



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RENATA DE ALMEIDA FRANÇA

**AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA
(AGEs) MEDIDOS POR AUTOFLUORESCÊNCIA DA PELE E SUA
ASSOCIAÇÃO COM DOENÇA CARDIOVASCULAR E DISTÚRBO
MINERAL ÓSSEO EM PACIENTES EM HEMODIÁLISE**

CAMPINAS

2017

RENATA DE ALMEIDA FRANÇA

**AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA
(AGEs) MEDIDOS POR AUTOFLUORESCÊNCIA DA PELE E SUA
ASSOCIAÇÃO COM DOENÇA CARDIOVASCULAR E DISTÚRBO
MINERAL ÓSSEO EM PACIENTES EM HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título Mestra em Ciências na área de concentração de Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA

COORIENTADORA: PROFA. DRA. JACQUELINE COSTA TEIXEIRA CARAMORI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA RENATA DE ALMEIDA FRANÇA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA

CAMPINAS

2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

F844a França, Renata de Almeida, 1987-
Avaliação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) medidos por autofluorescência da pele e sua associação com doença cardiovascular e distúrbio mineral ósseo em pacientes em hemodiálise / Renata de Almeida França. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Rodrigo Bueno de Oliveira.
Coorientador: Jacqueline Costa Teixeira Caramori.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença renal crônica. 2. Hemodiálise. 3. Produtos finais de glicação avançada. 4. Doença cardiovascular. 5. Distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica. I. Oliveira, Rodrigo Bueno de, 1975-. II. Caramori, Jacqueline Costa Teixeira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of advanced glycation end products (AGEs) measure by skin autofluorescence and its relations with cardiovascular disease and chronic kidney disease-mineral and bone disorder in hemodialysis patients

Palavras-chave em inglês:

Chronic kidney disease
Hemodialysis
Advanced glycation end products
Cardiovascular disease
Chronic kidney disease-mineral and bone disorder

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Rodrigo Bueno de Oliveira [Orientador]
Eduardo Homsí
Rosa Maria Affonso Moysés

Data de defesa: 29-11-2017

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

RENATA DE ALMEIDA FRANÇA

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA

**COORIENTADORA: PROFA. DRA. JACQUELINE COSTA TEIXEIRA
CARAMORI**

MEMBROS:

1. PROF. DR. RODRIGO BUENO DE OLIVEIRA

2. PROF. DR. EDUARDO HOMSI

3. PROFA. DRA. ROSA MARIA AFFONSO MOYSÉS

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 da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 29/11/2017

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Heloisa e Celso, exemplos de força e dedicação, que com seu amor incondicional sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Ao meu marido Vítor, amor da minha vida, que superou todas as dificuldades impostas por esse sonho, encarando este como seu. Obrigada por acreditar em mim até mesmo quando eu duvidei. Sem o seu apoio eu não conseguiria chegar até aqui. Te amo eternamente!

Aos meus irmãos amados Victor e Gustavo, agradeço o companheirismo e o amor. Vocês fazem parte dos principais motivos de alegria em minha vida.

Aos amigos Kélcia, André e Cinthia, que compartilharam os momentos mais árduos dessa caminhada, e se tornaram muito mais do que colegas de pós-graduação. Guardarei vocês com carinho e gratidão eternos.

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder a graça de realizar esse projeto e me manter firme diante de todas as dificuldades.

Ao professor Dr. Rodrigo Bueno de Oliveira, pela luta incansável em aperfeiçoar o projeto e nos fazer crescer como pesquisadores. Obrigada por todos os ensinamentos.

À professora Jacqueline Caramori, que mesmo sem me conhecer, aceitou o desafio de ser coorientadora desse projeto e forneceu ajuda imprescindível para sua realização.

Ao Dr. João Henrique Castro por sua imensa ajuda durante toda a coleta de dados em Botucatu, ensinando a realização de biópsia óssea e convidando pacientes do serviço de hemodiálise da UNESP. Sem a sua ajuda não teríamos conseguido concluir o projeto.

Aos amigos companheiros de pós-graduação, agradeço a Deus por terem compartilhado esse momento único comigo. Sem dúvidas o suporte de vocês foi essencial para me manter firme durante essa caminhada.

Aos amigos da equipe da nefrologia do Centro Integrado de Nefrologia e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, esse projeto não seria viável sem a participação dos enfermeiros e médicos, nos auxiliando tanto na seleção e convite de pacientes quanto na realização das biópsias ósseas.

À amiga Giovana Mariani, que com sua companhia constante, me deu um apoio essencial para que a estadia em Campinas durante esses dois anos fossem mais leves.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A doença renal crônica (DRC) apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sendo a doença cardiovascular (DCV) e o distúrbio mineral e ósseo (DMO) complicações frequentes. Os produtos finais da glicação avançada (AGEs) são toxinas urêmicas associadas a DCV e possivelmente ao DMO-DRC. Seu acúmulo tecidual pode ser quantificado através do AGE-ReaderTM, aparelho que utiliza a leitura da autofluorescência da pele (sAF) e se encontra validado em pacientes com DRC. **OBJETIVOS:** avaliar as relações entre os níveis teciduais cutâneos, séricos e ingestão de AGEs totais e frações com parâmetros clínicos, bioquímicos e de imagem relativos à DCV e de DMO em pacientes com DRC em hemodiálise (HD). **MÉTODOS:** estudo clínico observacional, transversal no qual foram incluídos 32 pacientes em HD a partir do Hospital de Clínicas da UNICAMP e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu; 37 indivíduos hígidos (Grupo Controle) foram incluídos para comparação. Foram coletados dados demográficos, clínicos e laboratoriais, e realizados leitura da sAF, aferição do índice tornozelo-braquial (ITB) por ultrassonografia Doppler, e registro alimentar para quantificação de consumo de AGEs totais, carboximetilisina (CML) e metilglioxal (MG). O Grupo HD realizou exames de imagem (radiografias de quadril, mãos e abdome lateral, ecocardiograma transtorácico e densitometria óssea), dosagem sérica de CML e análise histomorfométrica semi-quantitativa do tecido ósseo a partir de amostra obtida através de biópsia óssea. **RESULTADOS:** Os níveis de AGEs-sAF foram elevados para a idade no grupos HD e Controle, porém mais elevados no primeiro (2,8 UA vs. 2,4 UA; $p = 0,005$). Por outro lado, a ingestão de AGEs totais (11.943 ± 5.581 KU vs. 8.564 ± 3.702 KU; $p = 0,016$) e suas frações analisadas, CML (4.213 ± 3.941 KU vs. 2.560 ± 1.792 KU; $p = 0,003$) e MG (14.648 ± 10.902 nmol vs. 10.664 ± 5.480 nmol; $p = 0,018$), foi maior no Grupo Controle. A ingestão de AGEs total esteve associada à uma menor fração de ejeção (FE) cardíaca ($R = -0,451$; $p = 0,035$) e maior ITB ($R = 0,456$; $p = 0,038$). A maioria dos pacientes submetidos à biópsia óssea foi diagnosticada com osteoporose ($N = 12$; 57%), tendo esse grupo apresentado menor ingestão de AGEs totais. Os portadores de osteíte fibrosa (OF), principal tipo de osteodistrofia renal diagnosticado, apresentaram maiores valores de CML na dieta e AGEs-sAF. **CONCLUSÕES:** Os presentes achados sugerem associação de AGEs com disfunção sistólica, rigidez vascular e distúrbio do mineral e ósseo em pacientes em HD, como a OF e a osteoporose. Estudos futuros são necessários para elucidar a natureza da associação entre AGEs, DCV e DMO-DRC, visando sugerir um novo alvo terapêutico para redução de morbimortalidade desta população.

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

ABSTRACT

INTRODUCTION: Chronic kidney disease (CKD) is associated with high morbidity and mortality rates, main causes related with cardiovascular disease (CVD) and bone mineral disorder (CKD-BMD). Advanced glycation end-products (AGEs) are uremic toxins that play a role on development of CVD and CKD-BMD. The measurement of skin autofluorescence (sAF) is a noninvasive method to assess the level of AGEs in tissue, validated in CKD patients. **AIMS:** Evaluate in hemodialysis (HD) patients the relationships among AGEs detected via sAF, serum and dietary intake, and metabolic and structural parameters of bone and cardiovascular disease, including vascular calcification (VC) evaluation. **METHODS:** An observational, transversal study that had included 32 patients undergoing HD at Hospital das Clínicas da UNICAMP and Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu; and 37 healthy subjects (Control Group). All subjects performed biochemical tests, ankle-brachial index (ABI) measurement by Doppler ultrasound, AGEs-Saf and quantification of dietary AGEs, carboxymethyl-lysine (CML) and methylglyoxal (MG) intakes by three-day dietary record. HD Group underwent hip, hands and lateral abdominal x-rays; transthoracic echocardiography; bone densitometry; serum CML; and semi-quantitative bone histomorphometric analysis. **RESULTS:** AGEs-sAF levels were elevated according to age in both HD and Control groups, however were higher in CKD patients (2.8 UA *vs.* 2.4 UA; $p = 0.005$). Dietary intake of total AGEs ($11,943 \pm 5,581$ KU *vs.* $8,564 \pm 3,702$ KU; $p = 0.016$), CML ($4,213 \pm 3,941$ KU *vs.* $2,560 \pm 1,792$ KU; $p = 0.003$) and MG ($14,648 \pm 10,902$ nmol *vs.* $10,664 \pm 5,480$ nmol; $p = 0.018$) were higher at Control Group. Total AGEs ingestion was associated with lower values of cardiac ejection fraction ($R = -0.451$; $p = 0.035$) and higher ABI ($R = 0.456$; $p = 0.038$). The most part of patients that underwent bone biopsy was diagnosed with osteoporosis ($N = 12$; 57%), and this group had lower total AGEs intake. The most frequent osteodystrophy type was osteitis fibrosa (OF) , which was associated with higher CML intake and AGEs-sAF. **CONCLUSION :** Our study suggests AGEs association with systolic cardiac dysfunction, vascular stiffness and bone disorders related with BMD-CKD like OF and osteoporosis in HD patients. Future studies are needed to clarify the association of AGEs, CVD and BMD-CKD, suggesting a new therapeutic target able to reduce morbidity and mortality in this population.

Key-words: chronic kidney disease; hemodialysis; advanced glycation end products; cardiovascular disease; chronic kidney disease-mineral and bone disorder.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	Produtos finais da glicação avançada (do inglês, <i>Advanced glycation end-products</i>)
AVE	Acidente vascular encefálico
CA	Circunferência abdominal
CQ	Circunferência de quadril
CIN	Centro Integrado de Nefrologia
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
CML	Carboximetil-lisina
CV	Calcificação vascular
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
DCV	Doença cardiovascular
DEXA	Densitometria óssea por raios-X de dupla energia
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMO	Distúrbio mineral-ósseo
DOA	Doença óssea adinâmica
DP	Desvio-padrão
DRC	Doença renal crônica
ELISA	Imunoensaio enzimático
EPM	Escola Paulista de Medicina
FE	Fração de ejeção
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
HC	Hospital das Clínicas
HD	Hemodiálise
HDF	Hemodiafiltração
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês, <i>High-density lipoprotein</i>)
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IMC	Índice de massa corporal
ITB	Índice tornozelo-braquial
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>

KU	Quilo unidade
MG	Metilglioxal
NA	Não se aplica
OF	Osteíte fibrosa
OR	Osteodistrofia renal
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína-C reativa
PTH	Hormônio da paratireoide
PTHi	Hormônio intacto da paratireóide
RAGEs	Receptores de AGEs
RCQ	Relação cintura-quadril
RCV	Risco cardiovascular
sAF	Autofluorescência da pele
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFG	Taxa de filtração glomerular
TIBC	Capacidade total de ligação do ferro à transferrina (do inglês, <i>Total iron binding capacity</i>)
TMV	<i>Turnover</i> -Mineralização-Volume
UA	Unidades arbitrárias
UF	Ultrafiltração
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VE	Ventrículo esquerdo
VHS	Velocidade de hemossedimentação

LISTA DE SÍMBOLOS

TM	Marca comercial, do inglês <i>Trade Mark</i>
mg/dL	Miligramas por decilitro
mL	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercúrio
pg/mL	Picogramas por mililitro
ng/mL	Nanogramas por mililitro
g	Gramas
<	Menor
>	Maior
cm	Centímetros
±	Mais ou menos
P	Significância estatística
DP	Média mais ou menos desvio padrão
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	18
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Desenho do estudo e população	18
3.2	Dados clínicos, demográficos e laboratoriais	19
3.3	Medidas antropométricas	20
3.4	Exames de imagem	21
3.5	Medida de AGEs na pele	23
3.6	Avaliação nutricional	24
3.7	Biópsia óssea	24
3.8	Análise estatística	25
4.	RESULTADOS	26
5.	DISCUSSÃO	34
6.	CONCLUSÕES	37
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
8.	ANEXOS	47
8.1	ANEXO I: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	47
8.2	ANEXO II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	52
8.3	ANEXO III: Artigo publicado no Jornal Brasileiro de Nefrologia	57
8.4	ANEXO IV: Artigo submetido para publicação	66

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) apresenta elevadas taxas de incidência e prevalência, assim como de morbidade e mortalidade, configurando um crescente problema de saúde global que acomete cerca de 10-15% da população mundial. (1,2) O conceito mais atual de DRC foi sugerido pelo *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)* e engloba alterações estruturais ou funcionais renais que estejam presentes por mais de três meses, associadas ou não a redução na taxa de filtração glomerular (TFG), mas que possam acarretar redução desta. (3) No Brasil, de acordo com o último censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia, estima-se que no ano de 2016 já existiam 122.825 pacientes em terapia renal substitutiva, representando um aumento de 73% nos últimos 10 anos. A hemodiálise (HD) se destaca como modalidade de terapia dialítica mais comumente utilizada, englobando 92,1% desta população. (4)

As causas mais frequentes de DRC são a hipertensão arterial e o *diabetes mellitus* (DM), condições intimamente relacionadas com doença aterosclerótica e calcificação vascular. Soma-se a isso o fato da DRC ser um fator independente de doença cardiovascular (DCV), principalmente quando associada ao distúrbio mineral e ósseo da DRC (DMO-DRC), conferindo ao paciente uma amplificação do risco global de DCV, principal causa de mortalidade desses pacientes. (5–7) Atualmente a taxa de mortalidade em portadores de DRC se encontra maior do que o dobro que a de indivíduos sem diagnóstico de DRC, mesmo após ajuste para sexo, idade e raça. (8)

Os produtos finais de glicação avançada [*advanced glycation end products*, (AGEs)] são toxinas urêmicas aparentemente envolvidas na fisiopatologia da DCV e do DMO-DRC, embora por mecanismos não completamente esclarecidos. Estas toxinas se encontram em níveis elevados em portadores de DRC devido à redução da sua excreção e ao aumento na sua produção. (9) Os AGEs se acumulam mesmo em pacientes urêmicos não-diabéticos a despeito da manutenção de glicemias normais, e este acúmulo é proporcional a taxa de filtração glomerular. (9) Já os níveis plasmáticos de AGEs, como a pentosidina e a carboximetil-lisina (CML), entre pacientes em terapia dialítica, se encontram elevados de forma semelhante tanto em portadores de DM quanto não-diabéticos. (9)

Os AGEs interagem com estruturas biológicas modificando suas propriedades química e funcional, por meio de geração de radicais livres, formação de ligação cruzada com proteínas e/ou interações com diversos receptores celulares, aumentando o estresse oxidativo e a expressão de fatores inflamatórios. (10,11) As duas principais fontes de AGEs são a exógena, oriunda tanto da ingestão de alimentos processados sob altas temperaturas, quanto do uso de tabaco, e endógena, na

qual os AGEs são formados a partir da exposição contínua à hiperglicemia, hiperlipidemia ou estresse oxidativo. (12)

A formação dos AGEs ocorre a partir de reações não-enzimáticas entre açúcares redutores ou lipídios oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos. (11) A via clássica de Maillard, também denominada glicação, se inicia com a formação de uma base de Schiff instável, através da reação entre um grupo carbonila de um açúcar redutor e um grupo amina. Em seguida, a base de Schiff sofre rearranjos e origina o produto de Amadori, estrutura mais estável, porém ainda reversível, conhecida como produto inicial da via de Maillard. O produto de Amadori (por exemplo, a hemoglobina glicosilada e a frutossamina) possui grupos carbonilos que reagem com grupos aminas, sofrendo um processo lento de rearranjo estrutural para assim formar os AGEs. (11,13)

A via alternativa, ou do estresse carbonílico, ocorre através da oxidação de lipídeos e açúcares, gerando produtos que também podem ser denominados produtos da lipoxidação (ALEs) ou da glicoxidação avançada, respectivamente. Esta via se inicia com a formação de compostos dicarbonílicos ou oxaldeídos altamente reativos, como por exemplo o metilglioxal (MG) e o glioxal, que interagem com aminoácidos para originar os AGEs. (11,13) (Figura 1).

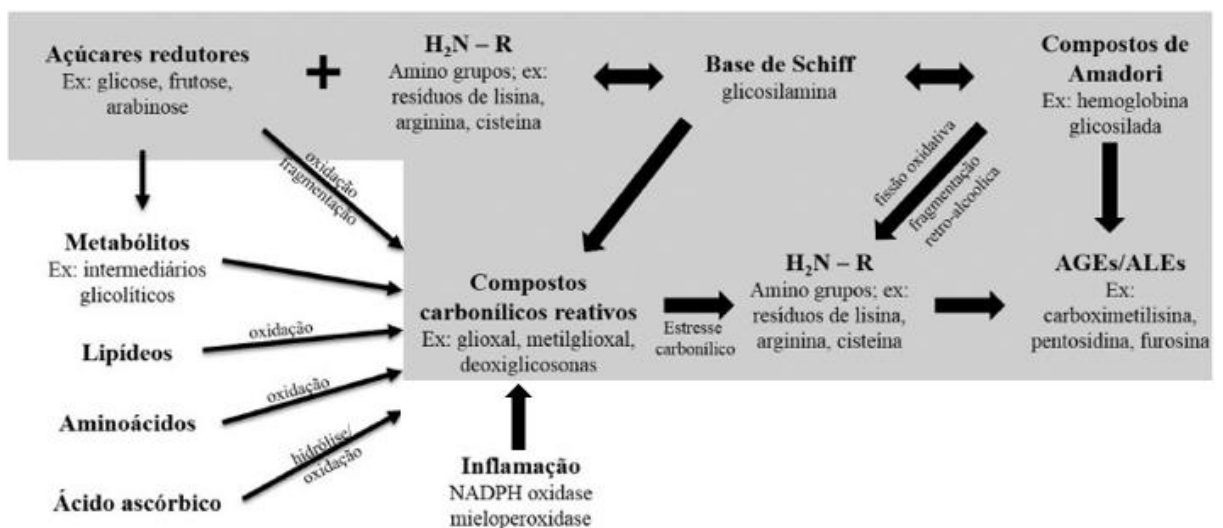


Figura 1. Vias de formação de AGEs e ALEs. (14)

Por outro lado, o organismo é capaz ativar sistemas enzimáticos para atenuar a formação endógena de AGEs que incluem agentes que atuam na detoxificação de intermediários dicarbonílicos reativos, como a oxaldeído redutase e a aldose redutase, e enzimas que interrompem as reações de glicação em diferentes estágios, como glioxilase I e II, a frutossamina-3-cinase e a frutossamina oxidase. (15) Já a remoção dos AGEs formados nos componentes teciduais é realizada

pela proteólise extracelular ou pelas células *scavenger*, como os macrófagos, que endocitam AGEs via receptores e, após a degradação intracelular, liberam na circulação AGE-peptídeos solúveis e de baixo peso molecular, para serem excretados com a urina. (16)

Existem fatores adicionais relacionados à terapia renal substitutiva que podem interferir no acúmulo tecidual de AGEs em pacientes em diálise como tempo em terapia dialítica, duração da diálise e exposição à glicose, esta última principalmente em diálise peritoneal. Essa influência da diálise é sugerida pelo fato do nível de AGEs tecidual em pacientes diabéticos em HD ser mais elevado do que diabéticos na mesma idade que se encontram fora de diálise. (9)

As diferentes modalidades de HD são capazes de reduzir nos níveis séricos de AGEs e seu consequente acúmulo nos tecidos, porém não reduzem os níveis plasmáticos de proteínas ligadoras de AGEs. Uma única sessão de hemodiafiltração (HDF) atinge níveis séricos mais baixos de AGEs livres quando comparada à HD convencional, independente do fluxo de dialisato utilizado. (17) Outros fatores relacionados à diálise influenciam os níveis de AGEs sérico: o material do capilar, com níveis mais baixos associados ao uso de membranas de polissulfona; (18) o tamanho do poro da membrana capilar, as de alto fluxo alcançando reduções maiores de AGEs; (19) frequência de HD, com melhores controles de AGEs em esquemas de HD diária; (20) e o tipo de dialisato, o ultrapuro capaz de maior depuração de AGEs. (21)

Os AGEs apresentam diversos tipos de receptores, sendo o principal representante deste grupo o receptor de AGEs (RAGEs), responsável pelo início da sinalização intracelular pró-inflamatória que desencadeia a ativação e translocação do fator de transcrição nuclear kappa B. Além disso, existem receptores que atuam na *clearance* e detoxificação dos AGEs, como os receptores *scavenger* classe A tipo I e II; o receptor oligossacaril transferase-48 (AGE-R1); a fosfoproteína 80 K-H (AGE-R2); e a galectina-3 (AGE-R3). (22)

Especula-se que o acúmulo de AGEs em pacientes com DRC interfira negativamente sobre a sistema cardiovascular induzindo disfunção endotelial, rigidez arterial, formação de placas ateroscleróticas e calcificação vascular (CV). (23,24) Um dos mecanismos propostos seria a ligação dos AGEs aos RAGEs no colágeno e elastina da matriz dos vasos sanguíneos, alterando a regulação vasomotora do endotélio, adesão de plaquetas, e induzindo proliferação celular e formação de radicais oxidativos. (25)

O envolvimento dos AGEs na aterosclerose já foi sugerido tanto pela detecção de AGEs no interior das placas de ateroma, quanto pela inibição de formação destas placas após instituição de

terapia para redução de AGEs e bloqueio dos RAGEs. (26,27) Existe evidência clínica de associação entre os níveis séricos de pentosidina e de AGEs totais com valores de índice tornozelo-braquial (ITB) $\leq 0,9$, utilizados para diagnóstico de doença arterial obstrutiva periférica (DAOP). (28) Além disso, já se demonstrou níveis de AGEs na pele mais elevados em portadores de DAOP, diagnosticados através do ITB. (29) Mesmo em indivíduos autorreferidos hígidos, os níveis séricos mais elevados de pentosidina se correlacionam com ITB entre 0,9 a 1,1, podendo significar DAOP latente. (30)

Já com relação ao papel dos AGEs no desenvolvimento de CV, existem até o presente momento somente estudos *in vitro* que demonstram a expressão de AGEs em sítios de vasos calcificados, através de imunohistoquímica, (23) e a capacidade dos AGEs de induzirem a diferenciação das células musculares lisas em células osteoblasto-like. (31,32) Esta diferenciação ocorre a partir da interação dos AGEs com os RAGEs, promovendo a expressão de proteínas específicas do tecido ósseo como a fosfatase alcalina e a osteocalcina. (31,32)

Os AGEs também exerceriam influência na fisiopatologia do desenvolvimento de insuficiência cardíaca sistólica. Estas toxinas são capazes de induzir fibrose cardíaca através de ativação de fibroblastos cardíacos por meio dos RAGEs, além de reduzir a concentração de cálcio intracelular em cardiomiócitos e acelerar a progressão de coronariopatia. (33–35)

