38-MAPK. O objetivo deste estudo é explorar as relações entre AGEs, degeneração muscular e calcificação da artéria coronária. **Métodos:** Este foi um estudo clínico observacional em pacientes com DRC submetidos à DP, no qual foram medidos os AGEs séricos e teciduais (AGEs-sAF), a carga cumulativa de glicose, a força muscular e testes funcionais, ultrassonografias musculares com elastografia, quantificação do cálcio da artéria coronária (CAC), e a densidade muscular por tomografia computadorizada multislice. **Resultados:** 27 pacientes com idade entre 48±16 anos, tempo de diálise entre 27±17 meses, tinham níveis de AGEs-sAF de 3,09±0,65 UA (elevado em 13 [87%] pacientes), níveis de força de prensão de 26,2±9,2 kg (11 [42%] pacientes com dinapenia), velocidade de marcha de 1,04±0,3 m/s (anormal em 14 [58%] pacientes) e teste “timed-up-and-go” (TUG) de 10,5±2,2s (anormal em 7 [26%] pacientes). Foram detectadas correlações entre os níveis AGEs-sAF e a elastografia do reto femoral (R=-0,74; p=0,02), a elastografia tibial anterior (R=-0,68; p=0,04) e a CAC (R=0,64; p=0,04). A carga cumulativa de glicose se correlacionou com a elastografia do reto femoral (R=-0,6; p=0,02), as concentrações séricas de hemoglobina glicada se correlacionaram com a densidade muscular do psoas (R=-0,58; p=0,04) e o CAC se correlacionou com a densidade do músculo psoas (R=0,57; p=0,01) e a densidade do músculo quadrado lombar (R=-0,63; p=0,005). **Conclusões:** O



8.3.1.5 Meira RD *et al.* *Braz J Nephrol*, 2018; 40(2):201-205. DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-3882

CASE REPORT | RELATO DE CASO

The enigma of aluminum deposition in bone tissue from a patient with chronic kidney disease: a case report

O enigma da deposição de alumínio no tecido ósseo de um paciente com doença renal crônica: relato de caso

Authors

Rodrigo Dias de Meira¹
Cinthia Esbrile Moraes
Carbonara^{1,2}
Kélcia Rosana da Silva Quadros^{1,2}
Carolina Urbini dos Santos¹
Patrícia Schincariol¹
Gustavo de Souza Pêsoa³
Marco Aurélio Zezzi Arruda³
Vanda Jorgetti⁴
Rodrigo Bueno de Oliveira^{1,2}

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Medicina Interna, Campinas, SP, Brasil.

² Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Medicina Interna (Nefrologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Laboratório para o Estudo do Distúrbio Mineral e Ósseo em Nefrologia (LEMON), Campinas, SP, Brasil.

³ Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização, Departamento de Química Analítica, Campinas, SP, Brasil.

⁴ Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Interna, São Paulo, SP, Brasil.

Submitted on: 08/01/2017

Approved on: 09/24/2017

Correspondence to:
Rodrigo Bueno de Oliveira.
E-mail: rodrigobueno.hc@gmail.com

DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-3882

ABSTRACT

About four decades ago, the relationship between dialysis-dementia and aluminum (Al) began to be established. The restriction of drugs containing Al and improvements on water quality used for dialysis resulted in the clinical disappearance of Al intoxication. However, high prevalence of Al deposition in bone tissue from Brazilian dialysis patients is still being detected. Through the case report of a patient on hemodialysis (HD) for one year, presenting significant Al deposition in bone tissue, we speculated if this problem is not being underestimated. We used extensive investigation to identify potential sources of Al exposure with a careful review of medication history and water quality controls. Al concentration was measured by different methods, including mass spectrometry, in poly-electrolyte concentrate solutions and solution for peritoneal dialysis, in an attempt to elucidate the possible sources of contamination. The objective of this case report is to alert the medical community about a potential high prevalence of Al deposition in bone tissue and to discuss the possible sources of contamination in patients with chronic kidney disease (CKD).

Keywords: Kidney Failure, Chronic; Dialysis; Bone Diseases, Metabolic; Aluminum.

