



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0924639-8 A2



(22) Data do Depósito: 02/06/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 23/02/2021

(54) Título: NOVOS BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE DOENÇAS NOS RINS.

(51) Int. Cl.: G01N 33/50.

(71) Depositante(es): BIOCRATES LIFE SCIENCES AG.

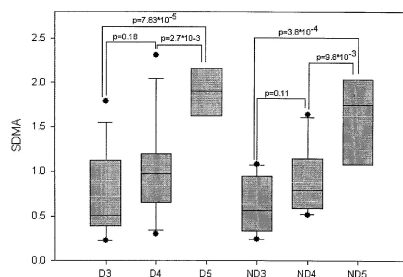
(72) Inventor(es): LUNDIN, ULRIKA; WEINBERGER, KLAUS.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009003926 de 02/06/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/139341 de 09/12/2010

(85) Data da Fase Nacional: 01/12/2011

(57) **Resumo:** NOVOS BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE DOENÇAS NOS RINS A presente invenção está correlacionada a um conjunto biomarcador metabólito para avaliação de doença nos rins, compreendendo pelo menos dois aminoácidos, pelo menos duas acilcarnitinas e, pelo menos, duas aminas biogênicas. Além disso, a presente invenção se refere a um método para avaliação de doença nos rins de um sujeito mamífero, cujo método compreende a obtenção de uma amostra biológica do sujeito, preferivelmente, sangue e/ou urina, e medição na amostra biológica da quantidade de pelo menos dois aminoácidos, pelo menos duas acilcarnitinas e, pelo menos, duas aminas biogênicas, assim como, a um kit, adaptado para a realização do método. Ao empregar os específicos biomarcadores e o método de acordo com a presente invenção, se torna possível, de um modo mais adequado e confiável, avaliar doenças nos rins.



“NOVOS BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE DOENÇAS RENAIS”

Campo Técnico

A presente invenção se refere a novos biomarcadores para avaliação de
5 doença renal, mais sensíveis às mudanças patológicas que acontecem nos rins,
particularmente, em estágio anterior da doença ou do mal ocorrido. Além disso, a
presente invenção se refere a um método para avaliação de doenças renais em um sujeito
mamífero e a um kit para realização do método.

10 Antecedentes da Invenção

A ciência metabolômica significa um estudo científico de medição
quantitativa global de compostos de baixo peso molecular, que cobre, sistematicamente,
os metabólitos fundamentais, que representam toda a faixa de percursos do metabolismo
intermediário. Em uma abordagem de sistemas de biologia, a metabolômica proporciona
15 uma leitura funcional das mudanças determinadas pelo *blueprint* genético, regulação,
abundância e modificação de proteína e influência ambiental. A capacidade de analisar
grandes sistemas de metabólitos extrai a informação biológica que reflete os reais pontos
finais funcionais de eventos biológicos abertos, enquanto outras tecnologias genômicas
funcionais, como, por exemplo, as tecnologias transcriptômicas e proteômicas, embora
20 altamente valiosas, indicam simplesmente a causa potencial para a resposta fenotípica.
Portanto, essas tecnologias não podem necessariamente prever os efeitos de drogas ou
fármacos, a resposta toxicológica ou estados doentes em nível de fenótipos, a menos
que seja adicionada uma validação funcional.

A ciência metabolômica liga esse espaço de informação mediante
25 ilustração, em particular, de tal informação funcional, uma vez que as diferenças de
metabólito em fluidos e tecidos biológicos proporcionam a mais próxima ligação às
diversas respostas fenotípicas. É desnecessário dizer que essas mudanças no fenótipo
bioquímico são de interesse direto para a indústria farmacêutica, de biotecnologia e de
saúde, uma vez que uma apropriada tecnologia permite a prospecção e integração dessa
30 informação com custo rentável.

Em geral, o fenótipo não é necessariamente previsto pelo genótipo. O
espaçamento entre genótipo e fenótipo é abrangido por diversas reações químicas, cada
qual com dependências individuais a diversas influências, incluindo os fármacos,

nutrição e fatores ambientais. Nessa cadeia de biomoléculas dos genes para os fenótipos, os metabólitos são as moléculas quantificáveis com a ligação mais próxima ao fenótipo. Diversos estados fenotípicos e genotípicos, tais como, uma resposta tóxica a um fármaco ou prevalência de doença, são previstos por diferenças nas concentrações de metabólitos funcionalmente relevantes dentro dos fluidos e tecidos biológicos.

A doença renal crônica (CKD) é uma perda progressiva da função renal nos túbulos e glomérulos, normalmente, irreversível. A CKD é um problema de saúde pública em todo o mundo, cujas complicações, levam, por exemplo, à ocorrência de deficiência renal, doença cardiovascular e morte prematura. A CKD pode surgir por diferentes razões, mas, uma principal razão é como uma complicação da diabetes melitus tipo 2, chamada de nefropatia diabética (DN). Na Europa existem cerca de 22,3 milhões de pessoas sofrendo de diabetes, e 94,9% destas sofrem da diabetes tipo 2, a causa principal de doença renal em estágio final (ESRD) na maioria dos países industrializados na Europa (Ha H. et al., 2008). Um terço dos pacientes com ESRD são diabéticos (Wolf G. e Ritz E. 2003) e dados recentes mostram um aumento epidemiológico de ESRD nos pacientes com diabetes tipo 2, mais provavelmente, devido a melhores tratamentos de doença de hipertensão e doença coronárias do coração, resultando numa mais longa sobrevivência de pacientes, suficiente para o desenvolvimento de nefropatia e ESRD (Sampanis Ch., 2008). Nos Estados Unidos, o custo anual do tratamento de ESRD é esperado como mais que o dobro, de 1995 a 2010, de 11,8 a 28,3 bilhões de dólares. Os fatores econômicos não foram ainda intensivamente estudados na Europa (Massi-Benedetti M. e CODE-2 Advisory Board, 2002), mas, no custo da diabetes tipo 2 (CODE-2), o estudo do impacto de complicações diabéticas com relação ao custo do tratamento de diabetes foi avaliado. O estudo mostrou que um paciente sem complicações teve custos médicos anuais de aproximadamente EUR 1505, e comparado a um paciente com complicações microvasculares que teve despesas médicas anuais de EUR 2563, representa um aumento de 70% (Williams R. et al., 2002). O jornal médico independente líder mundial concluiu recentemente um estudo de longo prazo, incluindo quase meio milhão de adultos, que demonstrou que quase todas as pessoas foram inconscientes de suas doenças até os últimos estágios da CKD. Uma vez que a CKD é imaginada de ser tratada e prevenida nos primeiros estágios (Wen C.P. et al., 2008), uma detecção logo no início, poderia amenizar os pacientes de diabetes tipo 2 das

complicações e reduzir os custos de saúde pública para ambos os sistemas de saúde pública e dos pacientes particulares.

Os rins apresentam diversas funções para manter um adequado funcionamento do corpo, por exemplo, filtrando os produtos residuais e toxinas, mantendo a homeostase e produzindo hormônios. Para manter essa adequada função renal, a velocidade com a qual o sangue está sendo filtrado pela membrana glomerular nos rins deve ser regulada. Uma alta velocidade de filtração glomerular (GFR) é necessária para manter níveis extracelulares estáveis e ótimos de água e solutos (Boron W.F., e Boulpaep E.L., 2003). A GFR é calculada a partir da liberação da creatinina do soro, da idade, etnia e sexo, sendo usada para dividir a CKD em cinco estágios, onde pelo menos um deles é a doença renal de estágio final (ESRD), pelo que os procedimentos de diálise e transplante são requeridos para a sobrevivência. É bem conhecido que quanto mais cedo a disfunção renal é diagnosticada e tratada, maior será a probabilidade de preservação dos néfrons restantes e, assim, se retarda a progressão da doença.

Os marcadores convencionais para avaliação e diagnóstico de doença renal incluem a GFR, creatinina e albumina. A velocidade de filtração glomerular (GFR), após aumento em estágio bastante inicial, é reduzida antes de quaisquer sintomas mostrados. As desvantagens com a medição da GFR incluem o alto custo e incompatibilidade com o monitoramento da rotina laboratorial. A creatinina do soro, conforme acima mencionado, é o marcador mais comumente usado para calcular a GFR, mas, a cistatina C foi proposta como um marcador mais sensível que pode detectar até mesmo uma branda redução da GFR (Herget-Rosenthal S. et al., 2007). Uma desvantagem é que nenhum método de referência ou material de calibração uniforme existe para a cistatina C, e adicionais limitações incluem o efeito da disfunção da tireóide, de altas doses de glicocorticóide e, potencialmente, a presença de doenças cardiovasculares em níveis de cistatina C. Devido às limitações que existem nesses marcadores únicos, não se sugere confiar inteiramente nas estimativas da GFR para fazer precisas decisões clínicas. Diferente da doença renal, a idade é o segundo maior fator que influencia a GFR. Portanto, uma leve diminuição da GFR, nem sempre se deve a danos causados aos rins, mas, sim, à idade. Também, nem sempre uma redução da GFR é devido a uma doença renal crônica. Assim, a medição da GFR é também considerada

inconveniente e, desse modo, a função renal é normalmente estimada através da concentração da creatinina do soro.

A creatinina do soro tem sido usada há bastante tempo para detectar doença prejudicial aos rins e, também, para calcular a GFR (Star R. et al., 2002). A creatinina é um produto da quebra do fosfato de creatinina do metabolismo muscular (Barr D.B. et al., 2005), e a quantidade da mesma formada a cada dia depende da massa muscular, mas, as concentrações de plasma são bastante constantes dentro do indivíduo. A concentração de creatinina do soro é afetada por alguns fatores, como, idade, sexo, raça e tamanho do corpo e, portanto, a medição da liberação da creatinina é normalmente implementada. A liberação da creatinina do corpo é através da filtração glomerular nos rins, mas, a creatinina é também ativamente secretada do corpo pelos túbulos. Essa velocidade depende de fatores genéticos e biológicos, tais como, sexo e idade, e gera uma superestimativa de 15-20% da GFR. Portanto, a creatinina é considerada um marcador insensível, especialmente, para pessoas de pouca idade e idosos. Também, outra deficiência da creatinina é que ela somente detecta danos causados aos rins nos últimos estágios.

A albumina é a mais abundante proteína do plasma (Basi S., et al., 2008) e os danos estruturais aos rins podem se refletir pela elevada excreção de albumina na urina, chamada de micro-albuminúria, 30-300 mg/24 horas. A micro-albuminúria se desenvolve após alguns anos do início da diabetes, e depois de 15-20 anos, progride para macro-albuminúria, uma concentração de albumina na urina superior a 300mg/24 horas. A presença de albuminúria é uma indicação de nefropatia diabética, sendo normalmente medida com varetas de teste. Existem algumas deficiências no uso da albumina como marcador de doenças no rim. Em primeiro lugar, até poucos anos atrás, se acreditava que a albumina urinária não-reabsorvida pelas células tubulares mais próximas era excretada pura, mas, a albumina, é realmente excretada como uma mistura de albumina pura e peptídeos derivados de albumina, que não são detectados pelos testes feitos com varetas, e ainda outras espécies de albumina pura que também não são detectadas. Isso proporciona espaço para falsos resultados de testes negativos (Comper W.D. e Osicka T.M., 2005). Em segundo lugar, a albuminúria é uma evidência de nefropatia já existente, portanto, pode se considerar que a albumina não é um biomarcador de prognóstico satisfatório. Se a nefropatia diabética foi detectada antes do surgimento da micro-albuminúria, a terapia deve ter a possibilidade de impedir ou reverter a progressão

da CKD. A medição da albuminúria não pode identificar todos os pacientes com doença renal.