Outra ação deletéria dos AGEs ocorre no tecido ósseo através de alterações na ultraestrutura óssea, como a sua ligação de forma cruzada com as fibras de colágeno, (36) assim como modulação negativa da atividade celular no processo de remodelação óssea. (37) Embora os mecanismos ainda não sejam totalmente esclarecidos, estudos *in vitro* sugerem que os AGEs causam um desequilíbrio na remodelação óssea ao suprimir a mineralização induzindo a apoptose anormal de osteoblastos com redução da massa trabecular (38) e inibindo a diferenciação dos osteoblastos; (39,40) e ao estimular a reabsorção óssea aumentando a atividade de osteoclastos (37,41) e a liberação de citocinas indutoras de reabsorção (p.ex. IL-1 β) pelos macrófagos. (42,43)

Estes prejuízos na formação e remodelação ósseas induzidos pelos AGEs também foram demonstrados através da associação de níveis séricos elevados destas toxinas em portadores de osteoporose. (44,45) Além disso, estudo *in vitro* desenvolvido por Odetti *et al* apresentou maior concentração de pentosidina na cortical de ossos com menor densidade óssea. (46)

Atualmente há poucas evidências de associação entre AGEs e o metabolismo mineral e ósseo em portadores de DRC, e especula-se que os AGEs estariam implicados principalmente na fisiopatologia da doença óssea adinâmica (DOA), que é um dos tipos de osteodistrofia renal. (47,48)

Existem estudos de cultura de célula que demonstram o envolvimento dos AGEs na patogênese da DOA através da inibição da atividade osteoblástica e da secreção de hormônio da paratireoide (PTH). (49)

Vários métodos foram testados para mensurar os níveis de AGEs, desde a dosagem sérica por ELISA até ensaios imunohistoquímicos em tecidos. Há mais de 10 anos foi desenvolvido um método não invasivo indireto capaz de mensurar o acúmulo de AGEs tecidual baseado na autofluorescência emitida pela pele (sAF): o instrumento AGE-Reader™. (9,50) O método foi avaliado e validado comparativamente com biópsias de pele de sujeitos hígidos, em pacientes com DM e pacientes com DRC, um dos estudos inclusive em pacientes em HD. (50,51) Estudos relacionam a medida de AGEs por meio da sAF como um preditor independente da morbidade e mortalidade cardiovascular em pacientes com DRC. (9,24) Acredita-se que nesses pacientes, fatores adicionais relacionados à terapia renal substitutiva favoreçam o acúmulo de AGEs tecidual o que potencializaria a aplicação da medida da sAF nesta população. Esses fatores seriam o tempo em terapia dialítica, a duração das sessões de diálise e a exposição à glicose principalmente em diálise peritoneal. (9) A medida de AGEs por sAF tem a vantagem de não se alterar após uma única sessão de HD, o que ocorre com os AGEs séricos, flexibilizando seu uso sem a necessidade de sincronia com as sessões de diálise, além de ser método não invasivo. (52,53)

2. OBJETIVOS

O presente estudo clínico observacional e transversal se propõe a investigar associações entre AGEs avaliados indiretamente por meio da medida da sAF, níveis séricos de CML, e ingestão dietética de AGEs totais e frações com parâmetros de DMO e de DCV em uma população de pacientes com DRC em HD.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo e população

Estudo clínico, transversal, controlado que incluiu um “Grupo HD” composto por um total de 32 pacientes em HD provenientes de três serviços de diálise: Centro Integrado de Nefrologia (CIN) do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (N = 7), do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (FMB-UNESP) (N = 16) ou de outros serviços de HD da região de Campinas (N = 9), mas

que realizavam acompanhamento ambulatorial no CIN. “Grupo Controle” foi constituído por 37 voluntários autorreferidos como hígidos. A maioria dos pacientes do Grupo HD (N = 23; 71,8%) realizavam sessões de HD com duração de quatro horas, com membranas de alto fluxo e alta eficiência, três vezes por semana, com fluxo de dialisato de 500 mL/min e fluxo de sangue 350 mL/min. O recrutamento dos participantes e a coleta de dados ocorreram no período de agosto de 2015 a novembro de 2016.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HC-UNICAMP através da Plataforma Brasil (CAAE: 45943115.9.0000.5404) (Anexo 1). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) por escrito foi fornecido a todos os participantes (Anexo 2). Quando o paciente não podia fornecer o consentimento informado por escrito, o documento foi apresentado ao seu responsável legal.

Foram incluídos no estudo pacientes em HD há pelo menos três meses, com idade >20 anos e que assinaram o TCLE. Os critérios de exclusão foram: cor da pele que não permita o uso do AGE-Reader™ (de acordo com informação do fabricante, peles dos fototipos “V” e “VI” da classificação de Fitzpatrick), (54) portador de DM, história prévia de paratireoidectomia, estar em programação de transferência para outro serviço de HD, neoplasia avançada, doença infecciosa ou inflamatória crônica graves, doença terminal com expectativa de vida menor que 1 ano, icterícia, história prévia de transplante de órgão.

O grupo controle foi composto por pessoas que se autorreferiram como hígidas, de diferentes faixas etárias definidas pelos seguintes critérios: (1) idade entre 20 a 70 anos; (2) creatinina sérica $\leq 1,2$ mg/dL; (3) albumina $> 3,5$ mg/dL; (4) não-diabéticos; (5) ausência de doença inflamatória crônica; (6) não-gestantes (mulheres); (7) fototipos de pele “I” a “IV” da classificação de Fitzpatrick, que permitiam o uso do AGE-Reader™; (8) não fazer uso de qualquer medicação conhecida por influência no metabolismo ósseo (suplementação de cálcio, vitamina D e análogos, anticonvulsivantes, bisfosfonatos, calcitonina, corticosteróides, análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas, heparina, dicumarínico, terapia de reposição hormonal, medicações para tireóide).

3.2 Dados clínicos, demográficos e laboratoriais

Os dados clínicos e demográficos foram coletados a partir de anamnese e revisão de prontuário e incluíram: idade, gênero, raça, fototipo de pele, etiologia da DRC, diurese residual – em mililitros (mL), tempo em HD – em meses, kt/V, valor médio de ultrafiltração (UF) por sessão

(total de UF das sessões do mês no qual foi realizada a biópsia dividido pelo número de sessões) – em litros (L), pressão arterial média (PAM) pré- e pós-HD – em milímetros de mercúrio (mmHg), tipo de acesso vascular (cateter de curta permanência, cateter tunelizado de longa permanência, fístula arteriovenosa), tabagismo atual ou prévio, comorbidades, medicações em uso e história de eventos cardiovasculares, como insuficiência arterial periférica, acidente vascular encefálico (AVE), aneurisma de aorta, dissecação de aorta, angina e infarto agudo do miocárdio (IAM).

Amostras de sangue foram coletadas em jejum no mesmo dia da biópsia óssea (Grupo HD) ou em datas pré-agendadas (Grupo Controle). As dosagens séricas de creatinina, uréia, sódio, potássio, hemoglobina, hematócrito, cálcio, fosfato, ferro, ferritina, saturação de transferrina, capacidade total de ligação do ferro à transferrina (TIBC), glicemia de jejum, hemoglobina glicada, colesterol total e frações, triglicérides, ácido úrico, proteína-C reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS) e albumina foram determinadas usando métodos laboratoriais automatizados padrões dos laboratórios de bioquímica HC-UNICAMP e HC-FMB. A concentração sérica de 25-hidroxivitamina D foi determinada pelo método de quimioluminescência. Somente o Grupo HD realizou dosagens séricas de bicarbonato, fosfatase alcalina e hormônio intacto da paratireoide (PTHi), através de ensaio imunoenzimático por quimioluminescência (Liaison N-tact PTH CLIAR, Diasorin, Stillwater) e com valores de referência de 15-65 pg/mL. O grupo HD também realizou dosagem de CML sérica a partir de ensaio imunoenzimático (ELISA) fornecido pela empresa Shanghai Blue Gene Biotech CO., LTD. (E01C0773) e executado conforme instruções do fabricante, apresentando faixa de detecção entre 5-100 ng/mL e sensibilidade > 1,0 ng/mL.

Dados clínicos e laboratoriais como idade, níveis séricos de HDL e colesterol total, pressão arterial, história de DM e tabagismo foram utilizados para classificação de risco cardiovascular (RCV) através do escore de Framingham. (55) As possíveis classificações foram: RCV baixo, intermediário ou elevado.

3.3 Medidas antropométricas

As medidas de peso e estatura foram realizadas em posição ortostática, sem sapatos ou roupas pesadas, registrados em quilogramas (Kg) e metros (m) respectivamente. A partir dessas medidas, foi calculado o índice de massa corporal (IMC) utilizando a seguinte fórmula: peso em quilogramas dividido pela estatura, em metros ao quadrado (Kg/m^2). A circunferência abdominal (CA) foi obtida em posição ortostática, no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca. Já

a circunferência de quadril (CQ) foi aferida no maior diâmetro do quadril, passando pelos trocânteres maiores. Ambas foram registradas em cm e utilizadas para o cálculo da relação cintura-quadril (RCQ): CA (cm) dividido pela CQ (cm).

As pressões arteriais sistólicas (PAS) para o cálculo do ITB foram aferidas nos membros superiores, artérias braquiais, e nos membros inferiores, artérias pediosas e tibiais posteriores, após 5 minutos de repouso em decúbito dorsal. Manguitos padrão para aferição de pressão arterial foram aplicados e a localização das artérias se deu através de palpação e, em seguida, foram aplicados gel para ultrassom e por meio do aparelho de Doppler vascular (10MHz, MEDMEGA Indústria de Equipamentos Médicos LTDA., Franca, Brasil) localizou-se o eco sistólico das referidas artérias. A PAS não foi aferida no sítio da fístula arteriovenosa de pacientes em HD. O ITB foi obtido pela divisão simples da maior PAS obtida em cada artéria do membro inferior pela maior PAS obtida nos membros superiores. Os valores considerados para referência foram: ITB anormal $\leq 0,90$, associado à doença vascular obstrutiva periférica, e $\geq 1,40$, sugestivo de rigidez vascular devido à CV; ITB normal = 0,91 a 1,39. (56)

3.4 Exames de imagem

O grupo HD realizou radiografias de quadril e mãos em incidência pósterio-anterior, assim como de abdome lateral ou coluna lombar lateral para pesquisa de CV. Para o cálculo do escore de Adragão *et al.* (Figura 2), a radiografia de pelve foi dividida em quatro seções a partir de duas linhas imaginárias: uma horizontal, através do limite superior das cabeças dos fêmures, e outra vertical, acima da coluna vertebral. Já a radiografia das mãos foi dividida, para cada mão, através de uma linha horizontal que delimita a parte proximal dos ossos do metacarpo em relação aos ossos do carpo. A presença de CV em cada seção corresponde a 1 ponto no escore, enquanto sua ausência a 0. O escore final se dá pela soma dos pontos de cada seção, variando de 0 a 8. (57) Somente CV linear nas artérias ilíacas, femorais, radiais e digitais foi considerada neste escore.

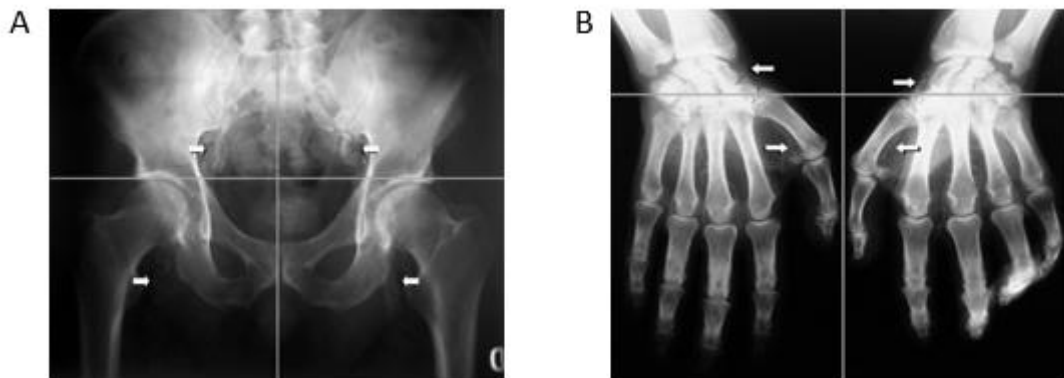


Figura 2. Escore de Adragão para avaliação de calcificação vascular. Radiografias de pelve (A) e mãos (B) demonstrando presença de calcificação vascular nos quatro quadrantes (setas brancas).

A partir das radiografias de abdome lateral foi avaliada a CV de aorta abdominal, utilizando o escore de Kauppila *et al.* (58) O segmento da aorta abdominal localizado de L1-L4 foi subdividido em paredes anterior e posterior e a extensão longitudinal do vaso numerada de 1 a 4 de acordo com a vértebra adjacente. Cada segmento, anterior e posterior, recebeu uma pontuação de 0 a 3: 0 significa ausência de calcificação; 1 representa pequeno depósito calcificado que ocupa menos de um terço de toda a parede; 2 indica calcificação maior do que um terço, porém menor do que dois terços da parede; e 3 significa que dois terços ou mais da parede do vaso está calcificada. O escore varia de 0 a 24 pontos. (58)

A densidade mineral óssea foi avaliada em portadores de DRC em HD em ossos da coluna lombar e fêmur, ou em toda massa óssea corporal, utilizando a densitometria óssea por raios-X de dupla energia (DEXA). Os resultados foram expressos em desvio-padrão (DP) em relação ao adulto jovem (*T-score*) e DP em relação a pessoas da mesma faixa etária (*Z-score*), e classificados de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde: (a) normal: *T-score* de até -1,0 DP; (b) osteopenia: *T-score* entre -1,0 e -2,5 DP; (c) osteoporose: *T-score* menor ou igual a -2,5 DP. (59)

Ecocardiograma transtorácico foi realizado no grupo HD para complementar análise cardiovascular, tendo sido avaliados os seguintes parâmetros: massa, em gramas, de ventrículo esquerdo; diâmetro, em mm, do átrio esquerdo; espessura, em mm, do septo interventricular; e fração de ejeção (%) do ventrículo esquerdo.

3.5 Medida dos AGEs na pele

A deposição dos AGEs na pele foi avaliada indiretamente pela medida da sAF na região do antebraço esquerdo ou do membro superior contralateral ao do acesso vascular para HD, usando o aparelho AGE-ReaderTM (DiagnOptics, Groningen, Holanda). Os valores de AGEs-sAF são expressos em unidades arbitrárias (UA). Três leituras consecutivas foram tomadas, sendo utilizada a média aritmética simples dos três valores para classificação, de acordo com valores de referência para a idade, e em grupos de risco cardiovascular (RCV) conforme descrito por Koetsier *et al.* (Tabela 1). (60) Pacientes foram divididos em 4 grupos: sem RCV (grupo normal), com AGEs iguais ou menores à média de referência para a idade; RCV discretamente elevado (grupo 1), nos quais os AGEs estavam acima da média até 1 DP; RCV aumentado (grupo 2), com AGEs acima de 1 DP; e extremamente aumentado (grupo 3), em pacientes cujos valores dos AGEs estavam acima de 2,9 UA (Figura 3). (60) Áreas da pele tatuadas, com manchas, verrugas, efélides ou com vaso perto à superfície de leitura foram evitadas. De acordo com informações fornecidas pelo fabricante, o AGE-ReaderTM e seu *software* foram validados em pacientes com índice de reflexão de pele acima de 6% (Fitzpatrick classe de I a IV). (54,61)

Tabela 1. Valores de referência dos AGEs, medidos por auto fluorescência (AF) da pele, de acordo com a idade. (60)

Faixa etária (anos)	AF	N	P
0 – 10	0,97 ± 0,17	45	< 0,01
10 – 20	1,11 ± 0,20	50	< 0,01
20 – 30	1,53 ± 0,30	62	< 0,01
30 – 40	1,73 ± 0,42	86	0,21
40 – 50	1,81 ± 0,36	72	< 0,01
50 – 60	2,09 ± 0,36	64	< 0,01
60 – 70	2,46 ± 0,57	45	0,12
70 – 80	2,73 ± 0,55	27	0,51
80 +	2,71 ± 0,44	5	

Os dados são valores médios de AF de pele em unidades arbitrárias. Significância entre as faixas etárias é indicado pelos valores de *P*, a partir do teste t Student.

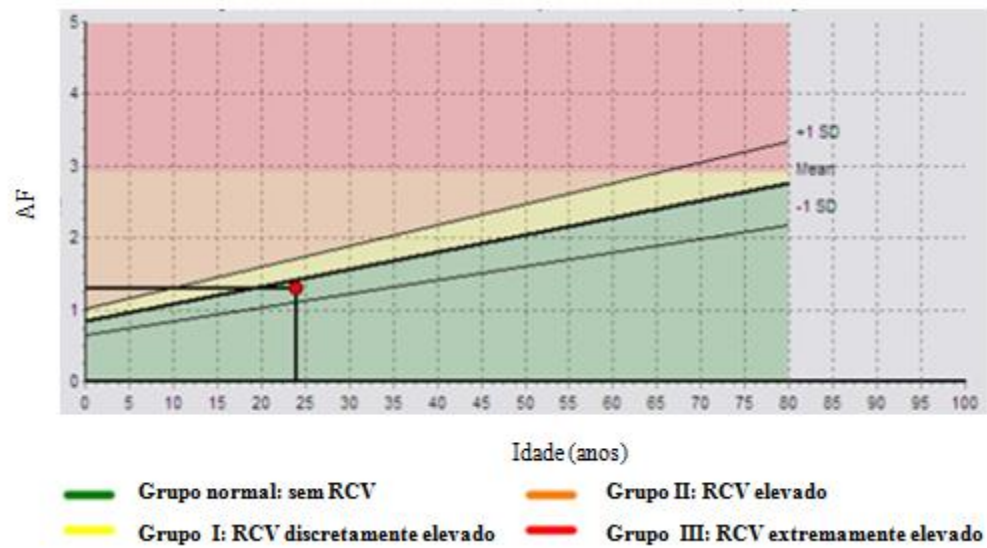


Figura 3. Classificação de risco cardiovascular de acordo com os níveis dos AGEs na pele, e idade. (60)

3.6 Avaliação nutricional

Os pacientes preencheram um registro alimentar durante três dias consecutivos e os conteúdos dietéticos dos AGEs totais e a fração dos AGEs carboximetilisina (CML), expressos em quilo unidades (KU), e da fração dos AGEs MG, em nanomoles, foram calculados de acordo com tabela de conteúdo dos AGEs em 549 alimentos descrita no estudo de Uribarri *et al.* (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)). (62) Devido ao fato de alguns itens da dieta brasileira não apresentarem quantificação prévia dos AGEs, foram consideradas somente a quantidade e porcentagem de calorias ingeridas de alimentos nos quais o conteúdo dos AGEs era conhecido. Demais nutrientes também foram quantificados utilizando o “Programa de Apoio à Nutrição Nutwin – UNIFESP/EPM”: energia – em quilo calorias (Kcal); proteína, lipídeos, carboidratos e fibra – em gramas (g); e cálcio, fosfato, potássio, sódio e colesterol – em miligramas (mg).

3.7 Biópsia óssea

A biópsia óssea transilíaca foi realizada sob anestesia local com lidocaína 5% e sedação superficial com midazolam intramuscular ou midazolam e fentanil por via intravenosa. Uma incisão de dois centímetros foi realizada a cerca de 2 cm posterior à espinha ilíaca anterossuperior e 2 cm

inferior à crista ilíaca. Em seguida, o tecido subcutâneo e muscular foram divulsionados, e introduzido guia. Utilizando uma serra cilíndrica estéril (trefina), marca Rochester (Rochester, MN, USA), de 7,5 mm de diâmetro e com o auxílio de uma furadeira elétrica o fragmento de tecido ósseo era obtido. A fim de avaliar a mineralização óssea, os pacientes receberam ciclos de tetraciclina para marcação do tecido ósseo (20 mg/Kg/dia durante três dias consecutivos em dois períodos distintos separados por 10 dias). O procedimento ocorreu no período entre o terceiro e o quinto dias após o término do segundo ciclo de tetraciclina. O fragmento ósseo foi considerado adequado com a presença de osso trabecular e duas corticais (interna e externa). As amostras de tecido ósseo calcificado foram conservadas em álcool 70% e infiltradas com metilmetacrilato para análise semi-quantitativa no Laboratório de Fisiopatologia Renal do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Os laudos seguem as terminologias recomendadas pelo *Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)*, por meio da classificação TMV: “T” [*Turnover* (Remodelação)] avaliada como alta, normal ou baixa; “M” [*Mineralization* (Mineralização)], que se encontra normal ou anormal; e “V” [*Volume* (Volume)], este variando entre aumentado, normal e diminuído. (63) Para fins de análise de dados considerou-se o laudo descritivo onde foi possível categorizar os pacientes de acordo com os seguintes diagnósticos do tipo de osteodistrofia renal: doença óssea adinâmica; osteomalácia; doença óssea mista; osteíte fibrosa. Cada paciente também foi categorizado de acordo com a presença ou ausência de osteoporose (diminuição do volume ósseo), intoxicação por alumínio (presença de alumínio recobrindo mais que 30% da superfície óssea) ou deposição de ferro (em cruzes, de um a três).

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos em médias e DP ou medianas e intervalos interquartis para variáveis contínuas, ou em frequências e porcentagens para variáveis categóricas. A normalidade das variáveis foi avaliada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Comparações entre porcentagens foram feitas utilizando os testes de qui-quadrado para variáveis categóricas, e t-Student ou Mann-Whitney para variáveis contínuas. Correlações entre os níveis dos AGEs-sAF, consumo de AGEs na dieta, níveis séricos de CML com parâmetros clínicos e bioquímicos foram feitos usando os coeficientes de Spearman e Pearson, e regressão linear. Valores de p bicaudal $<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago).

4. RESULTADOS

Durante o período de 15 meses foram incluídos no estudo 32 pacientes portadores de DRC em HD. Com o intuito de ampliar a compreensão da aplicação do aparelho AGE-Reader™ em população de brasileiros sem DRC realizamos também leituras dos AGEs-sAF em um grupo de 37 pessoas autodeclaradas como hípidas (Grupo Controle). Apresentamos os resultados do Grupo Controle e, posteriormente, do Grupo HD.

GRUPO CONTROLE (*indivíduos hípidos*)

Resultados gerais, de AGEs-sAF e nutricionais

Trinta e sete indivíduos com idade média de 41 ± 12 anos, sendo 19 (51%) do gênero feminino e 33 (89%) da raça branca, com índice de massa corporal $26,2 \pm 5$ Kg/m², e taxa de filtração glomerular estimada pela equação CKD-EPI em 102 ± 14 mL/min realizaram medidas de AGEs-sAF com o aparelho AGE-Reader™.

Os níveis médios de AGEs-sAF foram de $2,4 \pm 0,4$ UA, sendo que em 27 (72,9%) pessoas foi considerado acima dos valores de referência para a faixa etária. Trinta e dois (86,4%) desses indivíduos realizaram análise do conteúdo nutricional dietético, com quantificação da ingestão de AGEs total (11.943 ± 5.581 KU/dia), e dos subtipos específicos de AGEs – MG (14.648 ± 10.902 nmol/dia) e CML (4.213 ± 3.941 KU/dia). A ingestão calórica total foi de 2.118 ± 754 kCal/dia.