RESUMO

Cerca de quatro décadas atrás, a relação entre demência relacionada à diálise e alumínio (Al) começou a ser estabelecida. A restrição de medicamentos contendo Al e melhorias na qualidade da água utilizada na diálise resultaram no desaparecimento clínico da intoxicação por Al. Contudo, no Brasil continua a ser identificada uma elevada prevalência de deposição de Al no tecido ósseo de pacientes em diálise. O presente relato de caso de um paciente em hemodiálise (HD) há um ano com deposição significativa de Al no tecido ósseo nos leva a especular se esse problema não tem sido subestimado. Realizamos uma ampla investigação para identificar possíveis fontes de exposição ao Al, com uma revisão cuidadosa do histórico de medicação e dos controles de qualidade da água. A concentração de Al foi medida por diferentes métodos, incluindo espectrometria de massa, nos concentrados polieletrólitos para hemodiálise e soluções de diálise peritoneal, na tentativa de elucidar as possíveis fontes de contaminação. O objetivo do presente relato de caso é alertar a comunidade médica sobre uma possível elevada prevalência de deposição de Al no tecido ósseo e discutir as possíveis fontes de contaminação nos pacientes com doença renal crônica (DRC).

Palavras-chave: Doença Renal Crônica; Diálise; Doenças Ósseas Metabólicas; Alumínio.

INTRODUCTION

Aluminum (Al) is the most abundant metal on earth and human beings are often exposed to it.¹ The accumulation and toxicity of this metal was noted in hemodialysis (HD) patients in the 1970's, and osteomalacia, anemia, and dementia were

associated with exposure to water, dialysate preparations, or drugs containing Al.²⁻⁴ Since improvements on water treatment were established and the use of non-Al-containing phosphate (P) binders became standard practice, the prevalence of Al intoxication with clinical signs almost disappeared.^{4,5} Therefore, it was assumed



8.4 Prêmios recebidos

8.4.1 Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais

8.4.1.1 Prêmio Massola 2019 - XX Congresso Paulista de Nefrologia - 3º lugar, Sociedade de Nefrologia do Estado de São Paulo.



A SONESP – Sociedade de Nefrologia do Estado de São Paulo certifica que o Trabalho intitulado “SARCOPENIA E PRODUTOS FINAIS DA GLICOLISAÇÃO AVANÇADA (AGEs) EM PACIENTES EM DIÁLISE PERITONEAL.” dos Autores: *Lais de Faria Fonseca, Anna Beatriz Araújo, Cinthia Esbrile Moraes Carbonara, Noemi Angélica Vieira Roza, Rafael Sano, Sérgio San Juan Dertkigil, Kécia Rosana da Silva Quadros e Rodrigo Bueno de Oliveira*, do Departamento de Medicina Interna (Nefrologia), da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil, recebeu o 3º lugar do PRÊMIO MASSOLA 2019, concedido a trabalhos científicos em Diálise Peritoneal, divulgado e entregue em 28 de setembro de 2019, durante a Apresentação Temática do XX Congresso Paulista de Nefrologia, em Atibaia.

São Paulo, 28 de setembro de 2019.

Profa. Dra. Cibele Isaac Saad Rodrigues
Presidente

Prof. Dr. José Medina Pestana
Diretor Científico

8.4.1.2 Prêmio Vanda Jorgetti - 2018 - XXIX Congresso Brasileiro de Nefrologia - Melhor trabalho na área de DMO-DRC, Sociedade Brasileira de Nefrologia.



8.5 Permissão/autorização junto à editora para a inclusão dos arquivos na tese.



Advanced Glycation End Products and Bone Metabolism in Patients with Chronic Kidney Disease

Author: Kélcia R. S. Quadros, Noemi A. V. Roza, Renata A. França, et al

Publication: JBMR Plus

Publisher: John Wiley and Sons

Date: Feb 16, 2023

© 2023 The Authors. JBMR Plus published by Wiley Periodicals LLC on behalf of American Society for Bone and Mineral Research.

Open Access Article

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

For an understanding of what is meant by the terms of the Creative Commons License, please refer to [Wiley's Open Access Terms and Conditions](#).

Permission is not required for this type of reuse.