Dois isômeros de metilarginina, dimetilarginina simétrico (SDMA) e dimetilarginina assimétrico (ADMA) foram intensivamente estudados no contexto de doença renal (Revisão de Fleck C. et al., 2001). Esses isômeros são formados por resíduos de arginina, sendo modificados de modo pós-translacional pela proteína arginina metiltransferases (PRMTs). Enquanto o SDMA é fisiologicamente bastante inerte, pelo menos, normalmente, não metabolizado no corpo, o ADMA é de importância biológica, pelo fato de seu potencial como inibidor endógeno de óxido nítrico sintase (SOS), o que significa que elevadas concentrações de ADMA provocam reduzida síntese de óxido nítrico (NO) e, conseqüentemente, leva a uma prejudicada função endotelial. O acúmulo de ADMA, já há algumas décadas, tem sido acreditado como fator de contribuição para hipertensão, defesa imune e características envolvidas na CKD, e estudos em animais mostraram que a inibição crônica experimentalmente induzida (NOS) provoca hipertensão sistêmica e glomerular, isquemia glomerular, glomerulosclerose, distúrbio túbulo-intersticial, e proteinúria (Zatz R. e Baylis C., 1998). O SDMA também foi observado com significativo aumento nos pacientes com CKD, mais ainda que o ADMA.

Também, as acilcarnitinas tem sido correlacionadas com a CKD (Fougue D. et al., 2006). Um aumento de acilcarnitinas livres foi observado no soro de pacientes de CKD, devido à diminuída função excretora do rim prejudicado.

Além disso, o esforço oxidante tem sido correlacionado à progressão de doenças nos rins há muitos anos (Loughrey C.M. et al., 1994, Ha H. et al., 1995). Diversos estudos indicam que o aumento do esforço oxidante devido à hiperglicemia é a origem de complicações de diabetes micro e macrovasculares (Sakane N. et al., 2008). O esforço oxidante se origina de uma abundância de glicose e ácidos graxos, e quando esses substratos são supridos ao mitocôndria para metabolizar, os elétrons da cadeia de transporte de elétrons podem escapar. Sulfóxido de metionina é um dos mais diretos indicadores de oxidação por meio de espécies de oxigênio reativo (R.O.S., Mashima R. et al., 2003), mas, não foi ainda implementado como biomarcador para doença renal. Além disso, foi estudado o papel do ciclo do ácido cítrico na mediação da deficiência renal, onde concentrações de citrato, fumarato, oxaloacetato e malato foram significativamente aumentadas nos pacientes com CKD.

Nos pacientes com CKD, as alterações metabólicas renais parecem influenciar as alterações de todo o corpo e o metabolismo aminoácido renal. Sob condições normais, somente uma limitada quantidade de aminoácidos é excretada com a urina. Uma diminuição da conversão de fenilalanina em tirosina foi observada, o que
5 leva a um acúmulo de fenilalanina nesses pacientes. Além disso, os rins prejudicados afetam a produção de arginina, o que foi demonstrado pela diminuição da síntese de arginina renal, tanto nos estudos clínicos, quanto nos estudos de animais. Também, a reduzida absorção renal de citrulina e liberação de taurina, ornitina, alanina, tirosina e lisina foi observada como presente nos pacientes com CKD avançada. Além disso, a
10 conversão de citrulina em arginina parece como sendo reduzida.

Além disso, foi sugerido que o metabolismo do triptofano tem importante papel na patogênese da CKD. A enzima limitadora de velocidade nesse percurso no rim é a indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), que converte triptofano em N-formil-cinurenina, que, por sua vez, é catabolizada para cinurenina, e posteriormente para
15 hidroxycinurenina. Um aumento de atividade da IDO foi observado nos estudos anteriores, com explicação sobre a depleção do triptofano.

Os marcadores inflamatórios, tais como, proteína reativa C, Interleucina 6, Interleucina 18, e Fator de Necrose de Tumor (TNF- α) foram observados como sendo fatores de aumento e diminuição no soro de pacientes com diabetes e DN. Isso ocorre
20 em um estágio bastante inicial da doença, e está correlacionado com o grau de albuminúria.

Os biomarcadores conhecidos para diagnóstico de CKD ou DN incluem, por exemplo, diversos marcadores de polipeptídeos (documentos de patentes US 2006/286602 A1, CA 2473814 A1, EP 1972940 A1, US 2009/081713 A1) que
25 apresentam diferente massa molecular e tempos de migração, por exemplo, o polipeptídeo do gene 1a de deficiência renal crônica (CRFG-1a) (documentos de patentes JP 11069985 A, JP 11069984 A), assim como, marcadores de polinucleotídeos (documentos de patentes JP 2003235573 A, e JP 2004187620 A).

A cistatina C acima mencionada é uma dentre as proteínas marcadoras
30 usadas para diagnóstico de doença renal (documento de patente JP 11064333 A), juntamente com a proteína de ligação holo- e apo-retinol (RBP), e proteína de Tamm-Horsfall (THP, (documento de patente DE 10327773 A1); calbindina D-28k (uma proteína de ligação de cálcio, membro da grande família EF-mão); molécula 1 de danos

causados ao rim (Kim-1, uma proteína de membrana tipo 1, contendo um domínio extracelular de imunoglobulina de seis cisteínas); proteína correlacionada à globulina Alfa-2u (Alfa-2u), também conhecida como lipocalina 2 (LCN2) ou lipocalina associada à neutrofil gelatinase (NGAL) em humanos (armazenada em grânulos de neutrófilos);

5 Osteopontina (OPN), também conhecida como fosfoproteína secretada 1 (SPP1, uma fosfoproteína secretada, altamente acídica e glicosilada, contendo um motivo de aderência celular de ácido arginina-glicina-aspartico (RGD)); Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF, conhecido para promover a angiogênese, aumentar a permeabilidade vascular, e que serve como um quimiotático para monócitos, tendo

10 papel atuante na diabetes, cicatrização de feridas, respostas inflamatórias e remodelagem de tecidos (documento de patente WO 2008/116867 A1); precursor de N-acetilmuramoil-L-alanina amidase; adiponectina; precursor de proteína AMBP (alfa-1-microglobulina); precursor da cadeia de alfa-proteína de ligação C4b; precursor de ceruloplasmina; precursor de complemento C3; precursor de complemento de

15 componente C9; precursor de complemento de fator D; glicoproteína alfa-1B; precursor I de beta-2-glicoproteína; precursor II de cofator de heparina; proteína da região da cadeia C; precursor de alfa-2-glicoproteína rico em leucina; precursor do fator derivado de pigmento do epitélio; precursor da proteína de ligação plasma retinol; e subunidade 10 do fator 3 de iniciação de translação (documento de patente EP 1905846 A2).

20 Os antígenos, as citotoxinas e inibidores de crescimento celular podem ser úteis como biomarcadores (documento de patente WO 2008/101231 A2). O fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF-23) e a adiponectina foram encontrados como sendo marcadores bastante previsíveis para a progressão de doença crônica dos rins, de modo independente e em combinação (documento de patente WO 2008/089936 A1). Outro

25 método usado para diagnóstico e monitoramento de doença renal ou uma predisposição da mesma consiste na detecção de supressor de tumor de von Hippel-Lindau (pVHL), receptor 4 de quimocina CXC (CXCR4), integrina β -1, polipeptídeo do Fator de Crescimento alfa derivado de Plaqueta (PDGF-A), fator alfa-1 induzível de Hipoxia (HIF1 α), e/ou fator de crescimento beta de Transformação (TGF β) em uma amostra do

30 sujeito (documento de patente US 2008/0038269 A1). Através da medição de lactoferrina, mieloperoxidase, e antígeno carcinoembrionário (CEA) (documento de patente JP 9072906 A) e fibronectina (documento de patente JP 9274036 A), uma doença renal pode ser também diagnosticada.

Outro método descrito mede o nível do fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF) em uma amostra, para decidir a presença e progresso da fibrose renal e associados distúrbios renais, em particular, complicações associadas com diabetes, hiperglicemia e hipertensão (documento de patente US 2004/0224360 A1).

5 No campo dos genômicos, existem também diversos biomarcadores associados a doenças renais. A presente invenção inclui a identificação de genes expressos somente nas células de interesse clínico ou científico, tais como, os podócitos ou células mais próximas do túbulo (documento de patente CN 1863928 A). Os marcadores genéticos de antígeno de leucócito humano (HLA), por exemplo, HLA-A11, HLA-DR9 e HLA-DQA1*0302, são todos genes de predisposição para diabetes e nefropatia (documento de patente CN 101294215 A). Uma desintegrina e metaloproteinase com trombospondina tipo 1, motivo 4, e agrecanase-1 (ADAMTS4), foram encontradas como sendo de utilidade como biomarcador do sangue para a CKD (documento de patente WO 2009/002451 A2), assim como, os genes Calbindina-D28k, 10 KIM-1, OPN, EGF, Clusterina, VEGF, OAT-K1, Aldolase A, Aldolase B, Podocina, Alfa-2u, C4 (documento de patente EP 1925677 A2) e ceramida glicosiltransferase (CGT) (documento de patente WO 03057874 A1).

Os marcadores de RNA são também usados como marcadores de doença renal (documento de patente EP 2058402 (A1)). Assim, por exemplo, um marcador de 20 RNA de rim, é selecionado dentre uma proteína regulada de andrógeno específica de rim (KAP), expressa nas células epiteliais dos túbulos renais convolutos mais próximos, uma molécula 1 prejudicial ao rim (KIM-1), uma proteína de membrana expressa nas células epiteliais mais próximas do túbulo, expressão de fator de crescimento epidermal de ligação à heparina (HB-EGF), induzido no rim após um dano isquêmico e seguinte 25 tratamento com um nefrotoxificante, um fator de crescimento 1 de fibroblasto (FGF-1), um fator de crescimento de queratinócito (FGF-7) e o receptor de FGF-7, FGFR2 IIIb induzido no rim após tratamento com um nefrotoxificante, as proteínas de canal de água, aquaporina 1, 2 e 3, que são altamente expressas no rim, a glicoproteína de Tamm-Horsfall, expressa nas células epiteliais do rim e que se localizam nos ramos espessos 30 ascendentes das alças de Henle e nos túbulos convolutos mais distantes do rim, e finalmente, a expressão do gene de resposta de crescimento precoce (Egr-1), o proto-oncogene (c-fos) e o gene de resposta de esforço (hsp 70), e em que o dito marcador é ativado após dano isquêmico renal.

Outros métodos descritos no estado da técnica para avaliação de doença renal compreendem a medição de atividade de uma protease na urina, através do uso de dois ou mais substratos e análise dos padrões de atividade da protease contra os substratos (documento de patente WO 2008/001840 A1) ou através da medição de ferro catalítico em humanos (documento de patente US 2007/238760 A1).

Mesmo que existam diversos biomarcadores sugeridos para avaliação de doença renal, os únicos descritos e, especificamente, os únicos de uso clínico atual, não são suficientemente sensíveis, sendo somente detectados em um estado adiantado da doença. Assim, existe ainda uma acentuada necessidade médica para marcadores mais sensíveis para mudanças patológicas no rim, particularmente, em um estágio inicial da doença ou distúrbio.

Embora os acima mencionados marcadores, tais como, albumina e creatinina, tenham sido usados para descoberta de pacientes diabéticos em risco de nefropatia, é da maior importância a descoberta de novos e mais sensíveis biomarcadores metabólicos, que tenham a capacidade de prever ou detectar a nefropatia diabética em um estágio precoce, possibilitando intervir com terapia, para impedir ou, pelo menos, retardar a progressão do dano renal que no fim provoca a doença renal em estágio final (ESRD) e de complicações correlacionadas ao controle.