GRUPO HEMODIÁLISE

Resultados clínico-demográficos, laboratoriais gerais, nutricionais e de AGEs teciduais e séricos

As características clínicas e demográficas do grupo HD estão apresentadas na Tabela 2, enquanto os achados bioquímicos se encontram na Tabela 3. Vale ressaltar que os pacientes em HD nos diversos serviços incluídos, além das prescrições de diálise semelhantes, apresentaram valores de kt/V similares (UNICAMP $1,6 \pm 0,5$ vs. UNESP $1,27 \pm 0,2$, $p = 0,15$; UNICAMP $1,6 \pm 0,5$ vs. outros serviços de HD $1,27 \pm 0,2$, $p = 0,09$). Dados sobre o consumo nutricional geral, de AGEs e de seus subtipos específicos estão listados na Tabela 4.

A análise nutricional foi viável em 22 (68,5%) pacientes. As médias de consumo de AGEs total (8.564 ± 3.702 vs. 11.943 ± 5.581 KU/dia; $p = 0,016$), e de seus subtipos MG ($10.664 \pm$

5.480 vs. 14.648 ± 10.902 nmol/dia) e CML (2.560 ± 1.792 vs. 4.213 ± 3.941 KU/dia) no Grupo HD foram inferiores ao observado no Grupo Controle.

Os níveis teciduais de AGEs-sAF foram quantificados em 25 (78,1%) pacientes resultando em um valor médio de $2,8 \pm 0,6$ UA. Com relação à classificação de AGEs-sAF de acordo com a idade foram obtidos valores acima da referência em 24 (96%) dos pacientes. Não houve correlação entre os níveis de AGEs-sAF e AGEs total dietético ($R = -0,023$; $p = 0,927$). A presença de diurese residual não se associou com menores valores de AGEs séricos e teciduais, tendo os pacientes com débito urinário presente e anúricos apresentado níveis similares de AGEs-sAF ($2,8 \pm 0,7$ UA vs. $2,8 \pm 0,5$ UA ; $p = 0,9$) e de CML sérico ($14,4 \pm 12,7$ ng/mL vs. $19,9 \pm 9$ ng/mL; $p = 0,214$). O quelante de fósforo mais frequentemente utilizado foi o Sevelamer (N = 27 ; 84%), medicação associada em estudo prévio à redução dos níveis séricos de CML e MG. (64) No entanto, em nossa amostra este fato não se comprovou, tendo sido demonstrados níveis de AGEs-sAF ($2,9 \pm 0,6$ vs. $2,6 \pm 0,6$; $p = 0,35$) e séricos de CML (17 ± 12 vs. 23 ± 11 ; $p = 0,35$) semelhantes entre pacientes que utilizavam ou não este quelante. As Figuras 4 e 5 mostram as comparações entre os níveis médios de AGEs-sAF e ingestão média de AGEs total entre indivíduos hígidos e em HD. Os níveis de CML séricos (18 ± 12 ng/mL) não se correlacionaram com os níveis de AGEs-sAF ($R = 0,147$; $p = 0,51$) nem com a ingestão de AGEs ($R = -0,193$; $p = 0,43$).

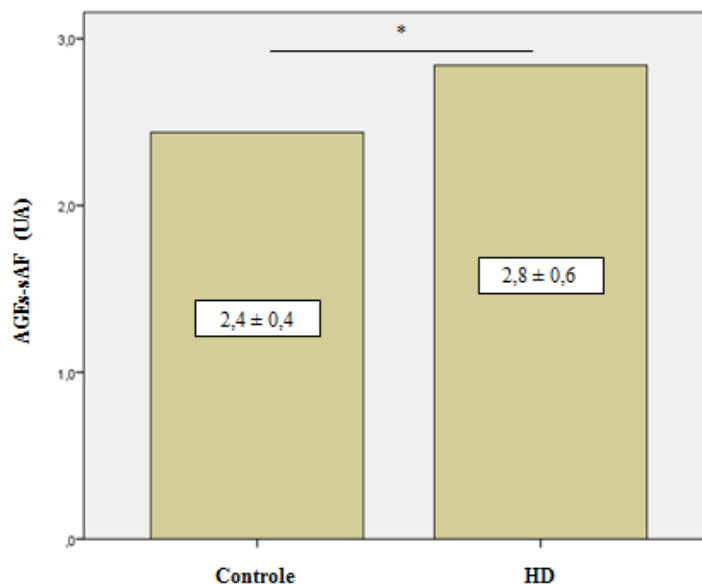


Figura 4. Comparação entre os níveis médios de AGEs-sAF entre indivíduos hígidos (Grupo Controle) e pacientes (Grupo HD). HD, hemodiálise.* $p = 0,005$

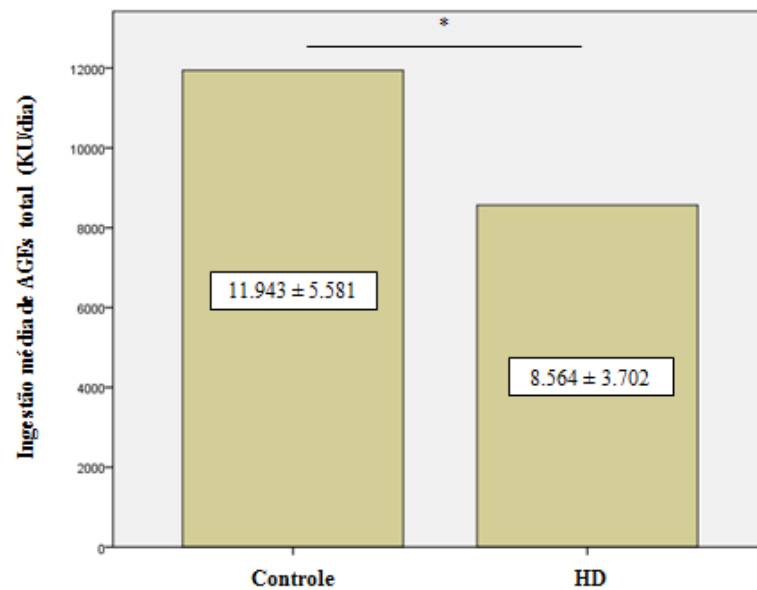


Figura 5. Comparação entre a ingestão média de AGEs total entre indivíduos hígidos (Grupo Controle) e pacientes (Grupo Hemodiálise); * p = 0,016.

Tabela 2. Dados clínicos e demográficos da população em HD e sujeitos controle.

Parâmetro	HD (N = 32)	Controle (N = 37)	p
Idade (anos)	48,5 ± 13	41,4 ± 12,1	0,022
Índice de massa corporal (kg/m ²)	24,7 ± 4,9	26,2 ± 5	0,251
Relação cintura-quadril	0,95 ± 0,08	0,85 ± 0,12	0,001
Gênero (feminino, %)	12 (37,5)	19 (51,4)	
Raça (parda, %)	15 (46,9)	33 (89,2)	
Comorbidades			
Hipertensão arterial sistêmica (N, %)	28 (87,5)	0	
Tabagismo ativo ou prévio (N, %)	14 (43,8)	2 (5,4)	
Acidente vascular encefálico (N, %)	3 (9,4)	0	
Coronariopatia (N, %)	2 (6,3)	0	
Etiologia da DRC (N, %)		NA	
Hipertensão arterial sistêmica	11 (34,4)	-	
Glomerulonefrite crônica	8 (25)	-	
Doença renal policística	2 (6,3)	-	
Indeterminada	8 (25)	-	
Tempo em hemodiálise (meses)	41,6 ± 39,1	NA	
Fístula arterio-venosa (N, %)	20 (62,5)	NA	
Kt/V	1,38 ± 0,37	NA	
Média de ultrafiltração por sessão (L)	2,5 ± 0,6	NA	
Presença de diurese residual (N, %)	16 (50)	NA	
Sevelamer (N, %)	27 (84,4)	NA	
Pressão arterial média (mmHg)	103,1 ± 14,2	NR	

HD, hemodiálise ; DRC, doença renal crônica; NA, não se aplica; TFG, taxa de filtração glomerular; NR, não realizado.

Tabela 3. Achados bioquímicos da população em HD e sujeitos controle.

Parâmetro	HD N = 32	Controle N = 37	p
Albumina (g/dL)	3,8 ± 0,35	4,3 ± 0,26	0,0001
Creatinina (mg/dL)	9,9 ± 3,1	0,8 ± 0,16	0,0001
Uréia (mg/dL)	123,3 ± 30,7	29,4 ± 9	0,0001
Glicemia (mg/dL)	86,1 ± 18	86,7 ± 9,8	0,867
Hemoglobina glicada (%)	5,2 ± 0,5	5,3 ± 0,4	0,37
Colesterol total (mg/dL)	124,1 ± 28	184,8 ± 38	0,0001
LDL colesterol (mg/dL)	59 (48,2 a 72,2)	110 (81,5 a 129)	0,281
HDL colesterol (mg/dL)	37 ± 10,4	51,2 ± 12,2	0,0001
Triglicerídeos (mg/dL)	135,2 ± 85,6	137,7 ± 105,7	0,916
Hemoglobina (g/dL)	11,8 ± 1,5	14,6 ± 1,3	0,0001
Ferritina (mg/dL)	524,9 ± 365	195 ± 184	0,0001
Proteína C-reativa (mg/dL)	1,4 (0,65 a 3,7)	0,31 (0,07 a 0,85)	0,044
Cálcio total (mg/dL)	9,1 ± 0,7	9,3 ± 0,32	0,049
Fosfato (mg/dL)	5,9 ± 1,7	3,4 ± 0,53	0,0001
PTHi (pg/mL)	372,5 (187 a 873,7)	NR	
Fosfatase alcalina (IU/L)	95 (72,2 a 134,2)	58 (45,5 a 72)	0,007
Calcidiol (ng/dL)	32,2 ± 9,2	NR	
CML (ng/mL)	18 ± 12	NR	

LDL, lipoproteínas de baixa densidade ; HDL, lipoproteínas de alta densidade; PTHi, hormônio da paratireoide intacto; CML, carboximetilisina; NR, não realizado.

Tabela 4. Média de consumo de parâmetros dietéticos nos grupos HD e controle.

Parâmetro	HD N = 22	Controle N = 32	p
AGEs total (KU)	8.564 ± 3.702	11.943 ± 5.581	0,016
Metilglioxal (nmol)	10.664 ± 5.480	14.648 ± 10.902	0,018
Carboximetil-lisina (KU)	2.560 ± 1.792	4.213 ± 3.941	0,003
Calorias totais (Kcal)	1.538 ± 619	2.118 ± 754	0,235
Calorias AGEs	1.397 ± 613	1.773 ± 688	0,041
Proteína (g)	65 ± 25	92 ± 37	0,414
Lipídio (g)	48 ± 21	72 ± 25	0,118
Carboidrato (g)	214 ± 92	278 ± 122	0,07
Fibra (g)	18 ± 10	20 ± 14	0,729
Cálcio (mg)	437,5 ± 237	804 ± 404	0,009
Fosfato (mg)	821,5 ± 331,7	1.303 ± 565	0,213
Sódio (mg)	2.300 ± 1.072	2.130 ± 924	0,142
Potássio (mg)	1.624 ± 641,8	2.652 ± 934	0,306
Colesterol (mg)	186,9 ± 91,9	302 ± 159	0,209

HD, hemodiálise; KU, quilo unidades; Kcal, quilocalorias.

Comparação entre médias de AGEs-sAF em populações de indivíduos hígidos holandeses e grupo controle do presente estudo

O aparelho AGE-Reader™, utilizado no presente estudo para aferir o acúmulo de AGEs na pele, apresenta curva de médias de AGEs-sAF de acordo com a faixa etária definidas através de pesquisa realizada em população holandesa. A tabela 5 demonstra as médias de AGEs-sAF por faixa etária do grupo Controle. Modelos de regressão linear foram ajustados para estimar a média do AGEs-sAF nas faixas etárias 0-10, 11-20, 71-80 e acima de 80 anos, não disponíveis em nosso grupo controle, permitindo a construção estimada de uma curva e a comparação desta com a do estudo holandês (Figura 6). Os indivíduos de nosso grupo controle apresentaram valores médios de AGEs-sAF mais elevados que os holandeses, porém o comportamento da curva foi semelhante, com aumento proporcional do acúmulo tecidual de AGEs ao longo do envelhecimento.

Tabela 5. Valores de referência dos AGEs-sAF, de acordo com a idade, no grupo controle.

Faixa etária (anos)	AGEs-sAF (UA)	N
0 -10	1,45*	0
11 - 20	1,74*	0
21 – 30	2,13 ± 0,25	10
31 – 40	2,21 ± 0,31	11
41 – 50	2,60 ± 0,34	7
51 – 60	2,88 ± 0,42	6
61 – 70	3,03 ± 0,32	3
71 – 80	3,36*	0
80 +	3,63*	0

AGEs-sAF, média de acúmulo tecidual de produtos finais de glicação avançada medidos através de autofluorescência da pele; UA, unidades arbitrárias. *Valores de média de AGEs-sAF estimados através de regressão linear.

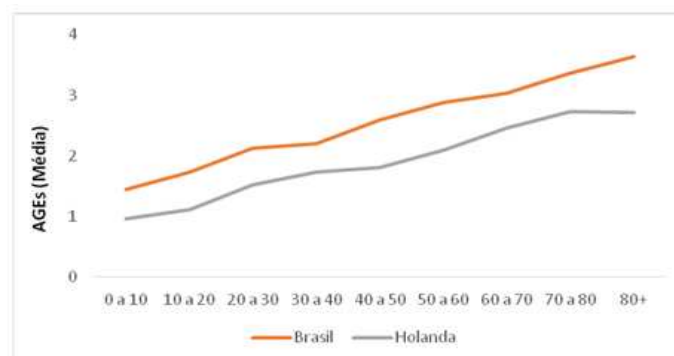


Figura 6. Comparação entre as curvas de valores médios de AGEs-sAF em indivíduos do grupo controle e holandeses. (60)

Resultados de parâmetros de doença cardiovascular e suas relações com as medidas de AGEs-sAF ou consumo nutricional de AGEs totais e seus subtipos

Os parâmetros relativos a DCV analisados por meio de exames de imagem no grupo HD encontram-se listados na Tabela 6. Dentre os resultados obtidos por ecocardiograma com Doppler, somente a dimensão do átrio esquerdo e a espessura do septo interventricular obtiveram valores acima da referência para o método. O ITB apresentou valor elevado em 1 (3,1%) indivíduo, entretanto sua aferição não foi possível em um dos indivíduos do grupo HD devido à detecção de artérias não compressíveis.

Tabela 6. Parâmetros de doença cardiovascular nos pacientes em HD.

Parâmetro	N = 32	Valores de referência
Massa de ventrículo esquerdo (g)	218,8 ± 55	94 a 276
Hipertrofia concêntrica de VE (N, %)	18 (56,5)	NA
Dimensão de átrio esquerdo (mm)	41 ± 4,8	20 a 40
Septo interventricular (mm)	11,2 ± 2,3	7 a 10
Fração de ejeção - Teicholz (%)	69,6 ± 6,4	> 58%
Calcificação vascular por Rx (N, %)*	9 (40,9)	0
Índice tornozelo-braquial (ITB)	1,07 ± 0,17	0,91 a 1,39
ITB > 1,39 (N, %)	1 (3,1)	0

VE, ventrículo esquerdo; NA, não se aplica; Rx, radiografia de mãos, bacia ou lateral de abdome; * N = 22.

Os níveis séricos de CML e de AGEs-sAF não se associaram com nenhum parâmetro cardiovascular analisado. Os pacientes em HD foram classificados quanto ao RCV a partir da medida da deposição tecidual de AGEs por meio do AGE ReaderTM com os seguintes resultados: 1 (3,1%) sem risco ; 2 (6,3%) com risco discretamente aumentado; 10 (31,3%) com RCV aumentado; e 12 (37,5%) com risco extremamente aumentado. O RCV também foi classificado a partir do escore de Framingham, encontrando 24 (75%) indivíduos com risco baixo; 7 (21,9%) com médio; e 1 (3,1%) com alto RCV.

A ingestão de AGEs total se correlacionou negativamente com a fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo ($R = -0,451$; $p = 0,035$) e positivamente com o ITB ($R = 0,456$; $p = 0,038$), como demonstrado na Figura 7 (A e B). Os níveis de AGEs-sAF não se associaram com nenhum outro achado ecocardiográfico ou com CV avaliada por radiografias.

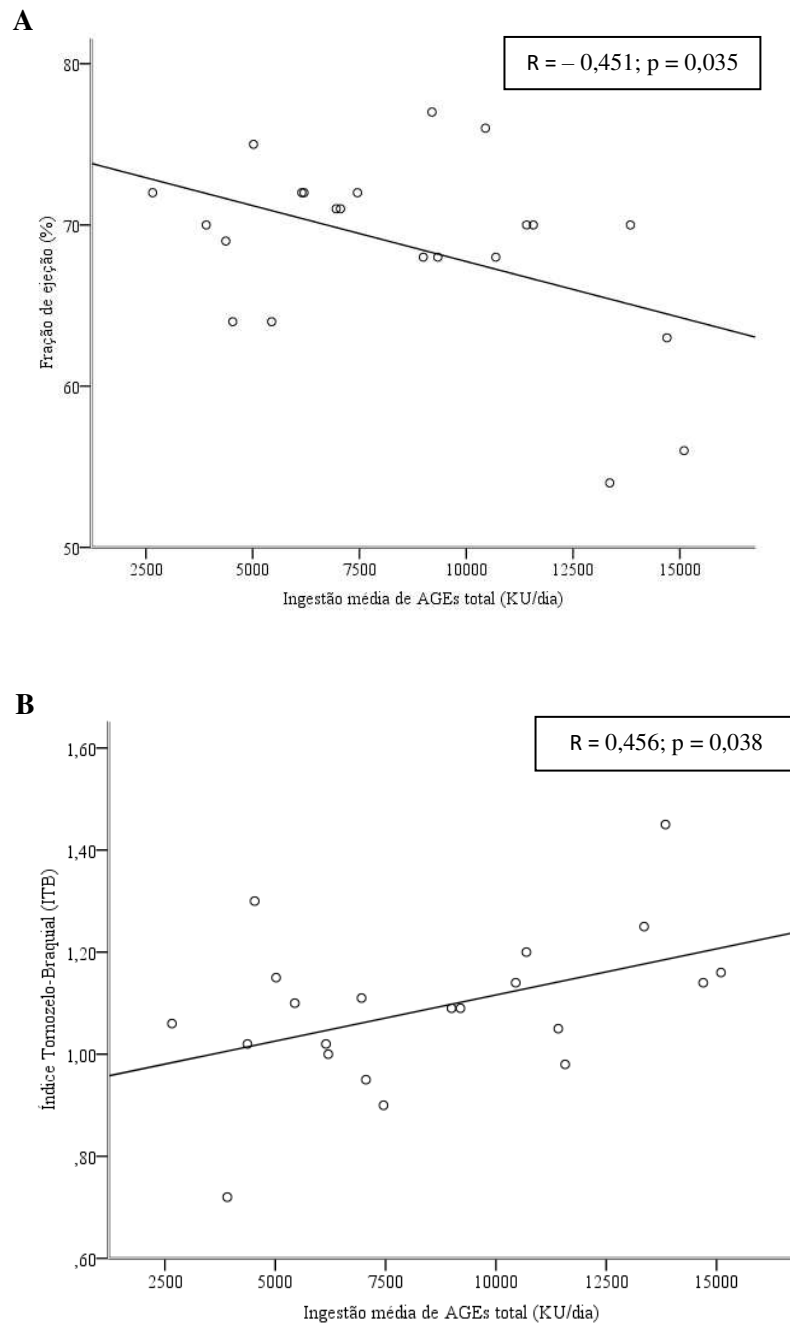


Figura 7. Correlações entre a ingestão média de AGEs total e parâmetros cardiovasculares. Maior ingestão de AGEs se correlacionou com disfunção sistólica (A) e valores mais elevados de ITB (B).

Resultados de parâmetros estruturais e metabólicos do tecido ósseo e suas relações com as medidas de AGEs-sAF ou consumo nutricional de AGEs total e seus subtipos

Os parâmetros ósseos foram avaliados através de densitometria óssea e análise semi-quantitativa de tecido ósseo com dados obtidos a partir de biópsia (N = 21) (Tabela 7). Observou-se que houve mais casos de osteoporose diagnosticados através de análise histológica do tecido ósseo [12 (57,1%)] do que com a densitometria óssea [4 (17%)]. A osteíte fibrosa (OF) foi o tipo de osteodistrofia renal (OR) mais comum, diagnosticado em 15 (71%) dos pacientes. Todas as amostras de tecido ósseo foram avaliadas de acordo com a classificação *TMV*, tendo a maioria delas demonstrado *turnover* alto e volume reduzido. Intoxicação por alumínio foi detectada em 19% (N = 4) e depósito de ferro na superfície óssea em 6 (28,6%) das amostras analisadas. Destes 6 pacientes, 3 também apresentaram depósito de ferro na medula óssea.

Tabela 7. Parâmetros ósseos avaliados por densitometria e biópsia óssea nos pacientes do Grupo HD.

Parâmetro	Resultado	Valores de referência
Densitometria óssea (N = 23)		
Z-escore*	-1,56 ± 0,89	0 a -1,5
T-escore	-1,52 ± 1,14	0 a -1,5
Osteopenia (N, %)	13 (56,5)	NA
Osteoporose (N, %)	4 (17,4)	NA
Normal (N, %)	6 (26,1)	NA
Histomorfometria óssea (N = 21)		
Tipo de OR		
OF (N,%)	15 (71)	NA
DOA (N,%)	4 (19)	NA
Doença mista (N,%)	1 (4,8)	NA
Normal (N,%)	1 (4,8)	NA
Osteoporose (N,%)	12 (57)	NA
Classificação <i>TMV</i>		
<i>Turnover</i> alto (N,%)	16 (76)	NA
Mineralização anormal (N,%)	8 (38)	NA
Volume reduzido (N,%)	12 (57)	NA
Intoxicação por alumínio (N,%)	4 (19)	NA
Depósito de ferro		
Superfície (N,%)	6 (29)	NA
Medula (N,%)	3 (14)	NA

OR, osteodistrofia renal; OF, osteodistrofia renal; DOA, doença óssea adinâmica; *TMV*, *Turnover*-Mineralização-Volume; NA, não se aplica; * N = 13.

Dosagens dos níveis séricos de PTHi e fosfatase alcalina, considerados indicadores do metabolismo ósseo, foram realizadas no intuito de avaliar a influência dos AGEs no metabolismo ósseo. Entretanto, não houve correlação destes, mesmo após transformação logarítmica e comparação entre grupos acima e abaixo das medianas, com as medidas de AGEs-sAF ou ingestão média de AGEs total.

A fim de analisar a influência dos AGEs na doença óssea comparamos os níveis de AGEs-sAF e a ingestão de AGEs com os tipos de OR mais frequentes (DOA e OF). Os pacientes com o diagnóstico semi-quantitativo de OF [15, (71%)] apresentaram maiores níveis teciduais de AGEs-sAF ($3 \pm 0,8$ UA vs. $2,2 \pm 0,3$; $p = 0,035$) e maior ingestão de CML (3.052 ± 1.938 vs. 632 ± 898 ; $p = 0,036$), quando comparados àqueles com o diagnóstico de DOA [4, (19%)].

Devido ao número elevado de pacientes diagnosticados com osteoporose através de biópsia óssea [12, (57%)], analisamos diferentes parâmetros clínicos, laboratoriais e dietéticos distribuídos entre pacientes "com" e "sem" osteoporose (Tabela 8). Os pacientes com osteoporose apresentaram menor ingestão média de AGEs totais.

Tabela 8. Comparação de parâmetros clínicos, laboratoriais e dietéticos entre pacientes com e sem osteoporose diagnosticada através de biópsia óssea.

Parâmetro	Sem osteoporose N = 9	Com osteoporose N = 12	P
Tempo de hemodiálise (meses)	$64,5 \pm 23$	$27,8 \pm 30,4$	0,034
Paratormônio intacto sérico (pg/dL)	$640,5 \pm 426$	384 ± 461	0,05
Ingestão de AGEs (KU)	11.775 ± 2.366	7.170 ± 2.150	0,012
Ingestão calórica (Kcal)	1.822 ± 383	1.374 ± 442	0,042
Ingestão proteica (mg)	$82,2 \pm 13,7$	$62,3 \pm 18$	0,029
Ingestão lipídica (g)	$56,6 \pm 9,3$	$41,4 \pm 10,5$	0,042
Ingestão de carboidratos (g)	$255,8 \pm 70,7$	189 ± 75	0,042
Ingestão de fosfato (mg)	1.042 ± 99	775 ± 224	0,019

5. DISCUSSÃO

Os principais achados do nosso estudo foram: níveis de AGEs na pele elevados para idade nos grupos controle e HD, com valores mais elevados neste último; associação de AGEs da dieta com menor função cardíaca sistólica e maiores valores de ITB nos pacientes em HD; maior ingestão de AGEs totais e da fração CML com o diagnóstico de OF; e maior acurácia da biópsia óssea em diagnosticar osteoporose comparada com a densitometria óssea no grupo HD.

Os valores de AGEs-sAF foram mais elevados na população em HD do que em indivíduos hígidos, corroborando os resultados de estudos anteriores que demonstraram maiores níveis de AGEs teciduais e séricos em pacientes portadores de DRC mesmo na ausência de DM. Dois principais mecanismos explicam o acúmulo de AGEs nesta população: maior formação associada ao estresse oxidativo mais elevado em ambiente urêmico e menor excreção renal. (65) As medidas de AGEs-sAF foram feitas em triplicata, uma única vez, antes ou depois da sessão de HD, pois sessões únicas de HD são capazes de reduzir apenas os níveis séricos de AGEs, não interferindo nas medidas de AGEs na pele. (52)

Neste estudo observamos níveis teciduais de AGEs elevados para idade tanto no grupo controle quanto nos pacientes em HD, usando como referência um estudo holandês com amostra composta por indivíduos caucasianos. (60) Este achado poder ser atribuído aos diferentes fototipos de pele e hábitos alimentares da população controle, uma vez que os AGEs da dieta são uma das principais fontes desta toxina e que a pigmentação da pele pode influenciar na medida de AGEs-sAF devido aos diferentes índices de reflectância. (66,67) Destaca-se também a elevada incidência de RCV alto, classificação baseada nos níveis de AGEs da pele e idade. Existem poucos dados sobre a medida de AGEs por sAF em não-caucasianos, não havendo nenhum estudo em população Sul-Americana. Dessa forma, estudos futuros incluindo brasileiros são necessários para determinar se os valores de referência utilizados atualmente são aplicáveis em nossa população e, assim, viabilizar análise mais fidedigna de RCV deste método não-invasivo de AGEs-sAF.

Os dados deste estudo sugerem maior acurácia da classificação de RCV dos pacientes em HD através do AGE-ReaderTM do que pelo escore de Framingham, já que este apresentou menor número de paciente classificados como alto RCV. Estudos prévios já demonstraram que o escore de Framingham pode subestimar o RCV em portadores de DRC, (68,69) ressaltando a importância clínica do uso de novos métodos como a medida dos AGEs-sAF.

Sabe-se que os níveis de AGEs da pele são preditores de DCV e estão associados à maior mortalidade na população em HD, (51) porém este estudo apresentou baixa prevalência de eventos cardiovasculares, CV e alterações cardíacas estruturais avaliadas por ecocardiografia. O único parâmetro que sugere a associação de AGEs e predisposição à CV foi a correlação positiva entre a ingestão de AGEs e os valores de ITB, sugerindo indiretamente que o consumo deste nutriente esteja associado à rigidez dos vasos periféricos. O fato dos pacientes apresentarem média de idade menor do que a população em HD e do DM ter sido considerado critério de exclusão possivelmente selecionou uma amostra com menor predisposição para DCV. Devido à importante correlação entre AGEs e aterosclerose, (23) a inclusão de exames de imagem mais direcionados à

pesquisa de placas ateroscleróticas como ultrassonografia Doppler de carótidas ou angiotomografia de coronárias podem somar dados importantes à esta análise.

Dentre os parâmetros ecocardiográficos analisados, a fração de ejeção foi o único a apresentar associação com os AGEs da dieta, sendo menor em pacientes com maior ingestão desta toxina. Estudos em animais descreveram dois possíveis mecanismos pelos quais os AGEs podem reduzir a função sistólica cardíaca: acelerando a progressão da doença arterial coronariana através da indução de aterosclerose, trombose e vasoconstrição; e reduzindo a concentração intracelular de cálcio em cardiomiócitos. (33) Este envolvimento dos AGEs foi reforçado por Liu *et al*, que demonstrou melhora da função sistólica com a instituição de terapia para redução de níveis séricos de AGEs. (70)

Os AGEs também exercem influência sobre o metabolismo ósseo. Existem evidências da participação dos AGEs na patogênese da DOA, inibindo atividade de osteoblastos e a secreção de PTH. (49) O presente estudo não conseguiu demonstrar essa associação, tendo encontrado níveis mais elevados de AGEs na pele e maior ingestão da fração CML em pacientes com o diagnóstico de OF. Vale ressaltar que esta associação pode não ter sido evidenciada devido à pequena quantidade de pacientes portadores de DOA e a não realização até o momento de dosagem sérica de AGEs, imunohistoquímica e análise quantitativa do tecido ósseo por histomorfometria óssea. O principal tipo de OR diagnosticado foi a OF, dado que também foi encontrado em estudo de Araújo *et al* e atribuído em parte à maior média de tempo em HD dos brasileiros. (71)

Outra patologia óssea que tem sido associada aos AGEs é a osteoporose. Estudos demonstram níveis séricos mais elevados de AGEs em portadores de osteoporose (44), assim como a associação de AGEs com desequilíbrio no remodelamento ósseo levando à perda de massa óssea: maior atividade osteoclástica, (41) de reabsorção óssea; e menor atividade e maior apoptose de osteoblastos, células responsáveis pela formação óssea. (38) Apesar dos pacientes com osteoporose apresentarem menor ingestão de AGEs, ressalta-se que esta não reflete necessariamente os níveis séricos ou teciduais desta toxina urêmica. Quanto ao diagnóstico de osteoporose através de densitometria, foi demonstrado recentemente que o uso de valor de corte de $T\text{-score} < -2,5$ DP recomendado para população geral não prediz adequadamente a perda de massa óssea em pacientes em HD, tendo sido sugerido novo *cutoff* de $T\text{-score} \leq 1$ DP. (72) Esta menor sensibilidade da densitometria óssea fica evidente no presente estudo, com maior número de pacientes diagnosticados com osteoporose através de biópsia óssea.

No melhor do nosso conhecimento, o presente estudo clínico é o primeiro brasileiro a analisar a associação dos AGEs com doença cardiovascular e distúrbio mineral e ósseo na população em HD. Essa análise preliminar dos resultados ainda não foi capaz de demonstrar forte

correlação entre eles, porém acreditamos que a inclusão da dosagem sérica de AGEs, estudos de imunohistoquímica, e da histomorfometria óssea pode acrescentar dados relevantes. Um viés importante do estudo é não refletir a população brasileira em HD, pois nossa amostra excluiu portadores de DM e negros que compõe sua maioria.

6. CONCLUSÕES

Os presentes achados sugerem associação da ingestão de AGEs com a presença de disfunção sistólica e de distúrbios do metabolismo ósseo em pacientes em HD, como a OF e osteoporose. Esperamos com dados futuros de nosso estudo compreender melhor a associação de AGEs com DCV e DMO-DRC, visando sugerir um novo alvo terapêutico para redução de morbimortalidade desta população, além de apontar o AGE-ReaderTM como mais uma ferramenta não invasiva de rastreio de risco cardiovascular e de DMO-DRC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 1998 Nov [cited 2015 Sep 26];32(5 Suppl 3):S112-119. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820470>
2. Levin A, Tonelli M, Bonventre J, Coresh J, Donner J-A, Fogo AB, et al. Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy. *Lancet* [Internet]. 2017;6736(17):1–30. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617307882>
3. Of OJOS, 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* [Internet]. 2013;3(1):4–4. Available from: http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_CKD-MBD_GL_KI_Suppl_113.pdf
<http://www.nature.com/doi/10.1038/kisup.2012.73>
<http://www.nature.com/doi/10.1038/kisup.2012.76>
4. SBN. Censo de diálise 2016. Sociedade Brasileira de Nefrologia. 2016.
5. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, et al. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: A Statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension*. 2003;42(5):1050–65.
6. Hruska KA, Seifert M, Sugatani T. Pathophysiology of the chronic kidney disease-mineral bone disorder. *Curr Opin Nephrol Hypertens* [Internet]. NIH Public Access; 2015 Jul [cited 2017 Jul 20];24(4):303–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26050115>
7. Zoccali C. Cardiovascular risk in uraemic patients-is it fully explained by classical risk factors? *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2000;15(4):454–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727537>
8. USRDS. 2016 USRDS ANNUAL DATA REPORT | VOLUME 1 – CKD IN THE UNITED STATES Chapter 3: Morbidity and Mortality in Patients With CKD [Internet]. 2016 [cited 2017 Mar 20]. Available from:

https://www.usrds.org/2016/download/v1_c03_MorbMort_16.pdf

9. Arsov S, Graaff R, Van Oeveren W, Stegmayr B, Sikole A, Rakhorst G, et al. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: A review. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(1):11–20.
10. Hollander NC, Mulder DJ, Graaff R, Thorpe SR, Baynes JW, Smit GPA, et al. Advanced glycation end products and the absence of premature atherosclerosis in glycogen storage disease Ia. *J Inher Metab Dis*. 2007;30(6):916–23.
11. Meerwaldt R, Links T, Zeebregts C, Tio R, Hillebrands J-L, Smit A. The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2008;7:29.
12. Meerwaldt R, Zeebregts CJ, Navis G, Hillebrands JL, Lefrandt JD, Smit AJ. Accumulation of Advanced Glycation End Products and Chronic Complications in ESRD Treated by Dialysis. *Am J Kidney Dis*. 2009;53(1):138–50.
13. Castro E. O Papel dos Produtos Finais de Glicosilação Avançada na Nefropatia Diabética The Role of Advanced Glycosylation End Products in Diabetic Nephropathy. *Arq Med [Internet]*. 2011 [cited 2017 Mar 22];15(1):27-37. Available from: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/am/v25n1/v25n1a03.pdf>
14. Barbosa JHP, Souza IT, Santana AEG, Goulart MOF. Determination of Advanced Glycation (AGEs) and Lipoxidation (ALEs) End Products in Foods and Biological Systems: Advances, Challenges and Perspectives. *Quim Nova [Internet]*. 2016;39(5):608–20. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20160048>
15. Thornalley PJ. The enzymatic defence against glycation in health, disease and therapeutics: a symposium to examine the concept. *Biochem Soc Trans [Internet]*. 2003 [cited 2017 Jul 12];31(6):1341-42. Available from: <http://www.biochemsoctrans.org/content/31/6/1341.full-text.pdf>
16. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res [Internet]*. 1998 Mar [cited 2017 Jul 12];37(3):586–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9659442>
17. Lin C-L, Huang C-C, Yu C-C, Yang H-Y, Chuang F-R, Yang C-W. Reduction of advanced

- glycation end product levels by on-line hemodiafiltration in long-term hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* [Internet]. Little Brown, Boston, MA; 2003 Sep [cited 2017 Mar 29];42(3):524–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12955680>
18. Stein G, Franke S, Mahiout A, Schneider S, Sperschneider H, Borst S, et al. Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2001;16(5):999–1008. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328907>
 19. Klemm A, Franke C, Busch M, Muller A, Franke S, Lang D, et al. Influence of hemodialysis membrane permeability on serum levels of advanced glycation end products (AGEs) and homocysteine metabolites. *Clin Nephrol*. 2004;61(3):191–7.
 20. Floridi A, Antolini F, Galli F, Fagugli RM, Floridi E, Buoncristiani U. Daily haemodialysis improves indices of protein glycation. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2002;17(5):871–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11981076>
 21. Furuya R, Kumagai H, Takahashi M, Sano K, Hishida A. Ultrapure dialysate reduces plasma levels of beta2-microglobulin and pentosidine in hemodialysis patients. *Blood Purif* [Internet]. Karger Publishers; 2005 [cited 2017 Mar 27];23(4):311–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980621>
 22. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597–605.
 23. Janda K, Krzanowski M, Gajda M, Dumnicka P, Jasek E, Fedak D, et al. Vascular effects of advanced glycation end-products: Content of immunohistochemically detected AGEs in radial artery samples as a predictor for arterial calcification and cardiovascular risk in asymptomatic patients with chronic kidney disease. *Dis Markers*. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015.
 24. Sánchez E, Betriu À, Arroyo D, López C, Hernández M, Rius F, et al. Skin Autofluorescence and Subclinical Atherosclerosis in Mild to Moderate Chronic Kidney Disease: A Case-Control Study. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(1):e0170778. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28141808>
 25. Den Dekker MAM, Zwiers M, Van Den Heuvel ER, De Vos LC, Smit AJ, Zeebregts CJ, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive marker for AGE accumulation, is associated with the degree of atherosclerosis. *PLoS One*. 2013;8(12).

26. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Chow WS, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 1998 Sep [cited 2017 Mar 18];4(9):1025–31. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/2012>
27. Kume S, Takeya M, Mori T, Araki N, Suzuki H, Horiuchi S, et al. Immunohistochemical and Ultrastructural Detection of Advanced Glycation End Products in Atherosclerotic Lesions of Human Aorta with a Novel Specific Monoclonal Antibody. *American J of Pathology* [Internet]. 1995 [cited 2017 Mar 18];147(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1870970/pdf/amjpathol00045-0118.pdf>
28. Lapolla A, Piarulli F, Sartore G, Ceriello A, Ragazzi E, Reitano R, et al. Advanced Glycation End Products and Antioxidant Status in Type 2 Diabetic Patients With and Without Peripheral Artery Disease. *Diabetes Care* [Internet]. 2007 [cited 2017 May 10];30(3):670–6. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/content/30/3/670.full-text.pdf>
29. De Vos LC, Lefrandt JD, Dullaart RPF, Zeebregts CJ, Smit AJ. Advanced glycation end products: An emerging biomarker for adverse outcome in patients with peripheral artery disease. *Atherosclerosis* [Internet]. 2016 [cited 2017 May 10]; Available from: http://ac.els-cdn.com/S0021915016314150/1-s2.0-S0021915016314150-main.pdf?_tid=ad7cef5a-358b-11e7-bb25-00000aacb35f&acdnat=1494426148_1fbcc99179b9b9bdc581b106b313e8d6
30. Takahashi R, Imamura A, Yoshikane M, Suzuki M, Murakami R, Cheng XW, et al. High serum concentrations of pentosidine, an advanced glycation end product, are associated with low normal value of ankle-brachial index in apparently healthy men. *Metabolism Clinical and Experimental* [Internet]. 2011 [cited 2017 May 10];60:649–54. Available from: http://ac.els-cdn.com/S0026049510002027/1-s2.0-S0026049510002027-main.pdf?_tid=8366e7ac-358b-11e7-a6a9-00000aab0f26&acdnat=1494426078_f0912e9dfd7089daacf9b86eb17dea78
31. Ren X, Shao H, Wei Q, Sun Z, Liu N. Advanced Glycation End-products Enhance Calcification in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Int Med Res* [Internet]. 2009 May [cited 2017 Mar 15];37(3):847–54. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/147323000903700329>
32. Tanikawa T, Okada Y, Tanikawa R, Tanaka Y. Advanced Glycation End Products Induce Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells through RAGE/p38 MAPK. *J Vasc Res*

- [Internet]. 2009 [cited 2017 Aug 3];46:572–80. Available from: www.karger.com
33. Hartog JWL, Voors AA, Bakker SJL, Smit AJ, van Veldhuisen DJ. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: Pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail*. 2007;9(12):1146–55.
 34. Russo I, Frangogiannis NG. Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. NIH Public Access; 2016 Jan [cited 2017 Mar 12];90:84–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26705059>
 35. Petrova R, Yamamoto Y, Muraki K, Yonekura H, Sakurai S, Watanabe T, et al. Advanced glycation endproduct-induced calcium handling impairment in mouse cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(10):1425–31.
 36. Schmidt FN, Zimmermann EA, Campbell GM, Sroga GE, Püschel K, Amling M, et al. Assessment of collagen quality associated with non-enzymatic cross-links in human bone using Fourier-transform infrared imaging. *Bone*. 2017 Apr;97:243–51.
 37. Yang X, Gandhi C, Rahman MDM, Appleford M, Sun LW, Wang X. Age-Related Effects of Advanced Glycation End Products (Ages) in Bone Matrix on Osteoclastic Resorption. *Calcif Tissue Int*. Springer US; 2015;97(6):592–601.
 38. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, et al. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone*. 2007;40(2):345–53.
 39. Notsu M, Yamaguchi T, Okazaki K, Tanaka K, Ogawa N, Kanazawa I, et al. Advanced glycation end products inhibit the mineralization of mouse stromal ST2 cells by binding the receptor for ages and increasing TGF- β expression and secretion. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2013;28:2402–10. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71507582%5Cnhttp://rug.on.worldcat.org/atoztitles/link/?sid=EMBASE&issn=08840431&id=doi:&title=Advanced+glycation+end+products+inhibit+the+mineralization+of+mouse+stromal+ST2+cells>
 40. Okazaki K, Yamaguchi T, Tanaka K-I, Notsu M, Ogawa N, Yano S, et al. Advanced glycation end products (AGEs), but not high glucose, inhibit the osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells through the suppression of osterix expression, and inhibit cell

- growth and increasing cell apoptosis. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2012 Oct [cited 2016 Feb 29];91(4):286–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22903508>
41. Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, et al. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 1997;8(2):260–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9048345>
 42. Miyata T, Kawai R, Taketomi S, Sprague SM. Possible involvement of advanced glycation end-products in bone resorption. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 1996;11(SUPPL. 5):54–7. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L27062912%5Cnhttp://rug.on.worldcat.org/atoztitles/link/?sid=EMBASE&issn=09310509&id=doi:&title=Possible+involvement+of+advanced+glycation+end-products+in+bone+resorption&stitle=NEPHR>
 43. Moe SM, Hack BK, Cummings SA, Sprague SM. Role of IL-1 beta and prostaglandins in beta 2-microglobulin-induced bone mineral dissolution. *Kidney Int* [Internet]. 1995;47(2):587–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7723245>
 44. 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)* [Internet]. 2003;42(10):1242–6. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0141997270&partnerID=tZOtx3y1>
 45. Yang D-H, Chiang T-I, Chang I-C, Lin F-H, Wei C-C, Cheng Y-W. Increased levels of circulating advanced glycation end-products in menopausal women with osteoporosis. *Int J Med Sci* [Internet]. 2014;11(5):453–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3970097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 46. Odetti P, Rossi S, Monacelli F, Poggi A, Cirnigliaro M, Federici M, et al. Advanced glycation end products and bone loss during aging. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005. p. 710–7.
 47. Yamamoto T, Ozono K. [Role of advanced glycation endproducts in adynamic bone disease]. *Clin Calcium* [Internet]. 2001;11:1044–7. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15775614>

48. Gal-Moscovici A, Popovtzer MM. Parathyroid hormone-independent osteoclastic resorptive bone disease: a new variant of adynamic bone disease in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. Oxford University Press; 2002 Apr 1 [cited 2017 Mar 13];17(4):620–4. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/17.4.620>
49. Yamamoto T, Ozono K, Miyauchi A, Kasayama S, Kojima Y, Shima M, et al. Role of advanced glycation end products in adynamic bone disease in patients with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2001 Oct [cited 2016 Mar 7];38(4 Suppl 1):S161–164. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11576945>
50. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia*. 2004;47(7):1324–30.
51. Meerwaldt R. Skin Autofluorescence, a Measure of Cumulative Metabolic Stress and Advanced Glycation End Products, Predicts Mortality in Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2005;16(12):3687–93. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2005020144>
52. Graaff R, Arsov S, Ramsauer B, Koetsier M, Sundvall N, Engels GE, et al. Skin and plasma autofluorescence during hemodialysis: A pilot study. *Artif Organs*. 2014;38(6):515–8.
53. Hohmann C, Liehr K, Henning C, Fiedler R, Girndt M, Gebert M, et al. Detection of Free Advanced Glycation End Products in Vivo during Hemodialysis. *J Agric Food Chem*. American Chemical Society; 2017 Feb;65(4):930–7.
54. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988;124(6):869–71.
55. Kannel WB, McGee D, Gordon T. A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. *Am J Cardiol*. 1976;38(1):46–51.
56. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C, et al. Measurement and interpretation of the Ankle-Brachial Index: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;126(24):2890–909.
57. Adragao T, Pires A, Lucas C, Birne R, Magalhaes L, Gonçalves M, et al. A simple vascular

- calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(6):1480–8.
58. Kauppila LI, Polak JF, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PWF. New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: A 25-year follow-up study. *Atherosclerosis*. 1997;132(2):245–50.
 59. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *World Heal Organ Tech Rep Ser*. 1994;
 60. 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.
 61. Smit AJ, Smit JM, Botterblom GJ, Mulder DJ. Skin Autofluorescence Based Decision Tree in Detection of Impaired Glucose Tolerance and Diabetes. *PLoS One*. 2013;8(6):2–8.
 62. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(6):911–6.
 63. 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.
 64. Vlassara H, Uribarri J, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Post J, et al. Effects of Sevelamer on HbA1c, Inflammation, and Advanced Glycation End Products in Diabetic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 Jun;7(6):934–42.
 65. Arsov S, Trajceska L, van Oeveren W, Smit AJ, Dzekova P, Stegmayr B, et al. Increase in skin autofluorescence and release of heart-type fatty acid binding protein in plasma predicts mortality of hemodialysis patients. *Artif Organs*. 2013;37(7):E114–22.
 66. Meerwaldt R, Links T, Graaff R, Thorpe SR, Baynes JW, Hartog J, et al. Simple noninvasive measurement of skin autofluorescence. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2005 Jun [cited 2016 Feb 29];1043:290–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037251>
 67. Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppia M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005. p. 461–6.

68. Weiner DE, Tighiouart H, Elsayed EF, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, et al. The Framingham Predictive Instrument in Chronic Kidney Disease. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2007 Jul [cited 2017 Mar 16];50(3):217–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109707013484>
69. Huang J-C, Chen S-C, Su H-M, Chang J-M, Hwang S-J, Chen H-C. Performance of the Framingham Risk Score in patients receiving hemodialysis. *Nephrology*. 2013 Jul;18(7):510–5.
70. Liu J, Masurekar MR, Vatner DE, Jyothirmayi GN, Regan TJ, Vatner SF, et al. Glycation end-product cross-link breaker reduces collagen and improves cardiac function in aging diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2003;285(6):H2587-91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946933>
71. Araújo SMHA, Ambrosioni P, Lobão RRS, Caorsi H, Moysés RM a, Barreto FC, et al. The renal osteodystrophy pattern in Brazil and Uruguay: an overview. *Kidney Int Suppl*. 2003;63:S54–6.
72. Blomquist GA, Davenport DL, Mawad HW, Monier-Faugere M-C, Malluche HH. Diagnosis of low bone mass in CKD-5D patients. *Clin Nephrol*. 2016;85(2):77–83.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO I

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 pacientes com DRC em HD.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Além dos benefícios coletivos, a inclusão do novo procedimento poderá trazer benefícios diretos em termos de tratamento do controle dos distúrbios do cálcio, fosfato e hormônio da paratireoide (PTH), a partir dos resultados da biópsia óssea. Conforme discussão dos pesquisadores sobre os riscos e desconfortos, os principais riscos são hematoma, sangramento ou infecção local, além de dispepsia (desconforto digestivo) causada pelo antibiótico usado por 2 dias seguidos, 10 dias e 3 dias antes da biópsia óssea, devendo o participantes permanecer por 2 horas em observação no serviço e realizar repouso relativo por 24 horas após a biópsia óssea. Não será necessária internação hospitalar para a realização de exames, sendo todos feitos ambulatorialmente. Todos esses aspectos foram discutidos na nova versão do TCLE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide pareceres anteriores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além do resumo das informações gerada pela PB, foi anexado protocolo completo na forma de brochura do pesquisador, nova versão do TCLE, justificativa para a emenda e regulamento do biorrepositório.