Em vista dos problemas acima mencionados existentes no estado da técnica, o objeto fundamental da presente invenção é a provisão de novos biomarcadores para avaliação de doenças renais, cujos marcadores são mais sensíveis para mudanças patológicas no rim, particularmente, no estágio inicial da doença ou distúrbio. De modo ótimo, o marcador deve ser facilmente detectável em uma amostra biológica, tal como, no sangue e/ou na urina, seu nível deve ser consistentemente correlacionado ao grau do dano renal e seu nível de ser modificado. Além disso, constitui um objeto da presente invenção, proporcionar um método de avaliação de doenças renais em uma amostra biológica.

A fim de alcançar os objetivos destacados na presente invenção, os presentes inventores basearam suas investigações na ciência metabolômica, pelo fato de se ter uma ampla percepção das mudanças bioquímicas que ocorrem no rim durante o curso da doença e oferecer diversos novos e potencialmente melhores biomarcadores. De fato, o rim é um órgão, particularmente, metabolicamente ativo, onde os metabólitos estão sendo excretados ou absorvidos, dependendo da sua função no corpo. Portanto,

seria um significativo fator de melhoria a disponibilização de biomarcadores metabólicos para doença renal, que pudessem também fornecer mais informações sobre o funcionamento dos rins e das reações bioquímicas que ali ocorrem. Os presentes inventores descobriram que um esboço mais global de todos os caminhos e mecanismos envolvidos é fornecido quando se utiliza um painel de metabólitos que são alterados com a progressão da doença renal, ao invés de utilizar somente marcadores individuais, conforme descrito no estado da técnica.

Resumo da Invenção

Portanto, a presente invenção, conforme definido nas reivindicações anexas, proporciona novos biomarcadores (isto é, um novo conjunto de biomarcadores) adequados para avaliação de doenças renais, que são mais sensíveis às mudanças patológicas no rim, particularmente, no estágio inicial da doença ou distúrbio. Além disso, a presente invenção também proporciona um método para avaliação de doenças renais em um sujeito mamífero, assim como, um kit, adaptado para realização do método.

Breve Descrição dos Desenhos

No anexo do presente relatório, são apresentadas e referidas as figuras 1-14. Estas demonstram exemplos, de acordo com a invenção, do aumento ou da diminuição de um biomarcador metabólico na progressão de uma doença renal.

A figura 1 está correlacionada à dimetilarginina simétrica (SDMA) nos estágios 3-5 da CKD, em pacientes diabéticos e não-diabéticos, e mostra que os pacientes do estágio 5 apresentaram um aumento altamente significativo ($p < 0,01$) da proporção, comparado aos pacientes do estágio 3 e estágio 4, o que sugere que a SDMA é um satisfatório biomarcador da progressão da CKD.

A figura 2 se refere à proporção de SDMA nos estágios 3-5 da CKD, e mostra que os pacientes do estágio 5 apresentaram um aumento acentuadamente significativo ($p < 0,01$) da proporção, comparado com os pacientes dos estágios 3 e 4.

A figura 3 está correlacionada com um gráfico tipo caixa da proporção de SDMA/arginina nos estágios 3-5 da CKD, em pacientes diabéticos e não-diabéticos, e mostra que os pacientes do estágio 5 apresentaram um aumento altamente significativo ($p < 0,01$) da proporção, comparado aos pacientes do estágio 3 e estágio 4, o que sugere

que também uma proporção de SDMA/arginina é um satisfatório biomarcador da progressão da CKD. A proporção é indicativa de que a SDMA/Arg é um satisfatório marcador de prognóstico e reflete um aumento de atividade da proteína arginina N-metiltransferase II.

5 A figura 4 está correlacionada com um gráfico tipo caixa da proporção de SDMA/arginina nos estágios 3-5 da CKD, e mostra que os pacientes do estágio 5 apresentaram um aumento altamente significativo ($p < 0,01$) da proporção, comparado aos pacientes do estágio 3 e estágio 4. A SDMA é um satisfatório marcador de prognóstico e reflete um aumento de atividade da proteína arginina N-metiltransferase II.

10 A figura 5 está correlacionada com um gráfico tipo caixa de acilcarnitina e glutarilcarnitina nos estágios 3-5 da CKD, em pacientes diabéticos e não-diabéticos, e mostra que a glutarilcarnitina apresenta elevados níveis nos estágios finais da CKD.

A figura 6 mostra um gráfico tipo caixa de glutarilcarnitina nos estágios 3-5 da CKD.

15 A figura 7 está correlacionada com gráficos tipo caixa, da proporção citrulina/arginina nos estágios 3-5 da CKD, em pacientes diabéticos e não-diabéticos, e mostra que os pacientes do estágio 5 apresentaram um aumento altamente significativo ($p < 0,01$) da proporção, comparado aos pacientes do estágio 3, e a proporção é indicativa de uma atividade de enzima alterada no ciclo da uréia.

20 A figura 8 está correlacionada com gráficos tipo caixa, da proporção citrulina/arginina nos estágios 3-5 da CKD.

A figura 9 está correlacionada com gráficos tipo caixa, da proporção ornitina/arginina nos estágios 3-5 da CKD, em pacientes diabéticos e não-diabéticos, e mostra que os pacientes do estágio 5 apresentaram um aumento altamente significativo
25 ($p < 0,01$) da proporção, comparado aos pacientes do estágio 3, somente no caso dos pacientes não-diabéticos, o que indica que esse biomarcador pode ser importante para um diagnóstico diferencial entre diferentes tipos de doenças renais.

A figura 10 está correlacionada com gráficos tipo caixa, da proporção sulfóxido de metionina/metionina nos estágios 3-5 da CKD, em pacientes diabéticos e
30 não-diabéticos, e mostra que esse marcador de esforço oxidante é acentuadamente e significativamente aumentado ($p < 0,01$) nos pacientes do estágio 5, comparado com os pacientes do estágio 3.

A figura 11 está correlacionada com gráficos tipo caixa, da proporção sulfóxido de metionina (MetSO)/metionina (Met) nos estágios 3-5 da CKD, e mostra que os pacientes do estágio 5 apresentaram um aumento altamente significativo ($p < 0,01$) da proporção, comparado com os pacientes do estágio 3, o que sugere que uma proporção MetSO/Met é um satisfatório biomarcador da progressão da CKD.

A figura 12 está correlacionada com gráficos tipo caixa, de fumarato, nos estágios 3-5 da CKD, e mostra que uma vez o fumarato não está presente nos estágios iniciais, o fumarato funciona como um marcador qualitativo.

A figura 13 está correlacionada com gráficos tipo caixa, de alfa-ceto-glutarato, nos estágios 3-5 da CKD, em pacientes diabéticos e não-diabéticos, e mostra que os pacientes diabéticos do estágio 5 apresentaram um aumento altamente significativo ($p < 0,01$) da proporção, comparado aos pacientes diabéticos do estágio 3.

A figura 14 está correlacionada com gráficos tipo caixa, de alfa-ceto-glutarato, nos estágios 3-5 da CKD.

Descrição de Modalidades Preferidas

Ao utilizar os específicos (conjunto) biomarcadores e o método de acordo com a presente invenção, se torna possível, de um modo mais adequado e confiável, a avaliação de uma doença renal. O termo “avaliação”, no contexto da presente invenção, significa o diagnóstico do início e monitoramento da progressão da doença, em particular, a detecção e acompanhamento da doença nos diferentes estágios. A presente invenção torna possível a previsão e o diagnóstico de uma doença renal de uma maneira aperfeiçoada e em um estágio inicial da doença, além de permitir uma detecção mais sensível das mudanças patológicas que ocorrem no rim. De fato, os biomarcadores de acordo com a invenção são facilmente detectáveis nas amostras biológicas, especificamente, no sangue e/ou na urina, seu nível sendo consistentemente correlacionado ao grau da doença/dano renal causado e suas mudanças de nível.

Além disso, a avaliação deve também incluir o fato de que esses marcadores são adequados para avaliar a nefrotoxicidade, tanto nos modelos animais, como em experimentos clínicos da fase I. Em outras palavras, eles são também adequados para avaliar a nefrotoxicidade pré-clínica e clínica, isto é, também em um estágio bastante prematuro do desenvolvimento dos produtos farmacêuticos, notadamente, em modelos de animais ou nos experimentos clínicos da fase I.

Em geral, um biomarcador é uma valiosa ferramenta devido à possibilidade de se distinguir dois ou mais estados biológicos entre si, funcionando como um indicador de um processo biológico normal, um processo patogênico ou como uma reação a uma intervenção farmacêutica. Um metabólito é um composto de baixo peso molecular ($<1\text{kDa}$), menor que o da maioria das proteínas, DNA e outras macromoléculas. Pequenas mudanças na atividade das proteínas resultam em grandes mudanças nas reações bioquímicas e seus metabólitos (igual ao biomarcador metabólico, considerando o metabolismo do corpo), cujas concentrações, fluxos e mecanismos de transporte são sensíveis às doenças e intervenções de fármacos. Isso possibilita obter um perfil individual das substâncias fisiológicas e patofisiológicas, refletindo os fatores genéticos e ambientais, como, nutrição, atividade física, flora microbiana e medicamentos. Assim, um biomarcador metabólico proporciona informação mais completa do que, por exemplo, uma proteína ou hormônio que sejam biomarcadores, mas não biomarcadores metabólicos.

Em vista do exposto, o termo biomarcador metabólico, conforme aqui usado, é definido como sendo um composto adequado como indicador do estado de uma doença renal, especificamente, da doença renal crônica (CKD), sendo um metabólito ou um composto metabólico que ocorre durante processos metabólicos no corpo de um mamífero. O termo biomarcador metabólico é também idealizado de compreender uma proporção de substrato/produto correlacionada a uma reação enzimática.

O biomarcador metabólico (conjunto) medido de acordo com a presente invenção compreende, obrigatoriamente, as seguintes classes de metabólitos (isto é, analitos – amostra que está sendo analisada): pelo menos, dois aminoácidos, pelo menos, duas acilcarnitinas e, pelo menos, duas aminas biogênicas. As definições dessas classes são conhecidas dos especialistas versados na técnica, entretanto, elementos preferidos dessas classes são resumidos nas Tabelas 1-3 apresentadas a seguir. Além disso, as aminas biogênicas são entendidas como um grupo de compostos biologicamente ativos de ocorrência natural, derivados por descarboxilação enzimática de aminoácidos naturais. Uma substância biogênica é uma substância provida por processos da vida e as aminas biogênicas contem um grupo amino. A maioria dessas aminas atua como neurotransmissores, mas, também, existem algumas ativas na regulação, por exemplo, da pressão sanguínea e temperatura do corpo.

Foi agora surpreendentemente descoberto que a medição de um conjunto de biomarcadores compreendendo três classes de metabólitos permite a previsão e diagnóstico de doença renal, de uma maneira aperfeiçoada, e em qualquer estágio prematuro da doença. Especificamente, permite uma detecção mais sensível das mudanças patológicas que ocorrem no rim. Se uma classe de metabólitos desse grupo for omitida ou se o número dos metabólitos for reduzido, a avaliação da doença renal se torna menos sensível e menos confiável. Isso, particularmente, se aplica aos estágios iniciais da doença, em que, de nenhum modo, se deve confiavelmente realizar a detecção usando métodos e biomarcadores conhecidos. De fato, a medição, ao mesmo tempo, de pelo menos dois aminoácidos, pelo menos duas acilcarnitinas e pelo menos duas aminas biogênicas, permite um diagnóstico mais confiável da doença renal, especificamente da CKD e DN, já nos estágios 1-3, como, também, nos estágios 4 e 5. Esse fato nunca foi descrito nem se tornado óbvio, de acordo com as citações do estado da técnica.

Preferivelmente, o conjunto de biomarcadores compreende ainda uma proporção de produto/substrato correlacionada a uma reação enzimática, mais preferivelmente, a proporção SDMA/arginina, a proporção citrulina/arginina, a proporção ornitina/arginina, e/ou a proporção de sulfóxido de metionina/metionina (conforme figuras anexas). A proporção SDMA/arginina está correlacionada à proteína de enzima arginina N-metiltransferase (PRMT), a proporção de citrulina/arginina está correlacionada a óxido nítrico sintase (NOS), a proporção ornitina/arginina está correlacionada à arginase e a proporção de sulfóxido de metionina/metionina está correlacionada à oxidação por espécies de oxigênio reativo (ROS). Além disso, ao medir essas proporções, o desempenho diagnóstico do conjunto biomarcador e do método de acordo com a invenção pode ser ainda mais aperfeiçoado.

Mais preferivelmente, o conjunto biomarcador de acordo com a invenção compreende ainda um ou mais metabólitos selecionados do grupo de poliaminas, fosfatidilcolinas, monossacarídeos e oligossacarídeos redutores (açúcares), esfingomielinas, eicosanóides, ácidos biliares e intermediários de metabolismo energético. Exemplos preferidos dessas classes são fornecidos nas Tabelas 4-9 apresentadas a seguir. Novamente, mediante a medição adicional dos metabólitos dessas classes, o desempenho diagnóstico do conjunto biomarcador e do método de acordo com a invenção pode ser ainda mais aperfeiçoado.

Um conjunto de biomarcador preferível é aquele em que os aminoácidos são selecionados de Cit, Phe, Asn, Trp, His, Orn, Tyr, Met, Ala, Arg, Thr, Lys, Gln, Ser, Val, Glu, e Pro, as acilcarnitinas são selecionadas de C0, C5-DC(C6-OH), C5:1-DC, C8, C9, C10, C10:1, C14:1, e C18:1, as aminas biogênicas são selecionadas de MetSO, creatinina, SDMA, ADMA, DMA total, e serotonina, e as proporções são selecionadas de proporção de SDMA/arginina, proporção de citrulina/arginina, proporção de ornitina/arginina, e/ou proporção de sulfóxido de metionina/metionina.

Conforme mencionado acima, a doença a ser avaliada é uma doença renal. Preferivelmente, é a doença renal crônica (CKD), mais preferivelmente, é a nefropatia diabética (DN).

A amostra biológica é obtida de um mamífero, preferivelmente, de um camundongo, rato, porquinho da Índia, cachorro, mini-porco ou um humano. A amostra biológica, preferivelmente, é uma amostra de sangue ou urina, entretanto, qualquer outra amostra biológica conhecida por um especialista versado na técnica que permita as medições de acordo com a presente invenção são também adequadas. Assim, o método de acordo com a invenção é um método *in vitro*. Para a medição das concentrações dos metabólitos na amostra biológica, é utilizado um método analítico quantitativo, tal como, cromatografia, espectroscopia, espectroscopia de massa, sendo este último particularmente preferido. O método de cromatografia pode compreender os tipos de GC, LC, HPLC, e UPLC; o método de espectroscopia pode compreender os tipos de UV/Vis, IR, e NMR; e os métodos de espectroscopia de massa pode compreender os tipos de ESI-QqQ, ESI-QqTOF, MALDI-QqQ, MALDI-QqTOF, e MALDI-TOF-TOF. É preferido o uso de espectroscopia de massa tipo FIA- e HPLC- em tandem. Esses métodos analíticos, geralmente, são conhecidos por um especialista versado na técnica.

Para medição das almejadas quantidades de metabólitos, é usada a ciência metabolômica para quantificar os metabólitos na amostra biológica, incluindo as classes de analitos de aminoácidos, aminas biogênicas, poliaminas, acilcarnitinas, fosfatidilcolinas, mono- e oligossacarídeos redutores, esfingomielinas, eicosanóides, ácidos biliares e intermediários de metabolismo energético. Por intermediários de metabolismo energético deverá ser entendido os açúcares fosforilados, os ácidos orgânicos di- e trivalentes, e os nucleotídeos. Entretanto, de acordo com a invenção, é necessário que entre os metabólitos medidos, pelo menos, as classes de analitos de

- aminoácidos, acilcarnitinas e aminas biogênicas sejam contidas. A quantificação é feita usando a presença de padrões internos isotopicamente rotulados, e determinada pelos métodos conforme descrito acima. Uma listagem de analitos, incluindo suas abreviações (códigos BC), que são adequados como metabólitos a serem medidos conforme a
- 5 invenção é apresentada nas Tabelas seguintes.

Tabela 1: Aminoácidos (μM)

Código BC	Analito
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Cit	Citrulina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Orn	Ornitina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

Tabela 2: Acilcarnitina (µM)

Código BC	Analito
C0	Carnitina (livre)
C2	Acetilcarnitina
C3	Propionilcarnitina
C3:1	Propenoilcarnitina
C3-DC	Malonilcarnitina
C3-DC-M	Metilmalonilcarnitina
C3-OH	Hidroxipropionilcarnitina
C4	Butirilcarnitina/Isobutirilcarnitina
C4:1	Butenoilcarnitina
C4:1-DC (C10)	Fumarilcarnitina (Decanoilcarnitina)
C4-OH	3-Hidroxibutyrylcarnitina
C5	Isovalerilcarnitina/2-Metilbutirilcarnitina /Valerilcarnitina
C5:1	Tigililcarnitina/3-Metil-crotonilcarnitina
C5:1-DC (C11)	Glutaconilcarnitina/Mesaconilcarnitina (Undecanoilcarnitina)
C5-DC (C6-OH)	Glutarilcarnitina
C5-M-DC	Metilglutarilcarnitina
C5-OH	3-Hidroxiisovalerilcarnitina/3-Hidróxi-2-metilbutiril
C6	Hexanoilcarnitina [Caproilcarnitina]
C6:1	Hexenoilcarnitina
C6-OH	Hidroxihexanoilcarnitina [Hidroxicaproilcarnitina]
C7	Heptanoilcarnitina [Enantilcarnitina]
C7-DC	Pimelilcarnitina
C8	Octanoilcarnitina [Caprililcarnitina]
C8:1	Octenoilcarnitina
C8-DC	Octanodioilcarnitina [Suberilcarnitina]
C9	Nonanoilcarnitina [Pelargonilcarnitina]
C10 (C4:1-DC)	Decanoilcarnitina [Caprililcarnitina] (Fumarilcarnitina)
C10:1	Decenoilcarnitina
C10:2	Decadienoilcarnitina
C10-DC	Decanodioilcarnitina [Sebacilcarnitina]

C11 (C5:1-DC)	Undecanoilcarnitina (Glutaconilcarnitina/ Mesaconilcarnitina)
C12	Dodecanoilcarnitina [Laurilcarnitina]
C12:1	Dodecenoilcarnitina
C12-DC	Dodecanodioilcarnitina
C14	Tetradecanoilcarnitina [Miristilcarnitina]
C14:1	Tetradecenoilcarnitina [Miristoleilcarnitina]
C14:1-OH	3-Hidroxitetradecenoilcarnitina [3-Hidroximiristoleilcarnitina]
C14:2	Tetradecadienoilcarnitina
C14:2-OH	3-Hidroxitetradecadienoilcarnitina
C14-OH	3-Hidroxitetradecanoilcarnitina [Hidroximiristilcarnitina]
C16	Hexadecanoilcarnitina [Palmitoilcarnitina]
C16:1	Hexadecenoilcarnitina [Palmitoleilcarnitina]
C16:1-OH	3-Hidroxihexadecenoilcarnitina [3-Hidroxiipalmitoleilcarnitina]
C16:2	Hexadecadienoilcarnitina
C16:2-OH	3-Hidroxihexadecadienoilcarnitina
C16-OH	3-Hidroxihexadecanoilcarnitina [3-Hidroxiipalmitoilcarnitina]
C18	Octadecanoilcarnitina [Estearilcarnitina]
C18:1	Octadecenoilcarnitina [Oleilcarnitina]
C18:1-OH	3-Hidroxiocetadecenoilcarnitina [3-Hidroxiioleilcarnitina]
C18:2	Octadecadienoilcarnitina [Linoleilcarnitina]
C18:2-OH	3-Hidroxiocetadecadienoilcarnitina [3-Hidroxiilinoleilcarnitina]

Tabela 3: Aminas Biogênicas (µM)

Código BC	Analito
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
SDMA	Dimetilarginina simétrica
DMA total	Dimetilarginina total
Histamine	Histamina
MetSO	Sulfóxido de metionina
Kynurenine	Cinurenina
Hidroxicynurenine	Hidroxicinurenina
Putrescine	Putrescina
Spermidine	Espermidina
Spermine	Espermina
Serotonin	Serotonina
Creatinine	Creatinina

Tabela 4: Fosfatidilcolinas (µM)

Código BC	Analito
lysoPC a C14:0	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C14:0
lysoPC a C16:0	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C16:0
lysoPC a C16:1	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C16:1
lysoPC a C17:0	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C17:0
lysoPC a C18:0	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C18:0
lysoPC a C18:1	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C18:1
lysoPC a C18:2	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C18:2
lysoPC a C20:3	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C20:3
lysoPC a C20:4	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C20:4
lysoPC a C24:0	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C24:0
lysoPC a C26:0	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C26:0
lysoPC a C26:1	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C26:1
lysoPC a C28:0	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C28:0
lysoPC a C28:1	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C28:1
lysoPC a C6:0	Lisofosfatidilcolina com resíduo acila C6:0

PC aa C24:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C24:0
PC aa C26:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C26:0
PC aa C28:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C28:1
PC aa C30:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C30:0
PC aa C30:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C30:2
PC aa C32:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C32:0
PC aa C32:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C32:1
PC aa C32:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C32:2
PC aa C32:3	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C32:3
PC aa C34:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C34:1
PC aa C34:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C34:2
PC aa C34:3	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C34:3
PC aa C34:4	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C34:4
PC aa C36:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C36:0
PC aa C36:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C36:1
PC aa C36:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C36:2
PC aa C36:3	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C36:3
PC aa C36:4	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C36:4
PC aa C36:5	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C36:5
PC aa C36:6	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C36:6
PC aa C38:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C38:0
PC aa C38:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C38:1
PC aa C38:3	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C38:3
PC aa C38:4	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C38:4
PC aa C38:5	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C38:5
PC aa C38:6	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C38:6
PC aa C40:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C40:1
PC aa C40:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C40:2
PC aa C40:3	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C40:3
PC aa C40:4	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C40:4
PC aa C40:5	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C40:5
PC aa C40:6	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C40:6

PC aa C42:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C42:0
PC aa C42:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C42:1
PC aa C42:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C42:2
PC aa C42:4	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C42:4
PC aa C42:5	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C42:5
PC aa C42:6	Fosfatidilcolina com soma de resíduo diacila C42:6
PC ae C30:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C30:0
PC ae C30:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C30:1
PC ae C30:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C30:2
PC ae C32:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C32:1
PC ae C32:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C32:2
PC ae C34:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C34:0
PC ae C34:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C34:1
PC ae C34:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C34:2
PC ae C34:3	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C34:3
PC ae C36:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C36:0
PC ae C36:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C36:1
PC ae C36:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C36:2
PC ae C36:3	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C36:3
PC ae C36:4	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C36:4
PC ae C36:5	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C36:5
PC ae C38:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C38:0
PC ae C38:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C38:1
PC ae C38:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C38:2
PC ae C38:3	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C38:3
PC ae C38:4	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C38:4
PC ae C38:5	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C38:5
PC ae C38:6	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C38:6
PC ae C40:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C40:0
PC ae C40:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C40:1
PC ae C40:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C40:2
PC ae C40:3	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C40:3