Recomendações:**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

No parecer anterior (1.247.295) havia sido indicada a seguinte pendência:

As mudanças solicitadas foram claramente justificadas e estão adequadas aos objetivos do estudo. Os riscos e benefícios adicionais foram detalhados na nova versão do TCLE. Essas mudanças são consideradas aprovadas pelo CEP, entretanto a emenda prevê armazenamento de material biológico, de modo que deverá ser anexado regulamento do biorrepositório (resolução 441/2011, artigos 2.IV e 4). Solicita -se encaminhar esse documento e acrescentar no TCLE os aspectos referentes aos item 5 letras a, b, d.

Resposta: os pesquisadores anexaram o regulamento do biorrepositório e incluíram as modificações solicitadas no TCLE.

Comentário: pendência atendida.

Conclusão: Aprovado após resposta às pendência, devendo os pesquisadores observar que o 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:

1. O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. 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.

6. 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”.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_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		Aceito

		16:39:08		
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

CAMPINAS, 09 de Outubro de 2015

Assinado por:

**Renata Maria dos Santos
Celeghini
(Coordenador)**

8.2 ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa: “Avaliação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs), medidos por autofluorescência da pele, e sua associação com doença cardiovascular e distúrbio mineral ósseo em pacientes em hemodiálise”.

Nomes dos responsáveis: Renata de Almeida França, Rodrigo Bueno de Oliveira, Jacqueline Costa Teixeira Caramori, Cynthia de Moura Borges, Andre de Barros Albuquerque Esteves, Kélcia Rosana da Silva Quadros, Viviane Barcellos Menon.

Número do CAAE: 45943115.9.0000.5404

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:

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte em pacientes com doença renal crônica que estão submetidos ao tratamento regular por hemodiálise. A aterosclerose, que é o acúmulo de gordura nas paredes das artérias, e as toxinas acumuladas no sangue devido ao mau funcionamento dos rins contribuem para agravar as doenças cardiovasculares em pacientes em hemodiálise.

Chamamos essas toxinas de toxinas urêmicas, dentre as quais estão os produtos finais da glicação avançada (*advanced glycation end products* - AGEs), que parecem estar aumentados no sangue de pacientes renais crônicos e devem contribuir negativamente com as doenças do coração e vasos, além de alterar o metabolismo mineral e ósseo.

Através da medida de autofluorescência da pele (AF) pelo AGE – Reader™ é possível quantificar os níveis dessa toxina na pele. A medida indireta dos níveis de AGEs na pele é indolor, rápida e não afeta a sua rotina de tratamento. O seu antebraço será colocado sobre o aparelho que capta a luz emitida pela sua pele e calcula o resultado. O procedimento dura 5 minutos e será feito antes da sessão de hemodiálise, uma única vez, utilizando o aparelho AGE – Reader™.

O objetivo deste estudo é identificar associações dos AGEs com parâmetros clínicos, exames de sangue, de imagem (radiografias e ecocardiograma) e análise histomorfométrica óssea. A partir da análise dos resultados dessas variáveis, tentaremos identificar as relações dos AGEs com doenças cardiovasculares e ósseas em pacientes renais crônicos em programa de hemodiálise.

Procedimentos:

1. Será preenchida uma ficha com algumas informações suas, tais como idade, sexo, causa da sua doença renal crônica, dados da hemodiálise (tempo em hemodiálise, via de acesso), doenças associadas como hipertensão e diabetes melito, tabagismo e medicações em uso, além de preencher um recordatório alimentar durante três dias consecutivos, que consiste em anotar todos os alimentos e bebidas que foram ingeridos durante determinado dia, incluindo a quantidade e o horário em que o consumo ocorreu.
2. Serão realizadas medidas de estatura, peso, circunferência abdominal, circunferência de quadril, cálculo de índice de massa corporal, pressão arterial pré- e pós-sessão de hemodiálise, nos braços e nas pernas, cálculo do índice tornozelo-braquial.
3. Será utilizado um aparelho, chamado AGE-Reader™, para medidas das substâncias chamadas AGEs em sua pele. O método é rápido, não-invasivo e indolor. Três medidas em sequência serão realizadas antes e depois da segunda sessão de hemodiálise da semana.
4. Os exames de sangue e imagens que serão analisados são os rotineiramente pedidos para pacientes com DRC em tratamento dialítico. Além disso, durante a pesquisa serão colhidos uma única vez aproximadamente 10 ml de sangue para exames laboratoriais que não são rotineiramente feitos no seu tratamento de hemodiálise. Esses exames de sangue visam compreender como o seu metabolismo ósseo funciona. Esse sangue será congelado e guardado no laboratório para ser analisado posteriormente. Se você não tiver feito recentemente, serão solicitadas radiografias de mãos, pelve e abdome, densitometria óssea, EcoDopplercardiograma, e ultrassonografia das artérias carótidas.
5. 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:

Você não deve participar deste estudo se não se sentir confortável para realização do inquérito alimentar, dosagem dos AGEs ou a realização de exames de imagem. A realização da radiografia simples não é indicada de rotina em pacientes gestantes, portanto, informe o seu médico se você está grávida ou se há possibilidade de estar grávida.

Os potenciais desconfortos e riscos estão relacionados à coleta de sangue através de colocação de agulha na veia e à biópsia óssea. Entre os riscos relacionados à punção venosa se destacam o desconforto, a possibilidade de infecção, além de hematoma ou inchaço temporário. Em pacientes dialíticos, as amostras de sangue serão obtidas através da punção venosa das sessões de hemodiálise. Já com relação à biópsia óssea, os principais riscos são hematoma, sangramento ou infecção local, além de dispepsia (desconforto digestivo) causada pelo antibiótico usado por 2 dias seguidos, 10 dias e 3 dias antes da biópsia óssea. Você poderá ir embora após 2 horas de observação, devendo realizar repouso relativo por 24 horas após a biópsia óssea. Não será necessária internação hospitalar para a realização de exames, sendo todos feitos ambulatorialmente.

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. Com base nos resultados obtidos, esperamos conhecer mais sobre a ação dos produtos finais da glicação 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 e da biópsia óssea, para verificar a ocorrência dos desconfortos e riscos citados acima. Em caso de intercorrências relacionadas aos procedimentos do estudo, você poderá entrar em contato telefônico, com a Dra. Renata França, ou, a qualquer momento, com o Centro Integrado de Nefrologia (telefones listados no final deste termo) e receberá as orientações para o seu atendimento médico para que, caso necessário, uma conduta terapêutica adequada possa ser adotada.

Além disso, realizaremos acompanhamento durante as sessões de terapia dialítica, com datas previamente agendadas, no qual será informado a respeito de resultados dos exames laboratoriais e de imagem, com esclarecimento de medidas terapêuticas caso seja detectado situações com necessidade de intervenção médica.

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:

Todos os exames e procedimentos médicos serão realizados, de preferência, no dia da realização da sessão de hemodiálise, para evitar despesas adicionais com transporte, ou conforme a disponibilidade do paciente. Você não receberá nenhum ressarcimento de despesas ao participar do estudo ou nenhuma forma de compensação financeira para participar do estudo.

Armazenamento de material:

O seu sangue e fragmento ósseo serão armazenados para repetição de exames já realizados, caso ocorram dúvidas ou para realização de novos exames que possam vir a contribuir para a conclusão da pesquisa, assim evitaremos a necessidade de novas coletas. Toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

O sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo sujeito da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes.

Ao final do período de realização da pesquisa, o material biológico humano armazenado deverá ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, mediante aprovação do CEP.

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP

O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações: após 3 anos da coleta de sangue, ou imediatamente quando solicitado pelo paciente ou seu responsável legal.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.

(indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

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

Dra. Renata de Almeida França

Centro Integrado de Nefrologia - Unicamp

Rua Vital Brasil, 251, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”

Distrito de Barão Geraldo – Campinas, SP.

Telefones: (19) 3521-7881 e (19) 99919-9916

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:

Assinatura do participante ou nome e assinatura do responsável:

Campinas, __/__/____

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: __/__/__

(Assinatura do pesquisador)

8.3 ANEXO III: Artigo publicado no Jornal Brasileiro de Nefrologia

Advanced glycation end-products (AGEs) accumulation in skin: relations with chronic kidney disease-mineral and bone disorder

Acúmulo dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) na pele: relações com o distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica

Authors

Renata de Almeida França ¹
André de Barros Albuquerque Esteves ¹
Cynthia de Moura Borges ¹
Kélcia Rosana da Silva Quadros ¹
Luiz Carlos Nogueira Falcão ¹
Jacqueline Costa Teixeira Caramori ²
Rodrigo Bueno de Oliveira ¹

¹ Universidade Estadual de Campinas.

² Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Submitted on: 12/15/2016.
Approved on: 3/3/2017.

Correspondence to:

Rodrigo Bueno de Oliveira.
Universidade Estadual de Campinas.
Rua Tessália Vieira de Camargo, nº 126, Campinas, Brazil.
CEP: 13083-887
E-mail: rodrigobueno.hc@gmail.com

DOI: 10.5935/0101-2800.20170042

ABSTRACT

Introduction: Chronic kidney disease (CKD) is associated with high morbidity and mortality rates, main causes related with cardiovascular disease (CVD) and bone mineral disorder (CKD-BMD). Uremic toxins, as advanced glycation end products (AGEs), are non-traditional cardiovascular risk factor and play a role on development of CKD-BMD in CKD. The measurement of skin autofluorescence (sAF) is a noninvasive method to assess the level of AGEs in tissue, validated in CKD patients. **Objective:** The aim of this study is analyze AGEs measured by sAF levels (AGEs-sAF) and its relations with CVD and BMD parameters in HD patients. **Methods:** Twenty prevalent HD patients (HD group) and healthy subjects (Control group, n = 24), performed biochemical tests and measurements of anthropometric parameters and AGEs-sAF. In addition, HD group performed measurement of intact parathormone (iPTH), transthoracic echocardiogram and radiographies of pelvis and hands for vascular calcification score. **Results:** AGEs-sAF levels are elevated both in HD and control subjects ranged according to the age, although higher at HD than control group. Single high-flux HD session does not affect AGEs-sAF levels. AGEs-sAF levels were not related to ventricular mass, interventricular septum or vascular calcification in HD group. AGEs-sAF levels were negatively associated with serum iPTH levels. **Conclusion:** Our study detected a negative correlation of AGEs-sAF with serum iPTH, suggesting a role of AGEs on the pathophysiology of bone disease in HD prevalent patients. The nature of this relation and the clinical application of this non-invasive methodology for evaluation AGEs deposition must be confirmed and clarified in future studies.

Keywords: hemodialysis units, hospital; parathyroid hormone; cardiovascular diseases; bone diseases; glycosylation end products, advanced.

RESUMO

Introdução: A doença renal crônica (DRC) apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sendo a doença cardiovascular (DCV) e o distúrbio mineral e ósseo da DRC (DMO-DRC) complicações frequentes. As toxinas urêmicas, dentre elas os produtos finais da glicação avançada (AGEs), são fatores de risco cardiovascular não tradicionais e se encontram envolvidas no desenvolvimento do DMO-DRC na DRC. A medida da autofluorescência da pele (sAF) é método não invasivo para quantificação do acúmulo tecidual de AGEs validado em pacientes portadores de DRC. **Objetivos:** O objetivo deste estudo é avaliar as relações entre os AGEs medidos por sAF (AGEs-sAF) e parâmetros de DCV e DMO-DRC em pacientes em hemodiálise (HD). **Métodos:** 20 pacientes em HD (grupo HD) e 24 indivíduos hígidos (grupo controle) foram submetidos à análise bioquímica sérica, medidas antropométricas e de sAF. O grupo HD realizou medida de hormônio intacto da paratireoide (PTHi), ecocardiograma transtorácico e radiografias de pelve e mãos para pesquisa de calcificação vascular. **Resultados:** Os níveis de AGEs-sAF foram elevados para a idade nos grupos HD e controle, porém mais elevados no grupo HD. Sessão única de HD de alto-fluxo não afetou os níveis de AGEs-sAF. Os níveis teciduais de AGEs não se correlacionaram com massa ventricular, espessura de septo interventricular ou calcificação vascular no grupo HD. Os níveis de AGEs-sAF se correlacionaram negativamente com os níveis séricos de PTHi. **Conclusão:** Nosso estudo detectou correlação negativa entre os níveis de AGEs-sAF e os níveis séricos de PTHi, sugerindo que os AGEs estejam envolvidos na fisiopatologia da doença óssea em pacientes em HD. A natureza desta relação e a aplicação clínica deste método não invasivo de avaliação do acúmulo tecidual de AGEs deve ser confirmada e elucidada por estudos futuros.

Palavras-chave: hemodiálise; hormônio intacto da paratireoide; doenças cardiovasculares; doenças ósseas; produtos finais de glicosilação avançada.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is associated with high rates of morbidity and mortality. Patients under hemodialysis (HD) treatment have five-fold shorter life expectancy than healthy subjects do at the same age. The main causes of death in patients with end stage kidney disease (ESKD) are associated with cardiovascular disease (CVD) and bone mineral disorder (CKD-MBD).^{1,2}

In addition to traditional cardiovascular risk factors, uremic toxins are non-traditional factors associated with mortality in CKD patients. Advanced glycation end-products (AGEs) are uremic toxins which are elevated in CKD because of increased production by oxidative stress, impaired renal excretion and diet consumption.³ The measurement of skin autofluorescence (sAF) is a noninvasive method used to indirectly evaluate the accumulation of AGEs in this tissue. This methodology was validated in studies, including those with CKD patients, through the comparison between AGEs-sAF values and density of AGEs in skin biopsies processed by immunohistochemistry for AGEs.³⁻⁵

AGEs accumulation on tissue proteins seems to be a contributing factor in atherosclerosis. Some studies revealed elevated levels of AGEs in patients with coronary artery disease,⁶ carotid artery stenosis⁷ and peripheral artery disease,⁸ irrespective of diabetes *mellitus* (DM) or renal disease.⁹ For these reasons AGEs have been described as a predictor of cardiovascular mortality.^{3,10}

Another important potential clinical application of AGEs evaluation through sAF is to investigate its relations with CKD-MBD. Of note, AGEs seems to do negative effects on bone quality by mechanisms that are not fully elucidated, being associated with osteoporosis and osteopenia.¹¹ AGEs can reduce bone formation by interfering with the production of matrix proteins and inducing mesenchymal stem cells apoptosis.¹¹ Furthermore, AGEs may interfere with the osteoblast differentiation, proliferation and mineralization, actions that were demonstrated in cell culture studies.^{11,12}

AGEs seems to be involved in the pathogenesis of adynamic bone disease in CKD patients by inhibiting osteoblastic activity and parathormone secretion.¹³ Since AGEs could act on bone turnover by multiple mechanisms, they are probably related to serum intact

parathormone (iPTH), the most commonly used biomarker that supports CKD-MBD management,¹⁴ although this issue was not proven yet.

Considering that AGEs can affect both bone tissue and cardiovascular system, this study aim to evaluate the relations between AGEs accumulation in skin measured by sAF (AGEs-sAF) and CKD-MBD parameters through analysis of clinical, biochemical and image studies in a cohort of patients under chronic HD treatment.

MATERIALS AND METHODS

STUDY DESIGN AND SUBJECTS

This pilot study is an observational, transversal, controlled, single-center study involving CKD patients under HD treatment. Patients included in HD group (N = 20) were recruited from the Nephrology Department's outpatient HD clinic at Hospital das Clínicas, University of Campinas. All patients receiving chronic HD were dialyzed thrice weekly for four hours with high-flux and high-efficiency polysulphone dialyzers. The inclusion criteria for the study are as follows: age > 18 years old; undergoing HD for more than three months. Exclusion criteria were: skin phototypes "V" and "VI" by Fitzpatrick classification¹⁵ (skin colors that not allow the precise measurement of AGE-sAF by AGE-Reader™ following manufacturer's instructions), have clinical instability, cancer or HIV.

In order to compare the measurements of AGEs-sAF values we used a control group with apparently normal healthy subjects (n = 24) that fulfill following criteria: aged between 20 and 70 years; serum creatinine < 1.2 mg/dL; serum albumin > 3.5 mg/dL; do not have the diagnostic of DM, chronic inflammatory disease, not be pregnant or using medicines that exert influences on bone metabolism (i.e., anticonvulsants, bisphosphonates, calcimimetics, calcitonin, corticosteroids, GnRH analogs, vitamin D, dicumarinic, hormone replacement therapy, and thyroid treatments).

Written informed consent was obtained from all subjects, and the ethics committee of the University of Campinas approved the study protocol (CAAE 38406514.6.0000.5404). The study was performed in accordance with the precepts of the Declaration of Helsinki.

STUDY PROTOCOL

All patients were on their HD schedule in the second session of the week in order to perform laboratory blood tests and measurements of anthropometric parameters, blood pressure and AGEs-sAF.

Height and weight were measured without shoes, and without heavy clothing. Body mass index (BMI) was defined as weight (kg) divided by square of height (m²). Waist circumference (WC) was measured midway between the last rib and the crest of the ileum and hip circumference (HC) around the pelvis at the point of maximum protrusion of the buttocks, both in a horizontal plane, without compressing the soft tissues. WC and HC were recorded to the nearest cm and waist-to-hip ratio (WHR) was defined as a ratio of WC to HC. Systolic blood pressure was measured on the left arm in control group and on contralateral arm which do not have an arteriovenous fistula in HD patients.

In patients from HD group, transthoracic echocardiogram was performed to analyze left ventricular mass, valve calcification and interventricular septum thickness. Vascular calcification was evaluated in plain radiographic films of pelvis and hands by simple score proposed by Adragão *et al.*¹⁶ ranging from 0 to 8. The pelvis radiographic films were divided into four sections by two imaginary lines: a horizontal line over the upper limit of both femoral heads and a median vertical line over the vertebral column. The films of the hands were divided, for each hand, by a horizontal line over the upper limit of the metacarpal bones. The presence of linear calcifications in each section was counted as "1" and its absence as "0". Vascular calcifications were evaluated only in the follow arteries: iliacs, femorals, radials and digitals by the same observer.

An interview was conducted with all subjects focusing on comorbidities and disease history, both in general and specific previous cardiovascular disease (CVD). History of CVD was considered positive if the following events were present: myocardial infarction, stroke, heart failure, angina *pectoris* or surgical procedures for angina or coronary/peripheral artery disease (including percutaneous-transluminal angioplasty). The patient's medical files were reviewed in order to identify and record any concomitant medications. Patients and healthy subjects were classified according Framingham risk.¹⁷

LABORATORY TESTS

Blood samples were collected immediately before the second HD session of the week or in a previously scheduled date in control group. Serum creatinine, urea, potassium, hemoglobin, hematocrit, calcium, phosphate, alkaline phosphatase, iron, ferritin, transferrin saturation, fasting glycemia, glycated hemoglobin, total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol (LDL), high density lipoprotein cholesterol (HDL), triglycerides, uric acid, C-reactive protein, 25-hydroxyvitamin D (chemiluminescence method), albumin, β 2-microglobulin and bicarbonate levels were assayed in an on-site biochemistry laboratory using standard auto-analyzer techniques (Modular IPR system, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Serum intact 1-84-parathormone (iPTH) was determined by a chemiluminometric immunoassay (Liaison N-tact PTH CLIAR, Diasorin, Stillwater).

MEASUREMENT OF AGEs-sAF

Tissue accumulation of AGEs was indirectly measured by evaluation of sAF with an instrument named AGE-Reader™ according to the supplier's recommendations (DiagOptics BV, Groningen, The Netherlands). This desktop device uses AGEs fluorescent properties to measure sAF, which is calculated as the ratio between the emission light and reflected excitation light, and is expressed in arbitrary units (AU).^{4,5} sAF was assessed on the ventral site of the lower arm. Pre- and post-HD evaluations of AGEs-sAF were performed in the second HD sessions of the week, on contralateral arm which do not have an arteriovenous fistula or left arm (control group).

All the measurements were performed in triplicate at room temperature in a room with windows covered by curtains to avoid sun illumination (semi-dark). The mean value of the triple measurement was used for further analysis. To rank AGEs tissue levels according to the age we used the reference values established in a Dutch cohort.¹⁸

STATISTICAL ANALYSIS

Data were expressed as the mean $\pm$ SD, median and interquartile range or frequency, as appropriate. For descriptive and analytical purposes, data from patients in HD group were stratified according to the median AGEs-sAF levels (sAF AGEs < 2.7 AU *versus* $\geq$ 2.7 AU). Intergroup comparisons were performed using a χ^2 test for categorical variables

and Student's t-test or a Mann-Whitney test for continuous variables. Pearson's correlation coefficient or Spearman's rank correlation was used to assess the relationships between AGEs-sAF and selected clinical or biochemical variables. The threshold for statistical significance was set to bicaudal $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS software (version 17.0, SPSS Inc., Chicago).

RESULTS

Twenty-four healthy subjects (control group) and 20 patients (HD group) had completed the study. Clinical and demographic characteristics, as well biochemistry results are shown on Tables 1 and 2.

TABLE 1 CLINICAL AND DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS ACCORDING TO CONTROL AND HEMODIALYSIS GROUPS

Parameters	Control (n = 24)	HD (n = 20)	<i>p</i>
Age (years)	38 ± 9	38 ± 19	0.85
Female gender, n (%)	14 (58)	9 (43)	0.3
BMI (Kg/m ²)	25 ± 4	23.5 ± 6	0.3
Waist circumference (cm)	83.5 ± 14	87 ± 17	0.47
Waist-to-hip ratio	0.84 ± 0.1	0.92 ± 0.1 ^a	0.009
SBP (mmHg)	110 ± 9	132 ± 18 ^a	0.001

HD: Hemodialysis; BMI: Body mass index; SBP: Systolic blood pressure. ^a $p < 0.05$.

In control group, AGEs-sAF according to their age was higher in 22 (91%) subjects (2.3 ± 0.4 AU). AGEs-sAF were positively correlated with age ($R = 0.77$; $p = 0.001$), as well the serum C-reactive protein ($R = 0.48$; $p = 0.03$), triglycerides ($R = 0.43$; $p = 0.03$), total cholesterol ($R = 0.54$; $p = 0.006$) and glycated hemoglobin levels ($R = 0.46$; $p = 0.02$). Systolic blood pressure ($R = 0.46$; $p = 0.02$) and BMI ($R = 0.45$; $p = 0.02$) were clinical parameters positively associated with the parameter "age". The Framingham cardiovascular (CV) risk score were intermediate in 2 (8%) and low in 18 (91%) subjects.