PC ae C40:4	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C40:4
PC ae C40:5	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C40:5
PC ae C40:6	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C40:6
PC ae C42:0	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C42:0
PC ae C42:1	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C42:1
PC ae C42:2	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C42:2
PC ae C42:3	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C42:3
PC ae C42:4	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C42:4
PC ae C42:5	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C42:5
PC ae C44:3	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C44:3
PC ae C44:4	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C44:4
PC ae C44:5	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C44:5
PC ae C44:6	Fosfatidilcolina com soma de resíduo acil-alquila C44:6

Tabela 5: Esfingomielinas (μM)

Código BC	Analito
SM (OH) C14:1	Hidroxiesfingomielina com soma de resíduo acila C14:1
SM (OH) C16:1	Hidroxiesfingomielina com soma de resíduo acila C16:1
SM (OH) C22:1	Hidroxiesfingomielina com soma de resíduo acila C22:1
SM (OH) C22:2	Hidroxiesfingomielina com soma de resíduo acila C22:2
SM (OH) C24:1	Hidroxiesfingomielina com soma de resíduo acila C24:1
SM C14:0	Esfingomielina com soma de resíduo acila C14:0
SM C16:0	Esfingomielina com soma de resíduo acila C16:0
SM C16:1	Esfingomielina com soma de resíduo acila C16:1
SM C18:0	Esfingomielina com soma de resíduo acila C18:0
SM C18:1	Esfingomielina com soma de resíduo acila C18:1
SM C20:2	Esfingomielina com soma de resíduo acila C20:2
SM C22:3	Esfingomielina com soma de resíduo acila C22:3
SM C24:0	Esfingomielina com soma de resíduo acila C24:0
SM C24:1	Esfingomielina com soma de resíduo acila C24:1
SM C26:0	Esfingomielina com soma de resíduo acila C26:0
SM C26:1	Esfingomielina com soma de resíduo acilaila C26:1

Tabela 6: Prostaglandinas (nM)

Código BC	Analito
9S-HODE	Ácido ($\pm$)9-hidróxi-10E,12Z-octadecadienóico
13S-HODE	Ácido 13(S)-hidróxi-9Z,11E-octadecadienóico
14(15)-EpETE	Ácido ($\pm$)14(15)-epóxi-5Z,8Z,11Z,17Z-eicosatetraenóico
12S-HETE	Ácido 12(S)-hidróxi-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenóico
15S-HETE	Ácido 15(S)-hidróxi-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenóico
15S-HpETE	Ácido 15(S)-hidroperóxi-5Z,8Z,11Z,13E- eicosatetraenóico
LTB4	Leucotrieno B4
5S-HpETE	Ácido 5(S)-hidroperóxi-6E,8Z,11Z,14Z- eicosatetraenóico
TXB2	Tromboxano B2
LTD4	Leucotrieno D4
DHA	Ácido Docosaexaenóico
PGE2	Prostaglandina E2
8-iso PGF2a	8-iso-Prostaglandina F2-alfa
PGF2a	Prostaglandina F2-alfa
6-keto-PGF1a	6-ceto-Prostaglandina F1-alfa
PGD2	Prostaglandina D2
AA	Ácido araquidônico

Tabela 7: Açúcares (μ M)

Código BC	Analitos
(HNAcS-UA)2-HNAc	Di(sulfato de N-acetilexosamino-ácido urônico)-(N-acetilexosamina)
(HNAc-UA)2	Di-(N-acetilexosamino-ácido urônico)
(HNAc-UA)2-S	Di(N-acetilexosamino-ácido urônico)-sulfato
(UA-HNAcS)2-UA	Di-(ácido urônico-N-acetilexosamina-sulfato)-ácido urônico
dH	Desoxiexose
Glucosone	Glicosona (= 2-ceto-glicose)
H1 (Glucose etc.)	Hexose [glicose etc.]
H2	Di-hexose [maltose, lactose, etc.]

H2-dH	Di-hexose-desoxiexose
H2-dH2	Di-hexose-didesoxiexose
H2-HNAc2	Di-hexose-di(N-acetilexosamina)
H2-HNAc3	Di-hexose-tri(N-acetilexosamina)
H2-NANA	Di-hexose-(ácido N-acetilneuramínico) (= sialil-lactose)
H3	Tri-hexose [maltotriose etc.]
H3-HNAc2 and UA-HN- UA-HNAc-UA	Tri-hexose-di(N-acetilexosamina) e ácido urônico- hexosamina-ácido urônico-(N-acetilexose)-ácido urônico
H3-HNAc2-NANA*	Tri-hexose-di(N-acetilexosamina)-(ácido N- acetilneuramínico)
H3-HNAc3	Tri-hexose-tri(N-acetilexosamina)
H3-HNAc4	Tri-hexose-tetra(N-acetilexosamina)
H3-HNAc5	Tri-hexose-penta(N-acetilexosamina)
H4	Tetra-hexose [maltotetraose etc.]
H4-HNAc2	Tetra-hexose-di(N-acetilexosamina)
H4-HNAc2-NANA	Tetra-hexose-di(N-acetilexosamina)-(ácido N- acetilneuramínico)
H4-HNAc3	Tetra-hexose-tri(N-acetilexosamina)
H5	Penta-hexose [maltopentaose etc.]
H5-HNAc3	Penta-hexose-tri(N-acetilexosamina)
H6	Hexahexose [maltoexaose etc.]
H7	Heptaexose [maltoeptaose etc.]
H-dH	Hexose-desoxiexose
H-HNAc-NANA	Hexose-(N-acetilexosamina)-(ácido N- acetilneuramínico)
HNAc	N-acetilexosamina
HNAc(S)-UA	(N-acetilexosamina)-sulfato-ácido urônico
HNAc(S2)	(N-acetilexosamina)-dissulfato
HNAc2-H-dH	Di(N-acetilexosamina)-hexose-desoxiexose
HNAc-dH	(N-acetilexosamina)-desoxiexose

HNAc-H	(N-acetilhexosamina)-hexose
HNAc-H2	(N-acetilexosamina)-di-hexose
HNAc-H2-dH*	(N-acetilexosamina)-di-hexose-desoxiexose
HNAc-H2-dH2	(N-acetilexosamina)-di-hexose-dideoxiexose
HNAc-H3	(N-acetilexosamina)-tri-hexose
HNAc-H3-dH	(N-acetilexosamina)-tri-hexose-desoxiexose
HNAc-H3-dH2	(N-acetilexosamina)-tri-hexose-dideoxiexose
HNAc-H4	(N-acetilexosamina)-tetra-hexose
HNAc-H4-dH	(N-acetilexosamina)-tetra-hexose-desoxiexose
HNAc-H4-dH2	(N-acetilexosamina)-tetra-hexose-dideoxiexose
HNAc-H5	(N-acetilexosamina)-penta-hexose
HNAc-H5-dH	(N-acetilexosamina)-penta-hexose-desoxiexose
HNAc-H6	(N-acetilexosamina)-hexa-hexose
HNAc-H-dH	(N-acetilexosamina)-hexose-desoxiexose
HNAcS	N-acetilexosamina-sulfato
HNAc-UA	(N-acetilexosamina)-ácido urônico
HNAc-UA-HNS-UA	N-acetilexosamina-ácido urônico-(hexosamina-sulfato)-ácido urônico
HNAc-UA-HNS-UA(S)	N-acetilexosamina-ácido urônico-(hexosamina-sulfato)-ácido urônico-sulfato
HNS-UA	N-uronosilexosamina-sulfato
HN-UA	N-uronosilexosamina
H-P	Hexose-pentose
Neu5Gc-HNac-H3	(Ácido N-glicolilneuramínico)-(N-acetilexosamina)-tri-hexose
Pentose (Ribose etc.)	Pentose [ribose etc.]
Phospho-H	Fosfohexose, hexose-6-fosfato
UA	Ácido urônico
UA-HN	Ácido urônico-hexosamine
UA-HNac	Ácido urônico-(N-acetilexosamina)
UA-HNac-S	Ácido urônico-(N-acetilexosamina)-sulfato
UA-HNac-UA	Ácido urônico-(N-acetilexosamina)-ácido urônico

UA-HNAc-UA(S)	Ácido urônico-(N-acetilexosamina)-(ácido urônico-sulfato)
UA-HNAc-UA(S2)	Ácido urônico-(N-acetilexosamina)- (ácido urônico-dissulfato)
UA-HNAc-UA-HNAc(S2)	Ácido urônico-(N-acetilexosamina)-ácido urônico-(N-acetilexosamina-dissulfato)
UA-HNS	Ácido urônico-(hexosamine-sulfato)
UA-HNS-UA	Ácido urônico-(hexosamina-sulfato)- ácido urônico
UA-HNS-UA-HNAc-UA	Ácido urônico-(hexosamina-6-sulfato)- ácido urônico-(N-acetilexosamina)-ácido urônico
UA-HN-UA(S2)	Ácido urônico-hexosamina-(ácido urônico – dissulfato)
UA-HN-UA-HNAc-UA	Ácido urônico-hexosamina-ácido urônico-(N-acetilexosamina)-ácido urônico

*)Artigo de medição correlacionado à hexose

Tabela 8: Ácidos Biliares (nM)

Código BC	Analito
CA	Ácido cólico
CDCA	Ácido chenodiólico
DCA	Ácido deoxicólico
GCA	Ácido glicólico
GCDCA	Ácido glicochenodeoxicólico
GDCA	Ácido glicodeoxicólico
GLCA	Ácido glicolitocólico
GLCAS	Sulfato de ácido glicolitocólico
GUDCA	Ácido glicoursodesoxicólico
LCA	Ácido litocólico
TCA	Ácido taurocólico
TCDCA	Ácido taurochenodesoxicólico
TDCA	Ácido taurodesoxicólico
TLCA	Ácido taurolitocólico
TLCAS	Sulfato de ácido taurolitocólico
TUDCA	Ácido tauroursodesoxicólico
UDCA	Ácido ursodeoxicólico

Tabela 9: Metabólitos de Metabolismo Energético (μM)

Código BC	Novo Código BC	Analitos
3-PG	3-PG	3-fosfoglicerato
alpha-KGA	alpha-KGA	Ácido alfa-cetoglutarico
AMP	AMP	Adenosina-5'-monofosfato
Arg	Arg	Arginina
Asp	Asp	Ácido aspártico
DHAP + 3-PGA	DHAP + 3-PGA	Diidroxiacetonofosfato + 3-fosfogliceraldeído
Fum	Fum	Ácido fumárico
Glt-6-P	Glt-6-P	Gliconato-6-fosfato
Glu	Glu	Ácido glutâmico
Hex	Hex	Hexose (por exemplo, Glicose)
Fru-1,6-BP	Hex-BP	Hexosebisfosfato (por exemplo, Frutose-1,6-bisfosfato)
Glc-1-P + Glc-6-P + Fru-6-P	Hex-P	Hexosefosfato (por exemplo, Glicose-1-fosfato + Glicose-6-fosfato + Frutose-6-fosfato)
Lac	Lac	Lactatoe
Rib-5-P + Ribul-5-P	Pent-P	Pentosefosfato (por exemplo, Ribose-5-fosfato + Ribulose-5-fosfato)
PEP	PEP	Fosfoenolpiruvato
Pyr + OAA	Pyr + OAA	Piruvato + Oxaloacetato
Suc	Suc	Ácido succínico
Ery-4-P	Tetr-P	Tetrosefosfato (por exemplo, Eritrose-4-fosfato)

Além disso, a invenção é também dirigida a um kit adaptado para realização do presente método, onde o kit compreende um dispositivo, cujo dispositivo contém um ou mais poços e um ou mais suplementos impregnados com, pelo menos, um padrão interno. Esse dispositivo é descrito em detalhes nos documentos de patentes WO 2007/003344 e
5 WO 2007/003343, cujos conteúdos são aqui incorporados por essas referências.

Os exemplos seguintes ajudam a elucidar a presente invenção, sem, de nenhum modo, ter a pretensão de limitar o seu escopo.

Exemplos

10 Comparações foram feitas entre diferentes estágios de doença renal, como, também, comparação de nefropatia diabética com outras doenças renais crônicas.

Informação Geral

Seis grupos, diabéticos nos estágios 3-5 da CKD (os estágios oficiais 1-3 foram todos incluídos no que é aqui chamado de estágio 3) e não-diabéticos nos estágios
15 3-5 da CKD, tiveram coletadas amostras de urina (57) e plasma (76), respectivamente, no Montpellier University Hospital. Estudos de metabolômica foram usados para quantificar cerca de 320 metabólitos do plasma e 300 da urina, incluindo as classes de aminoácidos, aminas biogênicas, poliaminas, acilcarnitinas, fosfatidilcolinas, monossacarídeos e oligossacarídeos redutores, esfingomielinas, eicosanóides, ácidos
20 biliares e intermediários de metabolismo energético (conforme definido acima), na presença de padrões internos isotopicamente rotulados, e determinados por FIA e HPIC – espectrometria de massa em tandem, com múltiplo monitoramento de reação (MRM), usando um aparelho de modelo Sciex 4000 QTrap, com ionização por eletropulverização. Além disso, 160 ácidos graxos foram quantificados no plasma por
25 GC-MS/MS. Os conjuntos de dados foram analisados com análise de componentes principais não-supervisionada (PCA) e análise de discriminantes mínimos quadrados parcialmente supervisionadas (PLS-DA), usando o software MarkerView (Life Technologies).

Análise de P/U e U

30 A análise foi feita nos pacientes em que o plasma e urina foram disponíveis (isto é, 57; “Análise de P/U”) e também usando somente as amostras de plasma (isto é, 76; “Análise de P”), assim, mostrando que um marcador pode trabalhar

em combinação com plasma e urina, mas, também, pode ser medido somente no plasma. Diferentes comparações foram feitas para avaliar os biomarcadores para a CKD, mas, também, para observar se uma diferença entre nefropatia diabética e outras doenças renais pode ser distinguida. Portanto, foram feitas comparações entre estágios mais baixos e mais altos da CKD em todos os pacientes, mas, também, separadamente, nos diabéticos e não-diabéticos.

Definição de Termos

1 – Supra-regulação e Infra-regulação

Uma supra-regulação significa um aumento na concentração de um metabólito, por exemplo, um aumento na velocidade na qual essa reação bioquímica ocorre, devido, por exemplo, a uma mudança na atividade enzimática. Para uma infra-regulação, a situação é oposta.

2 – Teste-t

O teste-t é um teste de hipótese estatística, sendo usado e integrado no software MarkerView, e aplicado a cada variável na Tabela, determinando se a média de cada grupo é significativamente diferente de um dado desvio padrão e de um número de amostras, por exemplo, para descobrir se existe uma diferença real entre as médias de dois grupos diferentes.

3 – Valor-p

O valor-p é a probabilidade de se obter um resultado pelo menos tão extremo quanto o que foi realmente observado, supondo a hipótese nula (a hipótese de nenhuma mudança ou efeito) ser verdadeira. O valor-p é sempre positivo e quanto menor for o valor, mais baixa será a probabilidade de ser uma ocorrência de mudança. Um valor-p de 0,05 ou menos, rejeita a hipótese nula ao nível de 5%, o que significa que somente em 5% do tempo, a mudança tem uma chance de ocorrer. Esse é o nível estabelecido nas presentes Tabelas.

4 – Mudança de Múltiplo de Log (*Log-Fold Change*)

Uma mudança de múltiplo de log é definida como a diferença entre as concentrações transformadas como log médio em cada condição. Esse é um modo de descrever quanto maior ou menor é o valor em um grupo comparado a outro. Assim, por exemplo, uma mudança de múltiplo de log de 0,3 é “equivalente” a um aumento de mudança de $\exp(0,3)=1,34$ vezes, comparado ao controle (grupo saudável). Além disso,

uma mudança de múltiplo de log de -0,3 é “equivalente” a um aumento de mudança de $\exp.(-0,3)=0,74=(1/1,34)$ vezes, comparado ao controle ou diminuição de mudança de 1,34 vezes para a doença.

5 Resultados:

Os resultados das medições acima descritas são resumidos nas seguintes Tabelas 10-27. As Tabelas 10-18 se referem à “Análise de P/U” e as Tabelas 19-27 se referem à “Análise de P”. Nas Tabelas os valores de “p” foram obtidos com o teste-t padrão, implementado no software MarkerView. Um valor positivo de múltiplo de log representa uma supra-regulação do metabólito no estágio mais alto e, vice-versa. As abreviações usadas são:

D – diabético; ND – não-diabético; AC – acilcarnitina; SU – açúcar; BN – amina biogênica; SM – esfingomielina; TFA – ácido graxo total; FFA – ácido graxo livre; PC – fosfatidilcolina; OA – ácido orgânico.

15

Análise de Plasma/Urina (“P/U”)

Tabela 10 – Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados nos estágios 4 e 3 da CKD.

Metabólito	P/U		Mud. Múlt. log	
	Classe	Valor-p	(Est.4/Est.3)	
C5-DC(C6-OH)	AC	P	5,65E-05	0,57
ADMA	BN	U	1,70E-04	-0,44
Cit/Arg	PROP.	P	2,20E-04	0,16
Phe	AA	P	0,0005	0,10
Serotonina	BN	U	0,0009	-0,44
DMA total	BN	U	0,0011	-0,32
Cit	AA	P	0,0013	0,19
C4	AC	U	0,0018	-0,31
PC aa C42:4	PC	P	0,0029	0,08
C18:2	AC	P	0,0042	0,16
SDMA	BN	U	0,0056	-0,27
C10	AC	P	0,0085	0,19

Gly	AA	U	0,0105	-0,32
C4:1-DC(C6)	AC	U	0,0110	-0,34
C9	AC	P	0,0138	0,26
C5-OH (C3-DC-M)	AC	U	0,0138	-0,18
Met-SO	BN	P	0,0140	0,15
C9	AC	U	0,0140	-0,30
PC ae C32:1	PC	P	0,0143	0,08
C5:1-DC	AC	U	0,0147	-0,29
C2	AC	P	0,0154	0,13
Creatinina	BN	U	0,0162	0,22
dH	SU	U	0,0164	-0,33
Orn/Arg	PROP.	P	0,0172	0,10
Ác. cetoglutarico	OA	P	0,0214	0,31
His	AA	U	0,0217	-0,28
Asn	AA	P	0,0253	0,06
PC ae C32:2	PC	P	0,0277	0,07
PC ae C44:6	PC	P	0,0299	0,09
Orn	AA	P	0,0306	0,10
C10	AC	U	0,0311	-0,20
C10:1	AC	U	0,0325	-0,20
Creatinina	BN	P	0,0338	0,17
PC aa C30:2	PC	P	0,0338	0,06
C5	AC	U	0,0340	-0,26
Ser	AA	U	0,0342	-0,19
SM (OH) C16:1	SM	P	0,0354	0,07
His	AA	P	0,0362	0,05
cis-C18:1w7	FFA	P	0,0368	0,09
SM C16:0	SM	P	0,0369	0,05
H5	SU	U	0,0369	-0,25
SDMA	BN	P	0,0388	0,14
cis-C18:1w9	FFA	P	0,0412	0,11
SM C16:1	SM	P	0,0441	0,05
C5:1	AC	U	0,0443	-0,16

C8:1	AC	P	0,0450	0,22
Trp	AA	U	0,0465	-0,21
SM (OH) C14:1	SM	P	0,0492	0,07
Met	AA	U	0,0493	-0,29

Tabela 11: Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados nos estágios 5 e 4 da CKD.

Metabólito	Classe	P/U		Mud. Múlt. log (Est.5/Est.4)
			Valor-p	
Creatinina	BN	P	3,41E-05	0,35
SDMA	BN	P	8,22E-05	0,26
SDMA/Arg	PROP.	P	0,0001	0,34
total DMA	BN	P	0,0001	0,27
C5-DC(C6-OH)	AC	P	0,0004	0,30
Cit/Arg	PROP.	P	0,0006	0,20
C0	AC	P	0,0006	-0,22
PC ae C38:3	PC	P	0,0013	-0,12
Orn	AA	U	0,0018	0,89
Pro	AA	U	0,0028	0,50
SM (OH) C22:2	SM	P	0,0038	-0,12
PC aa C36:3	PC	P	0,0040	-0,14
Trp	AA	P	0,0055	-0,22
C3	AC	P	0,0055	-0,22
PC aa C36:4	PC	P	0,0076	-0,14
Tyr	AA	P	0,0077	-0,19
SM C22:3	SM	P	0,0080	-0,12
C9	AC	P	0,0086	0,24
SM C20:2	SM	P	0,0097	-0,18
C9:0	TFA	P	0,0099	0,40
C2	AC	P	0,0104	-0,16
PC aa C34:3	PC	P	0,0114	-0,20
PC aa C34:4	PC	U	0,0114	-0,19
SM C18:1	SM	P	0,0115	-0,14

Val	AA	P	0,0121	0,52
PC aa C38:3	PC	U	0,0125	-0,11
Xle	AA	P	0,0131	0,50
Glicosona	SU	P	0,0136	0,35
PC aa C38:4	PC	P	0,0143	-0,12
GDCA	BA	P	0,0150	-0,68
PC aa C32:2	PC	U	0,0164	-0,15
Espermina	BN	P	0,0186	1,78
PC ae C38:2	PC	P	0,0238	-0,10
Gly	AA	P	0,0239	0,29
SM C18:0	SM	P	0,0243	-0,11
PC aa C38:5	PC	P	0,0246	-0,11
PC ae C40:4	PC	P	0,0251	-0,10
Phe	AA	P	0,0259	-0,11
UA (1)	SU	U	0,0280	0,35
PC aa C40:4	PC	U	0,0290	-0,13
C0	AC	U	0,0292	-0,31
Tyr/Phe	PROP.	U	0,0296	-0,11
PC aa C32:3	PC	P	0,0315	-0,12
PC ae C38:4	PC	U	0,0322	-0,09
cis-C18:3w6	TFA	P	0,0326	-0,15
PC aa C40:3	PC	P	0,0354	-0,08
(HNAc-UA)2	SU	U	0,0362	0,28
PC ae C40:3	PC	U	0,0376	-0,09
H-dH	SU	U	0,0384	0,33
Ile	AA	P	0,0400	1,08
Leu	AA	U	0,0402	0,62
lysoPC a C16:1	PC	P	0,0403	-0,14
PC ae C32:1	PC	P	0,0424	-0,09
PC aa C34:2	PC	P	0,0424	-0,10
C18:1	AC	P	0,0436	0,92
C10-DC	AC	P	0,0446	0,38
C5:1-DC	AC	P	0,0471	0,19
cis-C22:1w9	TFA	P	0,0495	0,12

Tabela 12: Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados nos estágios 5 e 3 da CKD.