In HD group, AGEs-sAF according to their age was high in all HD patients (2.6 ± 0.4 AU). Pre- and post-HD session AGEs-sAF measurements did not differ between them (2.6 ± 0.4 vs. 2.6 ± 0.4 ; $p = 0.18$), and were positively correlated ($R = 0.862$; $p = 0.0001$). Serum levels of iPTH were 397 ± 386 pg/mL, 25-hydroxyvitamin D 36.6 ± 11 ng/mL, bicarbonate 19 ± 3 mmol/L, alkaline phosphatase 94 ± 64 IU/mL and β_2 -microglobulin 4.6 ± 0.9 mg/mL. The Framingham cardiovascular (CV) risk score were high in 1 (5%), intermediate in 2 (10%) and low in 17 (85%) patients.

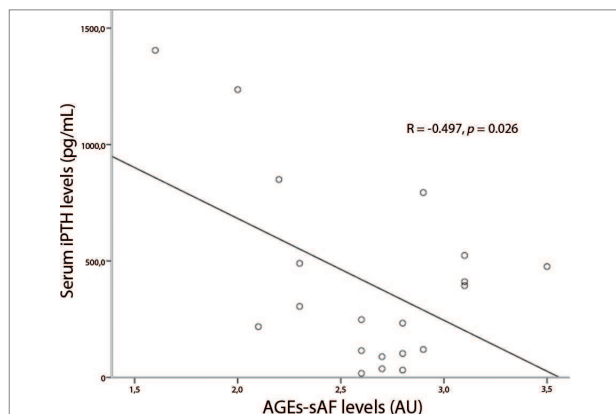
We found a negative correlation between serum iPTH levels and AGEs-sAF levels in patients in HD group ($R = -0.497$; $p = 0.026$) (Figure 1). Parameters

TABLE 2 BIOCHEMICAL AND LABORATORY PARAMETERS ACCORDING TO CONTROL AND HEMODIALYSIS GROUPS

Parameters	Control (n = 24)	HD (n = 20)	<i>p</i>
AGEs-sAF (AU)	2.3 ± 0.4	2.6 ± 0.4	0.031
Glycemia (mg/dL)	86 ± 9	77 ± 23	0.12
Glycated hemoglobin (%)	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.7	0.54
Ferritin (ng/mL)	129 (103-171)	519 (414-750)	0.001
C-reactive protein (mg/dL)	0.2 ± 0.2	1.7 ± 3	0.03
Albumin (g/dL)	4.4 ± 0.2	3.8 ± 0.5	0.001
Total cholesterol (mg/dL)	185 ± 37	145 ± 33	0.001
LDL-cholesterol (mg/dL)	106 ± 29	77 ± 23	0.01
HDL-cholesterol (mg/dL)	54 ± 12	39 ± 13	0.001
Triglycerides (mg/dL)	133 ± 102	143 ± 61	0.68
Uric acid (mg/dL)	4.9 ± 1.2	6.7 ± 1.1	0.001
Urea (mg/dL)	29 ± 7	136 ± 38	0.001
Creatinine (mg/dL)	0.79 ± 0.14	11 ± 2.8	0.001
Hemoglobin (g/dL)	14 ± 1	10.3 ± 1.7	0.001
Hematocrit (%)	43 ± 3	32.2 ± 5	0.001

HD: Hemodialysis; AGEs-sAF: Advanced glycation end products; sAF: Skin autofluorescence; AU: Arbitrary unit; LDL: Low density lipoprotein; HDL: High density lipoprotein.

Figure 1. Relations between advanced glycation end products measured by skin autofluorescence (AGEs-sAF) and serum parathormone levels. AU, arbitrary units.



of CVD and bone and mineral metabolism were also analyzed in HD group as a function of the median of AGEs-sAF levels (i.e., < 2.7 and ≥ 2.7 AU) (Table 3). In this analysis serum iPTH levels in patients with AGEs-sAF < 2.7 AU were almost twofold higher from those with AGEs-sAF ≥ 2.7 AU, although this difference do not reach statistical significance (543 ± 503 vs. 292 ± 246 pg/mL, $p = 0.16$). All others parameters related with bone metabolism, like serum alkaline phosphatase (96 ± 88 vs. 97 ± 43 , $p = 0.98$), total calcium (9 ± 1.2 vs. 9.2 ± 0.5 , $p = 0.65$) and phosphate levels (4.3 ± 1.2 vs. 4.9 ± 2 , $p = 0.46$) were similar. In regard of CVD parameters, interventricular septum (9.7 ± 2.7 vs. 8.2 ± 1 mm, $p = 0.11$), left ventricular mass (193 ± 87 vs. 135 ± 42 g, $p = 0.08$) and vascular calcification score (2 ± 2.5 vs. 1.7 ± 1.9 , $p = 0.76$) did not differ according to median AGEs-sAF levels.

The comparisons between groups revealed that patients in HD group had significantly higher mean AGEs-sAF levels than did control group (2.6 vs. 2.3 ; $p = 0.031$). As expected, most part of traditional cardiovascular risk factors was noted in HD group. For example, they had higher WHR (0.92 ± 0.1 vs. 0.84 ± 0.1 ; $p = 0.009$), systolic blood pressure (132 ± 18 vs. 110 ± 9 ; $p = 0.001$), higher levels of inflammatory markers like serum ferritin [519 (414 – 750) vs. 129 (103 – 171); $p = 0.001$] and C-reactive protein (1.7 ± 3 vs. 0.2 ± 0.2 ; $p = 0.03$), anemia (10.3 ± 1.7 vs. 14 ± 1 ; $p = 0.001$), as well creatinine and urea levels ($p = 0.001$). Despite the presence of three (15%) patients with DM in HD group, no differences was noted on serum glycemia (86 vs. 77 ; $p = 0.12$) and glycated hemoglobin levels (5.1 vs. 5.1 ; $p = 0.54$) between the groups, which could be explained by low prevalence of DM.

DISCUSSION

Our study demonstrates three main findings. First, AGEs-sAF levels ranged according age are elevated both in HD and control groups, although it was significantly higher in HD group. Second, high-flux HD single session did not affect AGEs-sAF levels. Third, AGEs-sAF was negatively associated with serum iPTH levels, the main bone turnover marker used in CKD-MBD management.

AGEs-sAF levels ranged according to age were higher in HD group than control group. This finding was supported by some studies which have demonstrated that AGEs accumulation occurs in uremic patients, independently of the presence of DM or their serum glucose levels.^{3,10,19} Possible mechanisms of this uremic toxin accumulation in ESKD are the reduced metabolic clearance and the increased oxidative stress, in addition to higher rate of reactive carbonyl compounds formation.^{3,20} AGEs tissue accumulation can also explain, at least partially, the aging phenotype of HD patients, since is known that AGEs cause widespread damage to tissues through upregulation of inflammation and cross-linking of collagen and other proteins.²¹

In our study we observed high values of AGEs-sAF, both in healthy and HD subjects, using as reference values obtained from a Dutch study in caucasian population.¹⁸ We cannot exclude that different skin types and eating habits in our healthy subjects (control group) can at least partially, explain these results, since we know that diet-derived AGEs is an important source of this toxins²² and that skin pigmentation can influence AGEs-sAF lecture.⁵ Mook-Kanamori *et al.*²³ demonstrate that the ethnicity exerts influence on AGEs-sAF, with higher levels in Arabs and Filipinos. Limited data exists on sAF in non-caucasian population and in the best of our knowledge, no prior data exist in South Americans, as well in Brazilians sub-groups. More studies including Brazilians are needed to determine if the actual AGEs-sAF values of reference range values are applicable in our population.

In our study, AGEs-sAF pre- and post-HD high flux single session were similar. The use of different HD techniques to counteract AGEs accumulation in HD patients has been investigated, with evidences of free plasma AGEs and AGEs peptides removal by low or high flux HD during a single session. High flux and more frequent HD regime, as daily or home

TABLE 3 CLINICAL, DEMOGRAPHIC, BIOCHEMICAL AND IMAGING CHARACTERISTICS OF HEMODIALYSIS PATIENTS ACCORDING TO MEDIAN AGES-sAF LEVELS

	(n = 20)	AGEs-sAF (AU)		p
		< 2.7 (n = 10)	≥ 2.7 (n = 10)	
Age (years)	38 ± 19	40 ± 24	36 ± 26	0.67
BMI (Kg/m ²)	23.5 ± 6.3	21.3 ± 5.2	25.5 ± 7	0.15
WC (cm)	87.3 ± 17.3	82.1 ± 16.4	91 ± 19	0.30
HD vintage (months)	46 ± 21	42 ± 47	52 ± 53	0.66
Kt/V	1.5 ± 0.61	3 ± 0.5	1.6 ± 0.6	0.3
UF (L)	2.7 ± 0.7	2.6 ± 0.9	2.8 ± 0.8	0.57
Creatinine (mg/dL)	11 ± 2.8	12.4 ± 2.5	10 ± 2.7	0.06
Urea (mg/dL)	136 ± 38	138 ± 54	135 ± 24	0.84
Potassium (mEq/L)	5 ± 0.7	5.3 ± 0.5	4.9 ± 0.7	0.27
Bicarbonate (mmol/L)	18.7 ± 2.7	19.2 ± 3.5	18.3 ± 2.2	0.45
Hematocrit (%)	32.2 ± 5	31.2 ± 6.5	33 ± 3.9	0.50
Calcium (mg/dL)	9.2 ± 0.8	9 ± 1.2	9.2 ± 0.5	0.65
Phosphate (mg/dL)	4.6 ± 1.6	4.3 ± 1.2	4.9 ± 2	0.46
iPTH (pg/mL)	397 ± 385.7	543 ± 503	292 ± 246	0.16
25-OH-D (ng/mL)	36.6 ± 10.9	34.3 ± 11.6	38 ± 11	0.53
ALP (U/L)	95 ± 64	96 ± 88	97 ± 43	0.98
Ferritin (ng/dL)	575 ± 257	620 ± 226	545 ± 296	0.53
CRP (mg/dL)	1.73 ± 3.1	2.9 ± 4.4	0.9 ± 1.1	0.18
Albumin (g/dL)	3.8 ± 0.5	3.7 ± 0.6	3.8 ± 0.3	0.67
Glycose (mg/dL)	77.4 ± 24.9	89 ± 27	68 ± 21	0.07
HbA1c (%)	5.1 ± 0.7	4.9 ± 0.5	5.2 ± 0.8	0.30
IVS (mm)	8.9 ± 2	9.7 ± 2.7	8.2 ± 1	0.11
LV mass (g)	161.4 ± 68	193 ± 87	135 ± 42	0.08
Total cholesterol (mg/dL)	145 ± 33.5	133 ± 22	155 ± 40	0.16
LDL-cholesterol (mg/dL)	77.1 ± 23.5	67 ± 18	84 ± 26	0.12
HDL-cholesterol (mg/dL)	39 ± 13.4	37 ± 15	41 ± 13	0.54
Triglycerides (mg/dl)	143.3 ± 61.7	141 ± 59	148 ± 68	0.82
VC score	1.8 ± 2.1	2 ± 2.5	1.7 ± 1.9	0.76
VC score ≥ 3 (N)	6	3	3	0.62

AGEs: Advanced glycation end products measured by skin autofluorescence; AU: Arbitrary unit; BMI: Body mass index; WC: Waist circumference; HD: Hemodialysis; UF: Ultrafiltration; iPTH: Intact parathormone; 25-OH-D = 25-hydroxyvitamin D; ALP: Alkaline phosphatase; CRP: C-reactive protein; HbA1c = glycated hemoglobin; NR: Not rated; IVS: Interventricular septal thickness; LV: Left ventricular; LDL: low density lipoprotein; HDL: High density lipoprotein; VC: Vascular calcification.

dialysis, has been suggested to be modalities capable of reducing serum AGEs levels in the long-term.^{24,25} However, these previous studies had demonstrated HD influence on plasma AGEs levels, but not on skin accumulation, a tissue with low turnover. Probably, if there is, it is necessary months on HD treatment to note changes in its levels on skin.

It is suggested that AGEs-sAF is an independent predictor of overall and CVD mortality in HD patients.^{4,26} AGEs and their receptor (RAGE) play

an important role in the pathogenesis of vascular damage and cardiovascular disorders, especially in patients with diabetes and CKD. Recently, an *in vivo* study had demonstrated the association of AGEs accumulation in vessel tissues and medial arterial calcification severity in patients with renal failure.²⁷

Despite these evidences in the literature, our subjects in HD group did not shown significantly differences in CV parameters according AGEs-sAF levels, namely, interventricular septum thickness,

left ventricular mass, and vascular or valve calcification. Since AGEs seems to be associated with atherosclerosis, further studies including carotid ultrasound in HD population can improve findings of vascular calcification. Furthermore, the present study did not associated AGEs-sAF to metabolic stress markers, glycated hemoglobin, C-reactive protein and hyperlipidemia, in opposition to previous studies, probably due our study sample size.^{5,28}

AGEs negative effects on bone tissue have been described since is known your association with osteoporosis.²⁹ Many studies using cell culture experiments have been done to clarify AGEs effects on bone tissue, demonstrating multiple possible mechanisms as following: stimulating osteoblasts apoptosis,³⁰ impairing growth factors or osteogenic cells adhesion to bone matrix,¹¹ inhibiting osteoblastic differentiation,³¹ stimulating osteoblasts to secrete bone-resorbing cytokines,³² and enhancing osteoclast bone resorption.³³

Recently, is speculate AGEs participation on CKD-MBD pathophysiology, mainly in adynamic bone disease.³⁴ Yamamoto *et al.*¹³ had described that AGEs can inhibit osteoblastic activity and parathyroid hormone secretion in response to hypocalcemia. In our study we detected a negative correlation of AGEs -sAF with serum iPTH, suggesting a role of AGEs on the pathophysiology of bone disease in HD prevalent patients. These findings must be confirmed in future studies with bone biopsy and serum dosage of AGEs to clarify AGEs effect on CKD-MBD.

This pilot study has several limitations. Potential influences of ethnicity and diet limit definitive conclusions. In addition, we did not have performed AGEs analysis on serum or bone histomorphometry studies. However, to the best of our knowledge, this is the first Brazilian study performed in HD patients using sAF to analyze AGEs tissue accumulation and their relations with CVD parameters and markers of bone metabolism.

In conclusion, AGEs-sAF levels were higher in HD group than control. Surprisingly, some apparently healthy subjects had high AGEs-sAF levels expected according to their age. Single high-flux HD session seems not affect AGEs-sAF levels. A negative relation between AGEs-sAF levels and serum iPTH levels was observed suggesting a role of AGEs on the pathophysiology of bone disease in prevalent HD patients. The nature of this relation and the clinical application of this non-invasive methodology for

evaluation AGEs deposition must be confirmed and clarified in future studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors declare that this research received no specific grant from any funding agency and acknowledge J.B. Lopes de Faria (Renal Pathophysiology Laboratory, Investigation on Diabetes Complications, School of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil) which has supplied the instrument AGE-Reader.

REFERENCES

1. National Kidney Foundation. 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;3:4-150.
2. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998;32:S112-9. PMID: 9820470 DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/ajkd.1998.v32.pm9820470>
3. Arsov S, Graaff R, van Oeveren W, Stegmayr B, Sikole A, Rakhorst G, et al. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:11-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2012-0832>
4. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3687-93. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2005020144>
5. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* 2004;47:1324-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-004-1451-2>
6. Mulder DJ, van Haelst PL, Gross S, de Leeuw K, Bijzet J, Graaff R, et al. Skin autofluorescence is elevated in patients with stable coronary artery disease and is associated with serum levels of neopterin and the soluble receptor for advanced glycation end products. *Atherosclerosis* 2008;197:217-23. PMID: 17499742 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.027>
7. Lutgers HL, Graaff R, de Vries R, Smit AJ, Dullaart RP. Carotid artery intima media thickness associates with skin autofluorescence in non-diabetic subjects without clinically manifest cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest* 2010;40:812-7. PMID: 20597962 DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02329.x>
8. Noordzij MJ, Lefrandt JD, Loeffen EA, Saleem BR, Meerwaldt R, Lutgers HL, et al. Skin autofluorescence is increased in patients with carotid artery stenosis and peripheral artery disease. *Int J Cardiovasc Imaging* 2012;28:431-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10554-011-9805-6>
9. den Dekker MA, Zwieters M, van den Heuvel ER, de Vos LC, Smit AJ, Zeebregts CJ, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive marker for AGE accumulation, is associated with the degree of atherosclerosis. *PLoS One* 2013;8:e83084. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083084>
10. Tanaka K, Tani Y, Asai J, Nemoto F, Kusano Y, Suzuki H, et al. Skin autofluorescence is associated with renal function and cardiovascular diseases in pre-dialysis chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:214-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfq369>

11. Fong Y, Edelstein D, Wang EA, Brownlee M. Inhibition of matrix-induced bone differentiation by advanced glycation end-products in rats. *Diabetologia* 1993;36:802-7. PMID: 8405750 DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00400353>
12. Notsu M, Yamaguchi T, Okazaki K, Tanaka K, Ogawa N, Kanazawa I, et al. Advanced glycation end products inhibit the mineralization of mouse stromal ST2 cells by binding the receptor for ages and increasing TGF- β expression and secretion. *J Bone Miner Res.* 2013;28:2402-10. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&cid=L71507582&nhttp://rug.on.worldcat.org/atoztitles/link/?sid=EMBASE&issn=08840431&cid=doi:&catitle=Advanced+glycation+end+products+inhibit+the+mineralization+of+mouse+stromal+ST2+cells+b>
13. Yamamoto T, Ozono K, Miyauchi A, Kasayama S, Kojima Y, Shima M, et al. Role of advanced glycation end products in adynamic bone disease in patients with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001;38:S161-4. PMID: 11576945 DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/ajkd.2001.27428>
14. Herberth J, Monier-Faugere MC, Mawad HW, Branscum AJ, Herberth Z, Wang G, et al. The five most commonly used intact parathyroid hormone assays are useful for screening but not for diagnosing bone turnover abnormalities in CKD-5 patients. *Clin Nephrol* 2009;72:5-14. PMID: 19640382 DOI: <http://dx.doi.org/10.5414/CNP72005>
15. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988;124:869-71. PMID: 3377516 DOI: <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.1988.01670060015008>
16. Adragão T, Pires A, Lucas C, Birne R, Magalhaes L, Gonçalves M, et al. A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1480-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfh217>
17. Kannel WB, McGee D, Gordon T. A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. *Am J Cardiol* 1976;38:46-51. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9149\(76\)90061-8](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9149(76)90061-8)
18. Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaff R. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther* 2010;12:399-403. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/dia.2009.0113>
19. Miyata T, Wada Y, Cai Z, Iida Y, Horie K, Yasuda Y, et al. Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int* 1997;51:1170-81. PMID: 9083283 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1997.160>
20. Agalou S, Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Dawney A, Thornalley PJ. Profound mishandling of protein glycation degradation products in uremia and dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1471-85. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2004080635>
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;65:963-75. PMID: 20478906
22. Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppia M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:461-6. PMID: 16037267
23. Mook-Kanamori MJ, Selim MM, Takiddin AH, Al-Homsi H, Al-Mahmoud KA, Al-Obaidli A, et al. Ethnic and gender differences in advanced glycation end products measured by skin autofluorescence. *Dermatoendocrinol* 2013;5:325-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/derm.26046>
24. Stein G, Franke S, Mahiout A, Schneider S, Sperschneider H, Borst S, et al. Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:999-1008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/16.5.999>
25. Arsov S, Trajceska L, van Oeveren W, Smit AJ, Dzekova P, Stegmayr B, et al. Increase in skin autofluorescence and release of heart-type fatty acid binding protein in plasma predicts mortality of hemodialysis patients. *Artif Organs* 2013;37:E114-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/aor.12078>
26. Floridi A, Antolini F, Galli F, Fagugli RM, Floridi E, Buon cristiani U. Daily haemodialysis improves indices of protein glycation. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:871-8 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/17.5.871> DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/17.5.871>
27. Janda K, Krzanowski M, Gajda M, Dumnicka P, Jasek E, Fedak D, et al. Vascular effects of advanced glycation end-products: content of immunohistochemically detected AGEs in radial artery samples as a predictor for arterial calcification and cardiovascular risk in asymptomatic patients with chronic kidney disease. *Dis Markers* 2015;2015:153978. PMID: 25852219 DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/153978> DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/153978>
28. Nagano M, Fukami K, Yamagishi S, Sakai K, Kaida Y, Matsumoto T, et al. Tissue level of advanced glycation end products is an independent determinant of high-sensitivity C-reactive protein levels in haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)* 2011;16:299-303. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01419.x> DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01419.x>
29. Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr Drug Targets* 2011;12(14):2096102. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138945011798829456> DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138945011798829456>
30. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, et al. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone* 2007;40:345-53. PMID: 17064973 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.011> DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.011>
31. Okazaki K, Yamaguchi T, Tanaka K, Notsu M, Ogawa N, Yano S, et al. Advanced glycation end products (AGEs), but not high glucose, inhibit the osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells through the suppression of osterix expression, and inhibit cell growth and increasing cell apoptosis. *Calcif Tissue Int* 2012;91:286-96.
32. Miyata T, Kawai R, Taketomi S, Sprague SM. Possible involvement of advanced glycation end-products in bone resorption. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:54-7.
33. Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, et al. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:260-70.
34. Yamamoto T, Ozono K. Role of advanced glycation endproducts in adynamic bone disease. *Clin Calcium* 2001;11:1044-7.

8.4 ANEXO IV: Artigo submetido para publicação

ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS ASSESSMENT USING SKIN AUTOFLUORESCENCE, SERUM OR DIET INTAKE: WHICH MEASUREMENT BEST RELATES TO OSTEOPOROSIS AND VASCULAR CALCIFICATION IN CHRONIC KIDNEY DISEASE?

Authors:

Kélcia R. S. Quadros^{1,2*}, M. D.; André B. A. Esteves^{1,2*}, M. D.; Renata A. França^{1,2}, M. D.; Noemí N. V. Roza¹, B. Sc., Ph. D.; Cinthia E. M. Carbonara^{1,2}, M. D.; Cynthia M. Borges², M. D.; Marcela Watanabe³, C. C. N; Maryanne Z. C. da Silva³, C. C. N.; Vanda Jorgetti⁴, M. D.; Ph. D.; Jacqueline T. Caramori³ M. D., Ph.D.; Rodrigo B. de Oliveira^{1,2}, M. D., Ph. D.

*These authors have contributed equally in the present study.

Affiliations:

1. **L**aboratory for **E**valuation of **M**ineral and **B**one Disorder in **N**ephrology (**LEMON**) – School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.
2. Department of Internal Medicine (Nephrology) – School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.
3. Department of Internal Medicine, Nephrology Division, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.
4. Department of Internal Medicine, Nephrology Division, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

Correspondence:

Rodrigo BUENO DE OLIVEIRA, Laboratory for Evaluation of Mineral and Bone Disorder in Nephrology (LEMON), School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil. Rua Vital Brasil, nº 300, Cidade Universitária. Campinas, SP, Brazil. Postal Code: 13083-888. Tel.: +55 19 3521-7279. E-mail: rodrigobueno.hc@gmail

Abstract

Background: Advanced glycation end products (AGEs) may be related to vascular calcification (VC) and bone loss in chronic kidney disease (CKD) patients. However, the role of AGEs in different CKD stages is unknown. We evaluated the relationships among AGEs detected via skin autofluorescence (sAF), serum and dietary intake, and metabolic and structural parameters of bone and cardiovascular disease, including VC evaluation. **Methods:** Eighty patients on conservative management, hemodialysis or peritoneal dialysis underwent evaluation of AGEs-sAF levels, serum N-carboxymethyllysine (CML), and dietary AGEs intake. AGEs-sAF levels in patients were compared to AGEs-sAF levels in healthy subjects (N=37). **Results:** CKD patients exhibited higher mean AGEs-sAF levels than controls (3.0 ± 0.6 vs. 2.4 ± 0.4 ; $p=0.0001$) despite lower total AGEs intake ($9,518 \pm 4,666$ vs. $11,943 \pm 5,581$ kU/day; $p=0.026$). High AGEs-sAF levels were detected in patients with VC ($p=0.03$) and in those with reduced bone mineral density (BMD) ($p = 0.03$). Linear regression confirmed a significant relationship between AGEs-sAF and age ($p<0.0001$), diagnosis of osteopenia or osteoporosis ($p=0.008$) and Framingham score risk ($p=0.001$). Multivariate linear regression and logistic regression analyses revealed AGEs-sAF, age and body mass index were independent determinants of VC ($ps=0.01, 0.01$ and 0.02 , respectively). **Conclusion:** AGEs-sAF levels were elevated in CKD patients despite lower AGEs intake and irrespective of CKD stage or treatment. AGEs-sAF levels, not serum CML levels or daily intake, were related to VC, cardiac risk and reduced BMD. AGEs-sAF level was an independent predictor of VC. An increase of 1 AGEs-sAF unit resulted in 3.5-fold increased odds of having linear VC.