Metabólito	Classe	P/U		Mud. Múlt. log (Est.5/Est.3)
			Valor-p	
C5-DC(C6-OH)	AC	P	2,77E-09	0,88
Creatinina	BN	P	3,20E-08	0,51
Cit/Arg	PROP.	P	5,24E-08	0,37
SDMA	BN	P	7,89E-08	0,41
DMA total	BN	P	7,32E-07	0,32
Ác. cetoglutarico	OA	P	1,91E-06	0,38
Pro	AA	U	3,08E-06	0,85
SDMA/Arg	PROP.	P	6,60E-06	0,51
C9	AC	P	7,93E-06	0,50
Cit	AA	P	4,83E-05	0,28
Trp	AA	P	0,0002	-0,27
Dopamina	BN	U	0,0002	-1,06
ADMA	BN	U	0,0003	-0,73
C6:1	AC	P	0,0004	1,18
C10:1	AC	U	0,0005	-0,55
Tyr/Phe	PROP.	P	0,0007	-0,15
Serotonina	BN	U	0,0008	-0,76
C5:1	AC	U	0,0008	-0,38
Cit	AA	U	0,0014	0,66
C0	AC	P	0,0017	-0,21
C5:1-DC	AC	P	0,0024	0,37
C4	AC	U	0,0026	-0,50
SM C20:2	SM	P	0,0027	-0,17
C5-OH (C3-DC-M)	AC	U	0,0027	-0,29
lysoPC a C20:3	PC	P	0,0027	-0,16
SM C22:3	SM	P	0,0029	-0,14
PC aa C34:4	PC	P	0,0035	-0,22
PC aa C34:3	PC	P	0,0044	-0,17

Lactato	OA	P	0,0049	-0,16
lysoPC a C14:0	PC	P	0,0062	-0,31
PC aa C36:4	PC	P	0,0066	-0,14
DMA total	BN	U	0,0077	-0,36
lysoPC a C16:1	PC	P	0,0079	-0,18
Glicosona	SU	U	0,0081	0,31
Orn/Arg	PROP.	P	0,0082	0,13
UA (1)	SU	U	0,0083	0,33
C8	AC	P	0,0122	0,49
dH	SU	U	0,0143	-0,49
P	SU	U	0,0152	-0,39
C8:1	AC	P	0,0159	0,31
Pro	AA	P	0,0172	0,13
PC aa C32:1	PC	U	0,0176	1.60
C0	AC	U	0,0185	-0,47
C4:1-DC(C6)	AC	U	0,0196	-0,51
Espermina	BN	U	0,0209	1.01
lysoPC a C20:4	PC	P	0,0212	-0,15
PC aa C38:5	PC	P	0,0212	-0,11
TDCA	BA	P	0,0220	0,55
PC aa C38:4	PC	P	0,0231	-0,12
SM C24:0	SM	U	0,0236	1.38
HNAc-H6	SU	U	0,0245	0,70
PC ae C38:0	PC	P	0,0248	-0,11
Met-SO	BN	P	0,0249	0,15
PC aa C34:1	PC	U	0,0255	1.50
PC aa C36:6	PC	P	0,0261	-0,14
C5:1-DC	AC	U	0,0288	-0,40
SM C20:2	SM	U	0,0295	1.20
SM C24:1	SM	U	0,0301	1.45
lysoPC a C16:0	PC	P	0,0310	-0,09
C9	AC	U	0,0344	-0,35
GCA	BA	P	0,0360	0,28

SDMA	BN	U	0,0361	-0,27
Val	AA	U	0,0371	0,35
H5-HNAc3	SU	U	0,0406	0,82
lysoPC a C18:1	PC	P	0,0419	-0,09
cis-C18:1w7	FFA	P	0,0422	0,11
HNAc	SU	U	0,0422	-0,31
cis-C22:1w9	TFA	P	0,0449	0,11
Tyr	AA	P	0,0471	-0,14
SM C22:3	SM	U	0,0493	1,1

Tabela 13: Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em diabéticos nos estágios 4 e 3 da CKD.

Metabólito	P/U		Valor-p	Mud. Múlt. log (D4/D3)
	Classe			
Cit/Arg	PROP.	P	0,0046	0,18
ADMA	BN	U	0,0048	-0,35
C5-DC(C6-OH)	AC	P	0,0079	0,49
C4	AC	U	0,0084	-0,35
C4:1	AC	P	0,0097	0,30
Serotonina	BN	U	0,0178	-0,37
cis-C17:2w6	TFA	P	0,0205	-0,23
PC aa C42:4	PC	P	0,0227	0,09
Gly	AA	U	0,0254	-0,39
Cit	AA	P	0,0288	0,18
DMA total	BN	U	0,0299	-0,27
cis-C22:3w3	FFA	P	0,0326	-0,18
cis-C22:6w3 (DHA)	TFA	P	0,0407	0,11
Ser	AA	U	0,0435	-0,20
cis-C22:5w3	TFA	P	0,0499	0,10

Tabela 14: Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em diabéticos nos estágios 5 e 4 da CKD.

Metabólito	Classe	P/U		Mud. (D5/D4)	Múlt. log
			Valor-p		
Creatinina	BN	P	5,30E-06	0,48	
C5-DC(C6-OH)	AC	P	0,0002	0,42	
UA (1)	SU	P	0,0009	1,06	
C9:0	TFA	P	0,0026	0,41	
DMA total	BN	P	0,0026	0,32	
C0	AC	P	0,0034	-0,19	
Pro	AA	U	0,0050	0,64	
ADMA	BN	P	0,0053	0,13	
SDMA	BN	P	0,0076	0,26	
Espermina	BN	U	0,0443	1,51	
Gly	AA	P	0,0127	0,11	
Ác. fumárico	OA	P	0,0160	0,76	
Pro	AA	P	0,0219	0,17	
C9	AC	P	0,0247	0,28	
Gln	AA	P	0,0249	0,07	
SDMA/Arg	PROP.	P	0,0276	0,20	
Asn	AA	P	0,0287	0,14	
C0	AC	U	0,0439	-0,47	

5 Tabela 15: Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em diabéticos nos estágios 5 e 3 da CKD.

Metabólito	Classe	P/U		Mud. (D5/D3)	Múlt. log
			Valor-p		
C5-DC(C6-OH)	AC	P	4,24E-07	0,92	
Creatinina	BN	P	8,35E-07	0,51	
Ác. cetoglutárico	OA	P	4,60E-05	0,46	
SDMA	BN	P	0,0004	0,40	
DMA total	BN	P	0,0004	0,27	
C9	AC	P	0,0005	0,44	

TDCA	BA	P	0,0007	1.02
TCA	BA	P	0,0008	1.11
C5:1	AC	U	0,0009	-0,39
ADMA	BN	U	0,0009	-0,76
C10:1	AC	U	0,0010	-0,63
Cit/Arg	PROP.	P	0,0016	0,29
GCA	BA	P	0,0020	0,61
Pro	AA	U	0,0021	0,73
Dopamina	BN	U	0,0025	-1.28
Pro	AA	P	0,0028	0,23
Serotonina	BN	U	0,0040	-0,98
C5-OH (C3-DC-M)	AC	U	0,0043	-0,31
Cit	AA	P	0,0043	0,27
C0	AC	P	0,0087	-0,22
cis-C17:2w6	FFA	P	0,0145	-0,13
DMA total	BN	U	0,0152	-0,49
C4	AC	U	0,0165	-0,62
Asn	AA	P	0,0170	0,17
Gln	AA	P	0,0220	0,09
dH	SU	U	0,0229	-0,51
C9	AC	U	0,0252	-0,45
SDMA/Arg	PROP.	P	0,0265	0,36
His	AA	P	0,0334	0,11
C5:1-DC	AC	P	0,0349	0,29
SDMA	BN	U	0,0366	-0,42
SM C20:2	SM	P	0,0382	-0,12
PC aa C34:3	PC	P	0,0394	-0,15
C0	AC	U	0,0400	-0,65
C6:0	FFA	P	0,0415	-0,07
C4:1-DC(C6)	AC	U	0,0420	-0,61
GDCA	BA	P	0,0436	0,41
HNAc	SU	U	0,0482	-0,41
Tyr/Phe	PROP.	P	0,0484	-0,11

Tabela 16: Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em não-diabéticos nos estágios 4 e 3 da CKD.

Metabólito	P/U		Mud. Múlt. log	
	Classe		Valor-p	(ND4/ND3)
Phe	AA	P	0,0008	0,14
Orn/Arg	PROP.	P	0,0017	0,18
Met-SO	BN	P	0,0023	0,25
Orn	AA	P	0,0030	0,18
Creatinina	BN	P	0,0033	0,35
C5	AC	P	0,0036	0,24
C5-DC(C6-OH)	AC	P	0,0040	0,68
Asn	AA	P	0,0044	0,11
ADMA	BN	P	0,0067	0,13
Cit	AA	P	0,0067	0,18
total DMA	BN	U	0,0086	-0,44
C9	AC	P	0,0098	0,42
SDMA	BN	U	0,0101	-0,38
Creatinina	BN	U	0,0104	-0,28
H5	SU	U	0,0110	-0,56
ADMA	BN	U	0,0131	-0,62
SM C26:1	SM	P	0,0144	0,07
H4	SU	U	0,0151	-0,33
PC ae C44:6	PC	P	0,0162	0,14
C14:2	AC	U	0,0180	-0,97
C18:1	AC	P	0,0182	0,10
Pro	AA	P	0,0185	0,09
cis-C20:2w6	FFA	P	0,0193	0,11
C10	AC	P	0,0200	0,23
Cit/Arg	PROP.	P	0,0204	0,14
Serotonina	BN	U	0,0216	-0,60
SM C16:1	SM	P	0,0243	0,08
Dopamina	BN	U	0,0254	-0,44

P	SU	U	0,0255	-0,47
Ác. cetoglutárico	OA	P	0,0256	0,21
DMA total	BN	P	0,0262	0,16
cis-C18:2w6	FFA	P	0,0263	0,12
PC aa C42:0	PC	P	0,0298	0,13
PC ae C32:2	PC	P	0,0308	0,10
Glu	AA	P	0,0308	0,30
cis-C18:2w6	TFA	P	0,0313	0,08
C5:1	AC	U	0,0323	-0,33
HNAc	SU	U	0,0332	-0,45
cis-C18:1w7	FFA	P	0,0337	0,14
SM C16:0	SM	P	0,0369	0,07
PC ae C32:1	PC	P	0,0376	0,09
C5-OH (C3-DC-M)	AC	U	0,0383	-0,26
His	AA	P	0,0391	0,06
Gln	AA	P	0,0411	0,03
dH	SU	U	0,0417	-0,64
PC aa C42:1	PC	P	0,0424	0,12
C12	AC	U	0,0430	-0,34
PC aa C30:2	PC	P	0,0443	0,09
C7-DC	AC	P	0,0460	0,78
C8	AC	P	0,0472	0,79
C9	AC	U	0,0482	-0,51
PC aa C42:4	PC	P	0,0489	0,08

Tabela 17: Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em não-diabéticos nos estágios 5 e 4 da CKD.