Keywords: advanced glycation end products; chronic kidney disease; vascular calcification; osteoporosis; bone mineral density

INTRODUCTION

Mineral and bone disorders (MBD) are a major complication of chronic kidney disease (CKD) and is related to high burden mortality. (1-3) Clinical and experimental evidence have demonstrated a close relationship between a reduction in bone mineral density (BMD) and vascular calcification (VC), which is an independent predictor of death. (4-6) Hemodialysis (HD) patients exhibit an inverse relationship between bone volume and coronary arterial calcification score. (7) The progression of VC is also associated with bone loss in non-dialyzed CKD patients. (8)

Many authors have studied the pathophysiology of bone loss and VC in CKD patients. However, the mechanisms remain only partially elucidated, and new approaches directed toward modulation of the factors involved are needed. Recent attention has been focused on the study of uremic environment and uremic toxins (UT) that may interact negatively with many biological functions. (9, 10)

Advanced glycation end products (AGEs) are a type of UT that are formed via non-enzymatic glycation reactions between reducing sugars and amino acids, lipids or DNA. The elevation of serum AGEs levels in CKD patients is attributed to decreased renal clearance, increased oxidative stress and/or dietary intake. However, the effects of these compounds on bone and the cardiovascular system in various CKD stages are poorly studied. (11-13)

AGEs accumulation in tissue is a contributing factor to atherosclerosis in humans, but its impact on VC is less clear. (14-17) In rodents with VC, AGEs were observed on the elastin and collagen matrix in the femoral arteries. (18) Some studies have described the involvement of AGEs in VC in CKD patients, which suggests that AGEs accumulation may play a role in VC development and progression. (19-21).

Some evidence suggests a link between AGEs and osteoporosis. (22, 23) Elevated plasma AGEs levels were associated with impaired bone formation in postmenopausal women. (24) The proposed mechanisms involve a disrupted production of bone matrix proteins and apoptosis and disturbances in osteoblast

differentiation, proliferation and bone mineralization. (25)

The interest to evaluate the relationships among AGEs, VC and bone is amplified because this UT may be modulated via dietary interventions and dialytic strategies, which would provide a new treatment target. (26-29) The accumulation of AGEs in tissues can be indirectly measured using skin autofluorescence (sAF). This methodology is non-invasive, may be repeated many times, and has been validated in patients with CKD. (30, 31)

Clinical studies that have evaluated AGEs did not evaluate patients in different stages of CKD, including patients undergoing conservative management, HD and peritoneal dialysis (PD). A comprehensive AGEs evaluation, including measurements of serum AGEs levels, dietary AGEs intake and AGEs-sAF, is not available. Studies using measurements of AGEs-sAF in CKD patients did not include control groups for comparison. This lack of comparison is an important issue because ethnicity and regional factors influence AGEs-sAF levels.

In the present clinical study, we evaluated the relationships among AGEs, bone and cardiovascular disease in patients with different stages of CKD (i.e., CKD 3-4, HD and PD). We measured AGEs levels by sAF, serum N-carboxymethyllysine (CML) levels, and quantification of daily AGEs intake.

MATERIALS AND METHODS

Study design and patient selection

Eighty patients with different CKD stages were enrolled in this observational, controlled, double-center study from February 2016 to March 2017. Patients were recruited from the Nephrology Department's outpatient clinics at the Hospital de Clínicas of University of Campinas (UNICAMP) and State University of São Paulo (UNESP) and divided into the following groups: CKD 3-4 (N = 20), HD (N = 32) and DP (N = 28).

Inclusion criteria were age > 18 years old, CKD stages 3-4 according to *Kidney Disease Outcomes Quality (KDIGO)*, and undergoing chronic HD or PD

treatment (> 3 months). Exclusion criteria were the presence of chronic inflammatory disease, primary hyperparathyroidism, kidney transplantation, an acute cardiovascular event in the 3 months prior to screening for inclusion, cognitive impairment, cancer, HIV and clinical instability. Patients in the HD group were on chronic HD treatment 3 times weekly, 4 hours/session, using high-flux and high-efficiency polysulfone dialyzers. Patients in the PD group were receiving chronic PD treatment [automated PD (N = 18) or continuous ambulatory PD (N = 10)].

AGEs-sAF levels in all CKD patients were compared to AGEs-sAF levels from apparently normal healthy subjects (Control group, N = 37) who met the following criteria: age between 20 and 70 years; serum creatinine < 1.2 mg/dL and albumin > 3.5 mg/dL; no diagnosis of *diabetes mellitus* (DM) or chronic inflammatory disease, not pregnant or using medicines that affect bone metabolism (i.e., anticonvulsants, bisphosphonates, calcimimetics, calcitonin, native vitamin D, dicumarinic and hormone replacement therapy). Written informed consent was obtained from all subjects and patients, and the local ethics committee approved the study protocol under numbers CAAE 38108314.6.0000.5404-45943115.9.0000.5404-45777015.5.0000.5404.

Measurement of AGEs-sAF and serum AGEs levels (carboxymethyllysine)

AGEs skin deposition was evaluated by sAF using the AGE-Reader™ (DiagOptics BV, Groningen, The Netherlands), according to the supplier's recommendations. This device measures emitted fluorescence from skin that is influenced by the deposition of AGEs. The device calculates the ratio between emitted and reflected excitation light. AGEs-sAF levels were expressed in arbitrary units (AU). AGEs-sAF levels were measured in triplicate on the ventral side of the forearm, and the mean values were used for all statistical analyses. Areas with arterial-venous fistulas, scars, and tattoos were avoided. All measurements were performed in a room with windows covered by curtains to avoid sun illumination (semi-dark) and a controlled temperature (22°C).

Serum carboxymethyllysine (CML) levels, which is one of the most common circulating AGEs in serum, were measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) provided by Shanghai Blue Gene Biotech Co., Ltd. (E01C0773), according to the manufacturer's instructions. The detection range was 5 to 100 ng/mL, and the sensitivity was > 1.0 ng/mL.

Evaluation of dietary AGEs intake (total and fractions)

AGEs intake was estimated from a 3-day food record. Healthy subjects or patients and/or their caregivers were instructed to register all food and drinks consumed, provide information on food preparation methods and ingested amounts. The subjects were advised not to change their usual dietary intake during the 3 days in quality, quantity and cooking methods. Registered data were converted into standardized food weight or volume. Total AGEs and fractions of methylglyoxal (MG) and CML were estimated based on data from Uribarri *et al.* (27)

Cardiovascular disease and risk assessment

Cardiovascular disease (CVD) and risk assessment were assessed based on clinical history, serum biochemistry analysis and imaging studies. The interview focused on comorbidities and history of myocardial infarction, stroke, heart failure, angina pectoris or surgical procedures for angina or coronary/peripheral artery disease, including percutaneous transluminal angioplasty. Healthy subjects and patients were classified according Framingham risk score. (32) Risk for CVD was also determined using AGEs-sAF levels stratified by age as proposed by Koetsier *et al.* (33)

Transthoracic echocardiogram, X-ray plain films for VC detection and ankle-brachial index (ABI) measurements were performed in patients. Data, such as fraction ejection, left ventricular mass, valve calcification and interventricular septum thickness, were analyzed. The presence of VC was evaluated from X-ray plain films of the pelvis, hands and lateral abdominal incidence (aorta) using scores proposed by Adragão *et al.* and Kauppila *et al.* (34, 35) Briefly, radiographic films of the pelvis and hands were divided into four sections using two imaginary lines: a horizontal line over the upper limit of both femoral heads and a median vertical line over the

vertebral column or by a horizontal line over the upper limit of the metacarpal bones. The presence of linear VC in each section was counted as “1”, and its absence was “0” (Adragão *et al.*). Calcium (Ca) deposits in the anterior and posterior walls of the aorta parallel to vertebra L1 to L4 were visualized as scattered or linear areas of high density (Kauppilla *et al.*). These lesions were scored separately for the anterior and posterior walls and graded as follows: “0” = no aortic Ca deposits; 1 = small scattered Ca deposits filling less than one-third of the longitudinal wall of the aorta; 2 = one-third to two-thirds of the longitudinal wall of the aorta calcified; or 3 = greater than two-thirds of the longitudinal wall of the aorta calcified. The following arteries were evaluated: aorta, iliac, femoral, radial, ulnar and digital. Two observers independently analyzed X-ray plain films. A third observer issued an opinion in cases of doubt, and the most prevalent opinion was chosen.

The ankle-brachial index (ABI) was measured as follows. Patients rested for 5-minutes in the supine position, and a Doppler ultrasound (10 MHz, MEDMEGA Medical Equipment, Inc., São Paulo, Brazil) was used to detect systolic blood flow. An adult standard cuff was first inflated until blood flow on Doppler ceased and deflated slowly until the flow signal reappeared. Blood pressure was measured in the upper limbs (brachial arteries) and lower limbs (*dorsalis pedis* and posterior tibial arteries). Areas with arteriovenous fistulas were avoided in the HD group. ABI was obtained by dividing the highest systolic blood pressure obtained in the arteries of the lower limb by the highest systolic blood pressure obtained in the upper limb. The reference ranges were ≤ 0.9 or ≥ 1.4 for abnormal ABI and 0.91 to 1.39 for normal ABI. (36)

Bone and mineral metabolism assessment

BMD was assessed using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) of lumbar spine, total femur, femoral neck and distal radius using a lunar prodigy densitometer, standard densitometry protocols and analysis software provided by the manufacturer (Hologic Discovery Wi, Bedford, Marlborough, USA). The worst of the four evaluated regions was chosen for the classification of a patient's BMD as “normal”, “osteopenia” or “osteoporosis” according to their age. BMD was expressed as a T-score for

comparisons of subjects with young–normal population. Osteopenia was defined as a T-score ≤ -1.5 and ≥ -2.4 S.D., and osteoporosis was defined as a T-score ≤ -2.5 S.D.

Serum iPTH levels (reference range: 15 to 65 pg/mL) were measured using a chemiluminescence assay (Liaison N-tact PTH CLIAR, Diasorin, Stillwater, USA). Serum 25-hydroxyvitamin D levels (reference range 30 to 100 ng/dL; insufficiency < 30 ng/dL and deficiency < 10 ng/dL) were measured using a chemiluminescence method. Alkaline phosphatase (AP) (reference range: 30 to 120 IU/L) was measured using a kinetic, colorimetric test (Beckman Coulter OSR6104). Serum calcium (Ca) and phosphate (P) levels and a general serum biochemistry profile were assayed in an on-site biochemistry laboratory using standard auto-analyzer techniques. Blood samples were collected on a previously scheduled date for healthy subjects and the CKD 3-4 and DP groups. Blood samples of HD patients were collected immediately before the second HD session of the week.

Statistical analysis

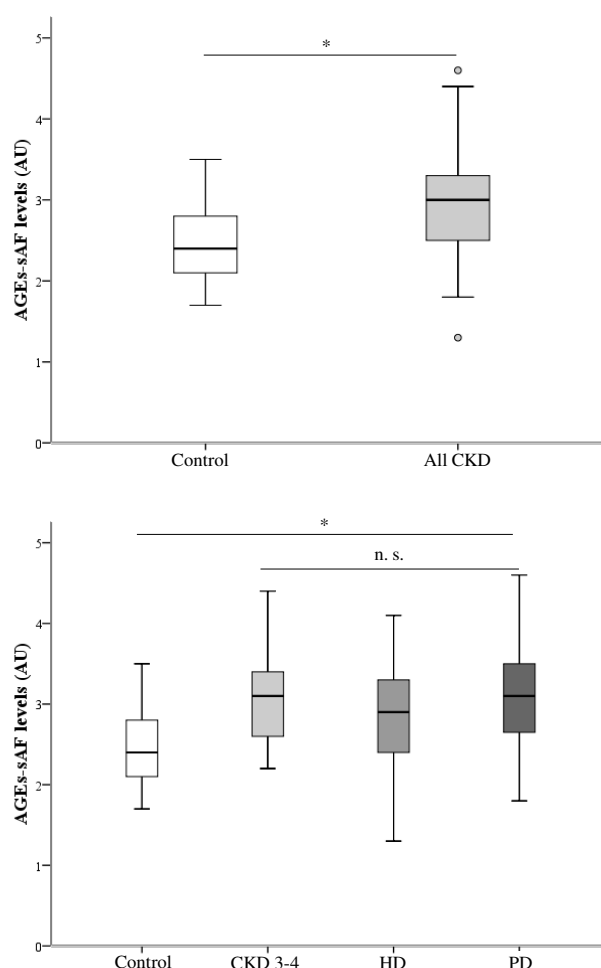
Data are expressed as the means $\pm$ S.D., medians and interquartile ranges or frequencies, as appropriate. Intergroup comparisons were performed using a χ^2 test for categorical variables and Student's t-test or a Mann–Whitney test for continuous variables. Pearson's correlation coefficient or Spearman's rank correlation was used to assess the relationships between AGEs-sAF and selected clinical or biochemical variables. A univariate regression and multivariate stepwise linear regression or logistic regression analysis were performed to identify variables correlated with AGEs-sAF levels, VC and BMD. Variables selected in an univariate regression, i.e., sex, age, smoking, DM, body mass index, glomerular filtration rate by CKDEPI equation, serum AP, iPTH levels, BMD and sevelamer use, were included in a multivariate model for determinants of AGEs-sAF and osteoporosis. Age, smoking, DM, body mass index, ABI, glomerular filtration rate by CKDEPI equation, AGEs-sAF levels, serum AP, CML, P, iPTH levels, BMD, sevelamer use, dietary total AGEs intake and dietary CML intake were included in the multivariate model for determinants of VC.

The threshold for statistical significance was $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS software (version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

The CKD population exhibited higher mean AGEs-sAF levels than healthy subjects (3.0 ± 0.6 vs. 2.4 ± 0.4 ; $p = 0.0001$), despite lower total AGEs intake ($9,518 \pm 4,666$ vs. $11,943 \pm 5,581$ kU/day; $p = 0.026$). No significant differences in AGEs-sAF levels were noted in the CKD subgroups (CKD 3-4, HD and PD) (Figure 1).

Figure 1. Comparisons of mean AGEs-sAF levels between healthy subjects (Control group) and all CKD populations and subgroups.



*, $p = 0.001$ for control vs. CKD or vs. CKD 3-4, HD and PD; AGEs-sAF, advanced glycation end products measured using skin autofluorescence; CKD, chronic kidney disease; HD, hemodialysis; PD, peritoneal dialysis; n.s., not significant.

Tables 1 and 2 show baseline characteristics, serum biochemistry and imaging findings of all CKD populations and subgroups. Patients with CKD 3-4 exhibited higher serum hemoglobin and lower iPTH, AP, and P levels than HD or PD patients. Patients in the PD group exhibited lower serum calcidiol and Ca levels and higher serum CML levels and Framingham risk scores than the other groups.

Table 1. Clinical and biochemistry findings of all CKD populations and subgroups.

Parameter	All CKD (N = 80)	CKD 3-4 (N = 20)	HD (N = 32)	PD (N = 28)	p
Age (years)	50 ± 12	53 ± 10	48 ± 13	51 ± 13	0.46
Sex (female; N, %)	35 (44)	6 (30)	12 (37)	17 (61)	0.07
Ethnicity (Caucasian; N, %)	37 (46)	10 (50)	15 (47)	12 (43)	0.88
GFR (mL/min)	6 (5-16)	27 (16-35)*	5 (4-7)	5 (4-7)	0.0001
Body mass index (kg/m ²)	26 ± 5	28 ± 5*	25 ± 5	25 ± 4	0.02
Active or prior smoking (N, %)	25 (31)	2 (10)*	14 (44)	9 (32)	0.04
Comorbidities					
Hypertension (N, %)	70 (87)	17 (85)	28 (87)	25 (89)	0.9
Diabetes <i>mellitus</i> (N, %)	13 (16)	6 (30)	0 (0)	7 (25)	0.005
Atherosclerosis [”] (N, %)	15 (19)	1 (5)	6 (19)	8 (28)	0.1
Etiology of CKD (N, %)					0.25
Hypertension	22 (27)	8 (40)	11 (34)	3 (11)	
Glomerulonephritis	16 (20)	2 (10)	8 (25)	6 (21)	
Polycystic kidney disease	3 (4)	0 (0)	2 (6)	1 (4)	
Dialysis vintage (months)	21 (10-44)	NA	23 (10-68)	17 (10-30)	0.26
Hemoglobin (g/dL)	12 ± 2	14 ± 2*	12 ± 2	12 ± 1	0.0001
Glycemia (mg/dL)	84 (77-98)	94 (83-105)	81 (73-94)	83 (75-95)	0.06
C-reactive protein (mg/dL)	2.2 (0.9-5.2)	4.7 (1.3-9.4)	1.4 (0.6-3.7)	2.1 (0.9-4.8)	0.06
Triglycerides (mg/dL)	120 (82-159)	124 (83-139)	111 (75-160)	111 (85-211)	0.76
Total cholesterol (mg/dL)	142 ± 37	151 ± 26	124 ± 28 [#]	156 ± 46	0.002
LDL cholesterol (mg/dL)	73 (56- 99)	92 (74-107)	59 (48-72) [#]	88 (57-111)	0.001
Total calcium (mg/dL)	8.9 ± 0.8	9.1 ± 0.5	9.1 ± 0.7	8.4 ± 1 ^{&}	0.001
Phosphate (mg/dL)	5.1 ± 1.6	3.7 ± 0.9*	5.9 ± 1.8	5.3 ± 1	0.0001
Alkaline phosphatase (IU/L)	91 (71- 115)	79 (60-107)*	95 (72-134)	92 (72-104)	0.17
iPTH (pg/mL)	256 (136- 453)	133 (73-218)*	372 (187-874)	292 (184-536)	0.001
25-hydroxyvitamin D (ng/dL)	29 ± 10	31 ± 13	32 ± 9	24 ± 7 ^{&}	0.014

CKD, chronic kidney disease; HD, hemodialysis; PD, peritoneal dialysis; GFR, glomerular filtration rate; LDL, low density lipoprotein; iPTH, intact parathyroid hormone. [”], history of acute myocardial infarct or stroke or peripheral vascular disease.

*, p < 0.05 for CKD 3-4 vs. HD and PD; #, p < 0.05 for HD vs. CKD 3-4 and PD; &, p < 0.05 for PD vs. CKD 3-4 and HD.

Table 2. Biochemistry and imaging findings of all CKD populations and subgroups.

Parameters	All CKD (N = 80)	CKD 3-4 (N = 20)	HD (N = 32)	PD (N = 28)	p-value
<i>AGEs related</i>					
AGEs-sAF (AU)	3.0 ± 0.6	3.0 ± 0.6	2.8 ± 0.6	3.0 ± 0.7	0.41
Serum CML (ng/mL)	15 (10-32)	10.3 (9.7-25.4)	13.2 (9-21.9)	24.7 (12.1-52.3) ^{&}	0.01
Glycated hemoglobin (%)	5.6 ± 1.0	5.9 ± 0.9	5.2 ± 0.5 [#]	5.9 ± 1.3	0.003
<i>AGEs intake</i>					
Total AGEs (kU/day)	9,518 ± 4,666	10,558 ± 5,684	8,564 ± 3,702	9,641 ± 4,688	0.41
Fraction CML (kU/day)	3,442 ± 2,980	3,790 ± 3,349	2,561 ± 1,792	3,942 ± 3,422	0.23
Fraction MG (nmol/day)	11,484 ± 6,284	10,488 ± 5,801	10,664 ± 5,480	12,778 ± 7,127	0.38
<i>Bone and cardiovascular related</i>					
T-score (DXA)	-1.8 ± 1	-1.9 ± 0.6	-1.5 ± 1.1	-1.9 ± 1.1	0.29
Osteoporosis (DXA) (N, %)	19 (27)	5 (25)	4 (17)	10 (37)	0.56
Vascular calcification (N, %)	25 (37)	6 (32)	10 (45)	9 (33)	0.58
Ankle-brachial index	1.1 (1-1.2)	1.08 ± 0.12	1.09 ± 0.19	1.07 ± 0.12	0.96
Framingham score	6 (2-9)	5 (0-7)	5 (2-7)	9 (3-12) ^{&}	0.01
Fraction of ejection (%)	67 ± 7	65 ± 4	70 ± 6 [#]	66 ± 7	0.029
Cardiac septum (mm)	10 (8-12)	9.0 (8-10)	11 (9-13) [#]	9 (8-11)	0.002
Left ventricular mass (g)	187 ± 60	162 ± 50	219 ± 54 [#]	166 ± 56	0.0001

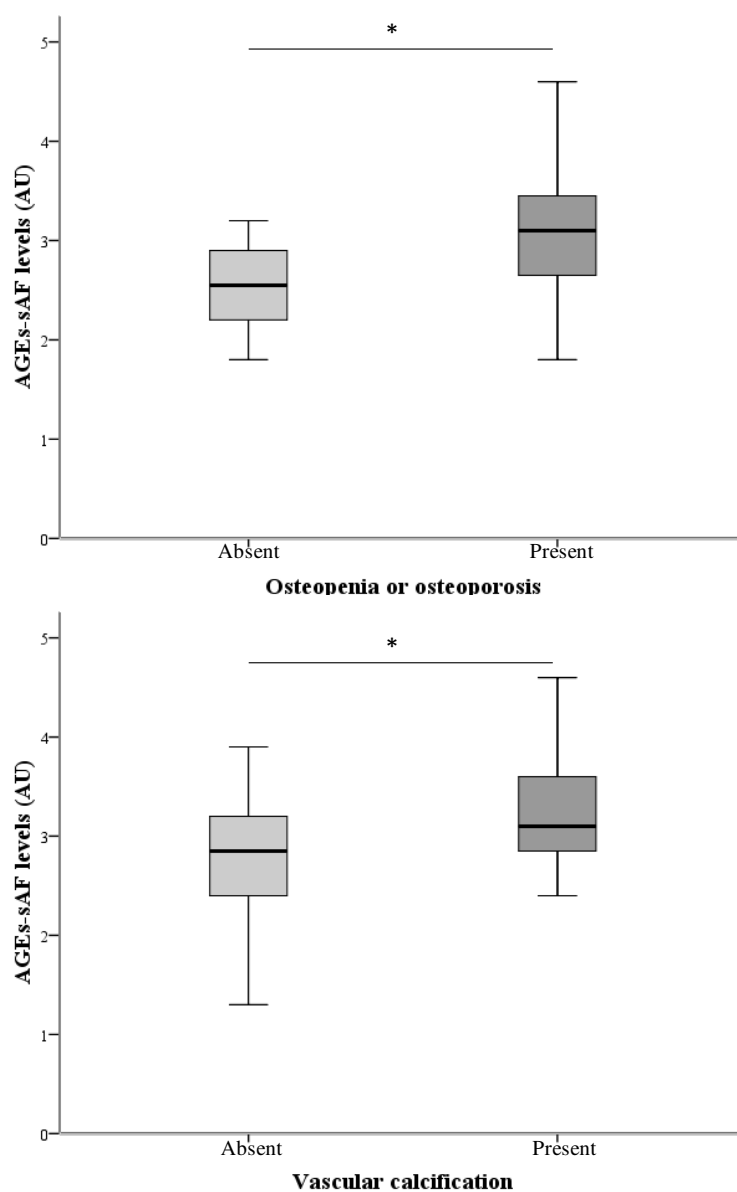
CKD, chronic kidney disease; HD, hemodialysis; PD, peritoneal dialysis; AU, arbitrary unit; CML, carboxymethyllysine; MG, methylglyoxal; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; iPTH, intact parathyroid hormone; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry.

[#], p < 0.05 for HD vs. CKD 3-4 and PD; [&], p < 0.05 for PD vs. CKD 3-4 and HD.

Relationships between AGEs-sAF, vascular calcification and bone mineral density

High AGEs-sAF levels were detected in patients with VC (3.3 ± 0.6 vs. 2.8 ± 0.6 ; $p = 0.03$) and reduced bone mass (detected by DXA) (3.1 ± 0.6 vs. 2.6 ± 0.4 ; $p = 0.03$) (Figure 2).

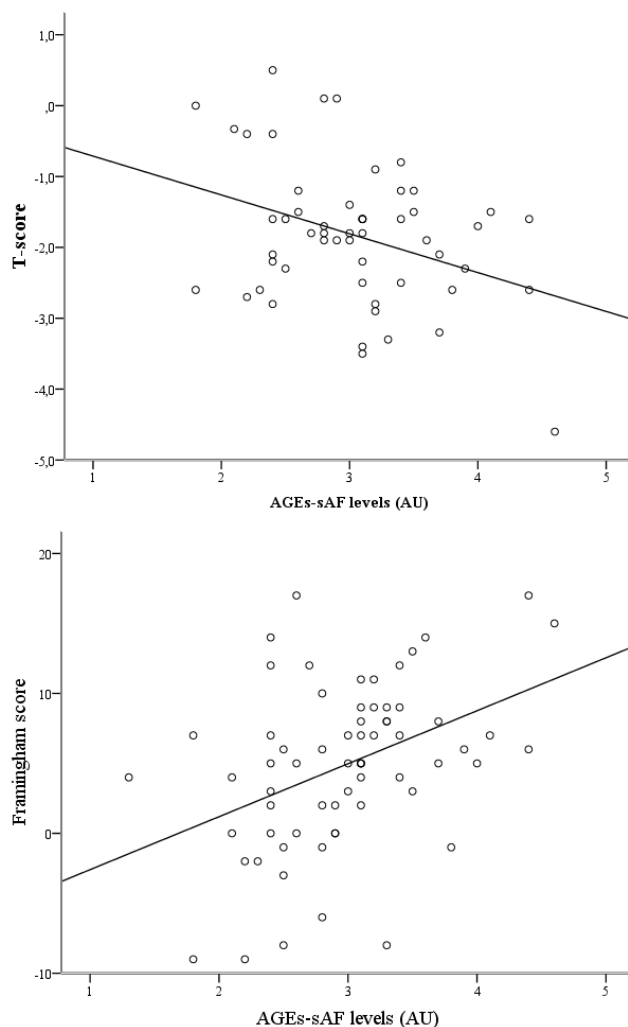
Figure 2. AGEs-sAF levels were high in CKD patients with vascular calcification or reduced bone mineral density.



*, $p = 0.03$.

AGEs-sAF levels correlated with age ($R = 0.465$; $p = 0.0001$), serum total cholesterol levels ($R = 0.284$; $p = 0.021$), T-score using DXA ($R = -0.354$; $p = 0.009$) and Framingham score ($R = 0.424$; $p = 0.001$). The results of linear regression confirmed a significant relationship between AGEs-sAF and age ($p < 0.0001$), diagnosis of osteopenia or osteoporosis (using DXA) ($p < 0.008$), T-score ($p = 0.009$) and Framingham score ($p = 0.001$) (Figure 3). AGEs-sAF levels indicated that 35 (44%) patients in the CKD group were classified as high risk for cardiovascular mortality compared to only 6 (16%) healthy subjects ($p = 0.0005$).

Figure 3. The linear relationship among AGEs-sAF levels, T-score (DXA) and cardiovascular risk (Framingham).



For AGEs vs. T-score, $N = 53$; $R = -0.354$; and $p = 0.009$; for AGEs vs. Framingham score, $N = 65$; $R = 0.424$; and $p = 0.001$.

Multivariate stepwise linear regression and logistic regression analyses were performed to identify determinants of AGEs-sAF levels and the presence of linear VC. Age and active or prior smoking were independent predictors of AGEs-sAF levels ($p = 0.002$ and 0.036 , respectively). AGEs-sAF, age and body mass index were independent predictors of VC ($p = 0.01$, 0.01 and 0.02 , respectively) (Table 3). No variable was identified as an independent predictor of osteopenia or osteoporosis.

Table 3. Multivariate stepwise linear regression for determinants of AGEs-sAF levels and logistic regression for determinants of vascular calcification.

Items	P	OR	CI (95%)
<i>Determinants of AGEs-sAF</i>			
Age (+)	0.0002	-	-
Active or prior smoking (+)	0.03	-	-
<i>Determinants of vascular calcification</i>			
AGEs-sAF (+)	0.01	3.538	1.249-10.021
Age (+)	0.01	1.062	1.010-1.115
Body mass index (+)	0.02	1.148	1.021-1.291

For AGEs-sAF, N = 30; for vascular calcification, N = 57-68. +, direction of association. CI, confidence interval.

Figure 4 depicts two different patients. One patient presented with elevated AGEs-sAF levels, severe osteoporosis and extensive areas of VC, and the other patient presented with AGEs-sAF levels near the reference range for her age, normal BMD and no areas of VC.

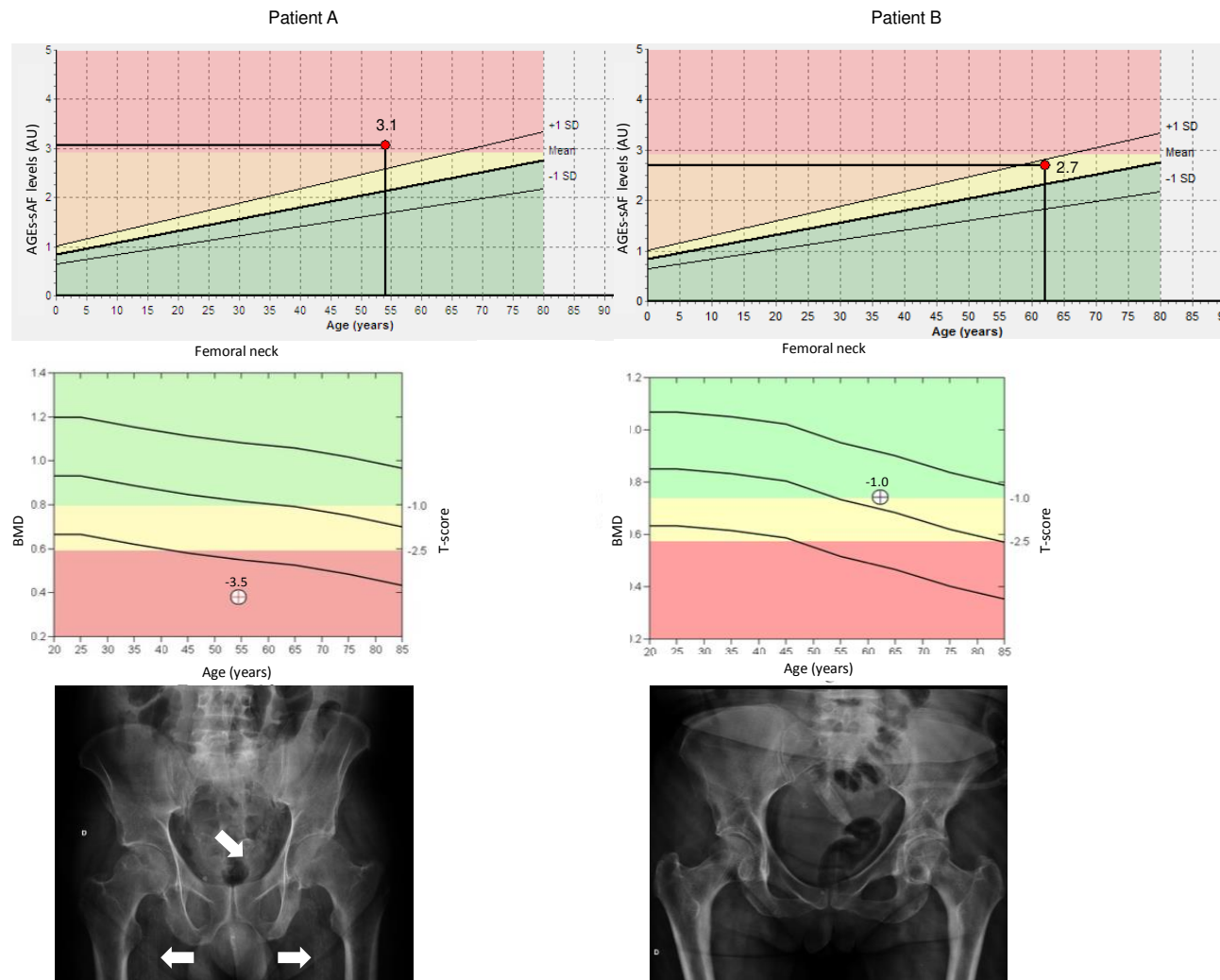


Figure 4. Examples of patients with different measurements of AGEs-sAF levels and the relationship with BMD (by DXA) and VC on X-ray plain film. In patient A, high AGEs-sAF levels, severe osteoporosis and extensive areas of VC were observed. In contrast, patient B presented with AGEs-sAF levels near the reference range, normal bone density and no areas of VC.

Patient A: male; 54 years; peritoneal dialysis vintage 12 months; presence of diabetes *mellitus*; no previous or active tabagism.

Patient B: female; 62 years; peritoneal dialysis vintage 43 months; no diabetes *mellitus*; no previous or active tabagism.

White arrows show severe vascular calcification areas; BMD, bone mineral density; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry; AU, arbitrary units; VC, vascular calcification.

Relationship of AGEs intake with ankle-brachial index and C-reactive protein

Total dietary AGEs intake positively correlated with respective fractions of dietary AGEs [CML intake ($R = 0.56$; $p = 0.0001$), MG intake ($R = 0.43$; $p = 0.0001$)] and ABI ($R = 0.28$; $p = 0.02$). Dietary CML intake correlated with serum C-reactive protein levels ($R = 0.35$; $p = 0.005$).

Relationship of serum CML levels, diabetes mellitus, and ultrafiltration in dialytic patients

Serum CML levels negatively correlated with ultrafiltration per session in CKD patients under HD or PD ($R = -0.332$; $p = 0.014$) and albumin levels ($R = -0.327$; $p = 0.004$). A linear regression analysis revealed a significant relationship between serum CML levels and DM ($p = 0.03$).

CKD subgroup analysis

AGEs-sAF levels in the CKD 3-4 subgroup were positively correlated with interventricular septum thickness ($R = 0.567$; $p = 0.018$), and these levels were an independent predictor of interventricular septum thickness ($p = 0.03$). Linear regression revealed the absence of diuresis as an independent predictor of high serum CML levels in the HD subgroup ($p = 0.003$). AGEs-sAF and serum iPTH levels were independent predictors of ejection fraction ($p = 0.027$ and 0.04 , respectively). Total AGEs intake was a determinant of high serum CML levels in the PD subgroup ($p = 0.01$). Serum CML levels were not associated with cumulative glucose load from the use of PD solutions over time. No significant differences in AGEs intake were noted between CKD subgroups (CKD 3-4, HD and PD) (Table 2).

DISCUSSION

The present study had four main findings. First, AGEs-sAF levels are elevated in patients with different stages of CKD, despite a lower AGEs intake. Second, patients exhibited similar AGEs-sAF levels irrespective of CKD stage or dialysis treatment, which suggests that the deposition of AGEs is an early event in CKD. Third, AGEs-sAF levels, but not serum CML levels or daily AGEs intake, are related to the presence of VC, cardiac risk and reduction in bone mass. Finally, AGEs-sAF levels are an independent predictor for VC in CKD patients.

Previous studies reported elevated AGEs-sAF levels in CKD patients. (30, 37, 38) However, AGEs deposition likely begins in the early stages of renal disease because different CKD stages (i.e., CKD 3-4, HD and PD) exhibited the same AGEs-sAF levels. This result suggests that other factors, such as age and smoking, may exert a greater impact than the glomerular filtration rate *per se* prior to renal disease.

AGEs-sAF levels were an independent predictor for VC. An increase of 1 unit of AU of AGEs-sAF was associated with 3.5-fold increased odds of exhibiting linear VC. Other authors detected the same relationship using computed tomography to detect Ca deposits in coronary arteries from CKD 3-5 and HD patients but not PD patients. (20, 39) We also observed a direct relationship between cardiovascular risk as assessed using the Framingham score and AGEs-sAF levels.

AGEs and their receptor (RAGE) play an important role in the pathogenesis of vascular damage, especially in patients with DM and CKD. (40) A recent *in vivo* study demonstrated the association of AGEs accumulation in vessel tissues and medial arterial calcification severity in patients with end-stage kidney disease, but the exact mechanism is not understood. (21)

The adequacy of DXA to evaluate osteoporosis in patients with CKD was questioned recently. However, Marques *et al.* confirmed a significant correlation between trabecular volume as assessed using bone biopsy and DXA parameters in CKD patients. (41) The KDIGO CKD-MBD guideline suggests the use of DXA to assess fracture risk in patients with CKD G3a–G5D. (42) Therefore, this non-invasive instrument (AGE-Reader™) may be useful for the evaluation of bone quality in this population.

The negative effects of AGEs on bone tissue were described previously, and the association of AGEs with osteoporosis in patients without CKD is known. (43) AGEs induce abnormal T-cell apoptosis *in vitro* (44), and significant trabecular bone mass loss of the vertebrae and femur occurs in T-cell deficient-mice. (45) The results of *in vitro* experiments demonstrated that osteoclast bone resorption is enhanced with the addition of AGE-modified albumin. (38) Clinical studies have demonstrated that patients with high serum AGEs levels exhibit a high risk of osteoporosis, (24, 46)

but this finding was not supported in our study.

Notably, contradictory evidence indicates that serum levels of AGEs may not reflect tissue levels of AGEs, (47) and AGEs-sAF is a better marker of tissue damage. (30) Serum CML levels or AGEs intake did not help discriminate the presence of CV or bone loss in the present study.

Our study has some limitations, such as the relatively small sizes of the groups. The generalizability of our findings to other groups is limited. We did not perform bone histomorphometric studies to evaluate the impact of AGEs on this tissue or possible mechanisms of interaction. However, the major strength of this study was the simultaneous evaluation of patients in different stages of CKD (CKD 3-4, HD and PD) using a comprehensive assessment of AGEs-sAF levels, dietary AGEs intake and serum CML levels and their relationship with bone and CVD parameters and risk.

In summary, we demonstrated elevated AGEs-sAF levels in patients with different stages of CKD despite lower AGEs intake, and these levels were related to factors directly linked to morbidity and mortality in this population (i.e., VC and BMD). Further studies, including bone histomorphometry and immunohistochemistry, are needed to establish broader evidence of the role of AGEs-sAF using a non-invasive technique to predict bone loss and VC in CKD patients.

Acknowledgments: This research was supported by grants provided by São Paulo Research Foundation (FAPESP) number 2015/16.544-5 and FAEPEX-UNICAMP, number 519.294. The authors thank J. B. Lopes de Faria (Renal Pathophysiology Laboratory, Investigation on Diabetes Complications, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil) for providing the AGE-ReaderTM.

REFERENCES

1. Matias PJ, Ferreira C, Jorge C, Borges M, Aires I, Amaral T, et al. 25-Hydroxyvitamin D3, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(2):611-8.
2. Goldsmith D, Ritz E, Covic A. Vascular calcification: a stiff challenge for the nephrologist: does preventing bone disease cause arterial disease? *Kidney Int*. 2004;66(4):1315-33.
3. Cannata-Andia JB, Rodriguez-Garcia M, Carrillo-Lopez N, Naves-Diaz M, Diaz-Lopez B. Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(12 Suppl 3):S267-73.
4. Price PA, Roublick AM, Williamson MK. Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate. *Kidney Int*. 2006;70(9):1577-83.
5. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(9):1731-40.
6. Chen Z, Qureshi AR, Ripsweden J, Wennberg L, Heimbürger O, Lindholm B, et al. Vertebral bone density associates with coronary artery calcification and is an independent predictor of poor outcome in end-stage renal disease patients. *Bone*. 2016;92:50-7.
7. Cejka D, Weber M, Diarra D, Reiter T, Kainberger F, Haas M. Inverse association between bone microarchitecture assessed by HR-pQCT and coronary artery calcification in patients with end-stage renal disease. *Bone*. 2014;64:33-8.
8. Watanabe R, Lemos MM, Carvalho AB, Rochitte CE, Santos RD, Draibe SA, et al. The association between coronary artery calcification progression and loss of bone density in non-dialyzed CKD patients. *Clin Nephrol*. 2012;78(6):425-31.
9. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int*. 2003;63(5):1934-43.
10. Neiryck N, Glorieux G, Schepers E, Pletinck A, Dhondt A, Vanholder R. Review of protein-bound toxins, possibility for blood purification therapy. *Blood Purif*. 2013;35 Suppl 1:45-50.
11. Eble AS, Thorpe SR, Baynes JW. Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross-linking of protein. *J Biol Chem*. 1983;258(15):9406-12.
12. Vlassara H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001;17(6):436-43.
13. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;84(5):489-97.
14. Massy ZA, Drueke TB. Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013;22(4):405-12.
15. Shroff R, Long DA, Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(2):179-89.
16. Lutgers HL, Graaff R, de Vries R, Smit AJ, Dullaart RP. Carotid artery intima media thickness associates with skin autofluorescence in non-diabetic subjects without clinically manifest cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(9):812-7.
17. den Dekker MA, Zwiers M, van den Heuvel ER, de Vos LC, Smit AJ, Zeebregts CJ, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive marker for AGE accumulation, is associated with the degree of atherosclerosis. *PLoS One*. 2013;8(12):e83084.
18. Brodeur MR, Bouvet C, Bouchard S, Moreau S, Leblond J, Deblois D, et al. Reduction of advanced-glycation end products levels and inhibition of RAGE signaling decreases rat vascular calcification induced by diabetes. *PLoS One*. 2014;9(1):e85922.
19. Taki K, Takayama F, Tsuruta Y, Niwa T. Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2006;70(1):218-24.

20. Wang AY, Wong CK, Yau YY, Wong S, Chan IH, Lam CW. Skin autofluorescence associates with vascular calcification in chronic kidney disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(8):1784-90.
21. Janda K, Krzanowski M, Gajda M, Dumnicka P, Jasek E, Fedak D, et al. Vascular effects of advanced glycation end-products: content of immunohistochemically detected AGEs in radial artery samples as a predictor for arterial calcification and cardiovascular risk in asymptomatic patients with chronic kidney disease. *Dis Markers.* 2015;2015:153978.
22. Fong Y, Edelstein D, Wang EA, Brownlee M. Inhibition of matrix-induced bone differentiation by advanced glycation end-products in rats. *Diabetologia.* 1993;36(9):802-7.
23. Yamamoto M, Sugimoto T. Advanced Glycation End Products, Diabetes, and Bone Strength. *Curr Osteoporos Rep.* 2016;14(6):320-6.
24. Yang DH, Chiang TI, Chang IC, Lin FH, Wei CC, Cheng YW. Increased levels of circulating advanced glycation end-products in menopausal women with osteoporosis. *Int J Med Sci.* 2014;11(5):453-60.
25. Notsu A. Advanced glycation end products inhibit the mineralization of mouse stromal ST2 cells by binding the receptor for ages and increasing TGF- β expression and secretion
- .
26. Vlassara H, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Yong A, Chen X, et al. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4483-91.
27. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc.* 2010;110(6):911-16 e12.
28. Gerdemann A, Lemke HD, Nothdurft A, Heidland A, Munch G, Bahner U, et al. Low-molecular but not high-molecular advanced glycation end products (AGEs) are removed by high-flux dialysis. *Clin Nephrol.* 2000;54(4):276-83.
29. Stein G, Franke S, Mahiout A, Schneider S, Sperschneider H, Borst S, et al. Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(5):999-1008.
30. Arsov S, Graaff R, van Oeveren W, Stegmayr B, Sikole A, Rakhorst G, et al. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(1):11-20.
31. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(12):3687-93.
32. Kannel WB, McGee D, Gordon T. A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. *Am J Cardiol.* 1976;38(1):46-51.
33. 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.
34. Honkanen E, Kauppila L, Wikstrom B, Rensma PL, Krzesinski JM, Aasarod K, et al. Abdominal aortic calcification in dialysis patients: results of the CORD study. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(12):4009-15.
35. Adragao T, Pires A, Lucas C, Birne R, Magalhaes L, Goncalves M, et al. A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(6):1480-8.
36. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C, et al. Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2012;126(24):2890-909.
37. Tanaka K, Tani Y, Asai J, Nemoto F, Kusano Y, Suzuki H, et al. Skin autofluorescence is associated with renal function and cardiovascular diseases in pre-dialysis chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(1):214-20.

38. Miyata T, Wada Y, Cai Z, Iida Y, Horie K, Yasuda Y, et al. Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int.* 1997;51(4):1170-81.
39. Hangai M, Takebe N, Honma H, Sasaki A, Chida A, Nakano R, et al. Association of Advanced Glycation End Products with coronary Artery Calcification in Japanese Subjects with Type 2 Diabetes as Assessed by Skin Autofluorescence. *J Atheroscler Thromb.* 2016;23(10):1178-87.
40. Koyama H, Nishizawa Y. AGEs/RAGE in CKD: irreversible metabolic memory road toward CVD? *Eur J Clin Invest.* 2010;40(7):623-35.
41. Marques ID, Araujo MJ, Gracioli FG, Reis LM, Pereira RM, Custodio MR, et al. Biopsy vs. peripheral computed tomography to assess bone disease in CKD patients on dialysis: differences and similarities. *Osteoporos Int.* 2017;28(5):1675-83.
42. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L, et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's changed and why it matters. *Kidney Int.* 2017;92(1):26-36.
43. Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr Drug Targets.* 2011;12(14):2096-102.
44. Hung LF, Huang KY, Yang DH, Chang DM, Lai JH, Ho LJ. Advanced glycation end products induce T cell apoptosis: Involvement of oxidative stress, caspase and the mitochondrial pathway. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(11-12):682-91.
45. Lee SK, Kadono Y, Okada F, Jacquin C, Koczon-Jaremko B, Gronowicz G, et al. T lymphocyte-deficient mice lose trabecular bone mass with ovariectomy. *J Bone Miner Res.* 2006;21(11):1704-12.
46. de Paula FJ, Horowitz MC, Rosen CJ. Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010;26(8):622-30.
47. Ueno H, Koyama H, Fukumoto S, Tanaka S, Shoji T, Shoji T, et al. Advanced glycation end products, carotid atherosclerosis, and circulating endothelial progenitor cells in patients with end-stage renal disease. *Metabolism.* 2011;60(4):453-9.