Metabólito	Classe	P/U		Mud. Múlt. log (ND5/ND4)
			Valor-p	
C14:2	AC	U	0,0001	1,07
Cit/Arg	PROP.	P	0,0006	0,31
SDMA/Arg	PROP.	P	0,0011	0,45
PC ae C38:3	PC	P	0,0014	-0,18

Phe	AA	P	0,0024	-0,21
Arg	AA	U	0,0030	0,43
Asn	AA	P	0,0033	-0,17
SM C20:2	SM	P	0,0039	-0,22
C14:1	AC	U	0,0042	0,93
PC aa C38:3	PC	P	0,0048	-0,19
Trp	AA	P	0,0050	-0,33
PC aa C36:3	PC	P	0,0050	-0,17
SDMA	BN	P	0,0054	0,27
H1	SU	U	0,0058	0,64
PC aa C40:3	PC	P	0,0059	-0,15
PC aa C34:3	PC	P	0,0060	-0,23
Met	AA	P	0,0063	-0,24
Tyr	AA	P	0,0089	-0,31
cis-C18:4w3	TFA	P	0,0092	-0,92
H2-dH2	SU	U	0,0097	0,41
Gln	AA	P	0,0100	-0,12
PC ae C44:3	PC	P	0,0101	-0,14
SM (OH) C22:2	SM	P	0,0101	-0,18
His	AA	P	0,0102	-0,19
PC ae C40:3	PC	P	0,0112	-0,14
Arg	AA	P	0,0128	-0,19
PC aa C40:5	PC	P	0,0130	-0,20
lysoPC a C16:0	PC	P	0,0133	-0,17
C10-DC	AC	U	0,0162	0,77
C3	AC	P	0,0163	-0,30
SM C18:1	SM	P	0,0182	-0,18
PC aa C38:5	PC	P	0,0184	-0,18
PC aa C32:3	PC	P	0,0189	-0,17
C12	AC	U	0,0203	0,46
Orn	AA	U	0,0208	1.36
PC aa C32:2	PC	P	0,0221	-0,19
PC aa C38:4	PC	P	0,0223	-0,19

PC aa C34:4	PC	P	0,0235	-0,28
PC aa C42:5	PC	P	0,0237	-0,11
PC ae C32:1	PC	P	0,0246	-0,11
Glu	AA	U	0,0254	0,74
cis-C16:1w13	TFA	P	0,0255	-0,38
UA-HNAc-S	SU	P	0,0259	-0,52
PC ae C40:4	PC	P	0,0269	-0,14
Xle	AA	U	0,0293	0,81
C0	AC	P	0,0299	-0,26
DMA total	BN	P	0,0302	0,22
PC aa C40:4	PC	P	0,0329	-0,23
Thr	AA	P	0,0332	-0,21
SM C22:3	SM	P	0,0333	-0,13
Ala	AA	P	0,0338	-0,20
Val	AA	U	0,0343	0,74
PC aa C42:4	PC	P	0,0353	-0,11
PC ae C38:2	PC	P	0,0354	-0,17
PC aa C36:2	PC	P	0,0363	-0,15
PC ae C44:6	PC	P	0,0364	-0,20
PC aa C36:4	PC	P	0,0365	-0,15
Glicosona	SU	U	0,0401	0,49
cis-C18:3w3	TFA	P	0,0439	-0,20
Lys	AA	U	0,0459	0,58
PC aa C36:1	PC	P	0,0467	-0,11
C4-OH (C3-DC)	AC	U	0,0472	0,28
H3	SU	U	0,0472	0,51

Tabela 18: Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em não-diabéticos nos estágios 5 e 3 da CKD.

Metabólito	Classe	P/U		Mud. Múlt. log (ND5/ND3)
			Valor-p	
Cit	AA	U	1.15E-06	0,89
Cit/Arg	PROP.	P	1.26E-05	0,44
Orn/Arg	PROP.	P	2.63E-05	0,28
SDMA/Arg	PROP.	P	4.36E-05	0,62
Creatinina	BN	P	8.73E-05	0,53
SDMA	BN	P	0,0001	0,42
C5-DC(C6-OH)	AC	P	0,0002	0,83
DMA total	BN	P	0,0002	0,38
C8	AC	P	0,0005	1.06
lysoPC a C14:0	PC	P	0,0006	-0,78
Pro	AA	U	0,0006	1.10
Trp	AA	P	0,0007	-0,41
C9	AC	P	0,0032	0,61
Cit	AA	P	0,0033	0,29
lysoPC a C16:0	PC	P	0,0037	-0,16
H1	SU	U	0,0045	0,52
Lys	AA	U	0,0062	0,80
Tyr/Phe	PROP.	P	0,0084	-0,19
cis-C18:1w7	FFA	P	0,0086	0,22
cis-C18:1w9	FFA	P	0,0088	0,27
lysoPC a C20:3	PC	P	0,0097	-0,23
Arg	AA	P	0,0100	-0,18
Ác. cetoglutárico	OA	P	0,0108	0,29
Met-SO	BN	P	0,0109	0,20
PC aa C34:4	PC	P	0,0131	-0,38
lysoPC a C20:4	PC	P	0,0135	-0,26
Tyr	AA	P	0,0156	-0,25
MetSO/Met	PROP.	P	0,0160	0,32
Ala	AA	P	0,0166	-0,18

Val	AA	U	0,0175	0,64
C18:1	AC	P	0,0176	0,13
lysoPC a C16:1	PC	P	0,0183	-0,25
SM C20:2	SM	U	0,0216	2.12
His	AA	P	0,0218	-0,13
Gln	AA	P	0,0230	-0,09
Thr	AA	P	0,0231	-0,19
Thr	AA	U	0,0235	0,37
Asp	AA	P	0,0237	1.16
SM C22:3	SM	P	0,0252	-0,19
Met	AA	P	0,0257	-0,16
Dopamina	BN	U	0,0268	-0,83
C16:2	AC	P	0,0281	0,32
SM C16:0	SM	U	0,0294	2.56
PC aa C38:4	PC	P	0,0299	-0,20
C5:1-DC	AC	P	0,0303	0,49
cis-C20:1w9	TFA	P	0,0310	0,13
PC aa C38:5	PC	P	0,0319	-0,16
Ala	AA	U	0,0320	0,28
H3	SU	U	0,0336	0,41
Glicosona	SU	U	0,0345	0,41
SM C20:2	SM	P	0,0356	-0,21
cis-C16:1w7	FFA	P	0,0375	0,39
cis-C20:1w9	FFA	P	0,0391	0,21
cis-C17:1w9	FFA	P	0,0395	0,28
PC aa C36:4	PC	P	0,0406	-0,19
Lactato	OA	P	0,0407	-0,19
lysoPC a C28:1	PC	P	0,0435	-0,28
lysoPC a C18:1	PC	P	0,0463	-0,12
cis-C11:1w5	FFA	P	0,0495	-0,68
PC ae C38:0	PC	P	0,0498	-0,18

Análise de "P"

Tabela 19 – Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados nos estágios 4 e 3 da CKD.

Metabólito	Classe	Valor-p	Mud. Múlt. log (Est.4/Est.3)
C5-DC(C6-OH)	AC	1.51E-05	0,59
Cit/Arg	PROP.	0,0004	0,15
Cit	AA	0,0019	0,17
C18:2	AC	0,0019	0,16
Phe	AA	0,0024	0,08
C10	AC	0,0026	0,20
PC aa C42:4	PC	0,0044	0,08
PC ae C32:	PC	0,0049	0,08
PC ae C32:2	PC	0,0076	0,08
Met-SO	BN	0,0088	0,14
PC ae C44:6	PC	0,0103	0,09
SM (OH) C16:1	SM	0,0105	0,08
PC aa C30:2	PC	0,0128	0,07
Creatinina	BN	0,0142	0,17
cis-C18:1w7	FFA	0,0152	0,10
SDMA	BN	0,0155	0,16
SM C16:0	SM	0,0158	0,05
PC ae C40:3	PC	0,0194	0,07
C10:1	AC	0,0205	0,41
C2	AC	0,0210	0,11
C9	AC	0,0216	0,23
Asn	AA	0,0218	0,06
cis-C18:1w9	FFA	0,0220	0,12
Ác. cetoglutárico	OA	0,0220	0,28
cis-C18:1w7	TFA	0,0224	0,07
PC aa C40:1	PC	0,0225	0,19
SM C16:1	SM	0,0252	0,06
C8:1	AC	0,0254	0,23
Orn/Arg	PROP.	0,0278	0,09

C18:1	AC	0,0313	0,08
Trp	AA	0,0317	-0,08
C14:1	AC	0,0320	0,06
SDMA/Arg	PROP.	0,0325	0,19
C8	AC	0,0338	0,38
PC aa C42:0	PC	0,0366	0,08
PC aa C42:1	PC	0,0381	0,08
SM (OH) C14:1	SM	0,0385	0,07
SM C18:1	SM	0,0400	0,06
SM C26:1	SM	0,0403	0,05
C16:0	TFA	0,0405	0,06
PC ae C30:2	PC	0,0407	0,07
GDCA	BA	0,0410	0,28
TDCA	BA	0,0411	0,80
PC aa C40:2	PC	0,0422	0,06
His	AA	0,0439	0,05
PC ae C34:1	PC	0,0477	0,07
PC ae C30:1	PC	0,0481	0,07
Orn	AA	0,0493	0,09

Tabela 20 – Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados nos estágios 5 e 4 da CKD.

Metabólito	Classe	Valor-p	Mud. Múlt. log (Est.5/Est.4)
UA (1)	SU	7,28E-09	1.35
Creatinina	BN	2,60E-08	0,39
C5-DC(C6-OH)	AC	2,48E-07	0,38
SM (OH) C22:2	SM	7,04E-07	-0,16
SDMA/Arg	PROP.	1,10E-06	0,34
Glicosona	SU	1,49E-06	1.16
SDMA	BN	1,84E-06	0,26
Trp	AA	1,45E-05	-0,25
DMA total	BN	1,86E-05	0,24

Cit/Arg	PROP.	2,07E-05	0,20
PC ae C38:2	PC	2,33E-05	-0,15
C0	AC	2,62E-05	-0,23
PC ae C38:3	PC	3,58E-05	-0,13
SM (OH) C22:1	SM	4,31E-05	-0,15
C9	AC	0,0001	0,28
PC ae C42:3	PC	0,0001	-0,14
PC ae C38:1	PC	0,0002	-0,15
PC ae C40:4	PC	0,0002	-0,12
PC ae C34:2	PC	0,0002	-0,14
PC ae C36:3	PC	0,0002	-0,12
Tyr	AA	0,0003	-0,18
C16	AC	0,0003	-0,12
PC ae C42:2	PC	0,0004	-0,14
PC ae C42:4	PC	0,0005	-0,12
Met	AA	0,0007	-0,16
Ala	AA	0,0008	-0,16
PC ae C32:1	PC	0,0009	-0,10
C3	AC	0,0009	-0,24
C14:1	AC	0,0010	-0,11
SM (OH) C16:1	SM	0,0010	-0,11
PC ae C40:3	PC	0,0010	-0,10
PC ae C36:4	PC	0,0013	-0,12
SM C18:1	SM	0,0014	-0,12
PC ae C34:3	PC	0,0015	-0,15
Arg	AA	0,0017	-0,13
C23:0	TFA	0,0017	-0,14
SM (OH) C14:1	SM	0,0017	-0,11
PC ae C44:4	PC	0,0019	-0,12
SM C16:1	SM	0,0019	-0,09
PC ae C36:2	PC	0,0024	-0,11
PC ae C44:5	PC	0,0026	-0,11
PC ae C32:2	PC	0,0026	-0,10

C21:0	TFA	0,0026	-0,11
C14:2	AC	0,0027	-0,09
lysoPC a C16:0	PC	0,0030	-0,12
SM (OH) C24:1	SM	0,0031	-0,10
PC ae C36:5	PC	0,0033	-0,12
PC ae C42:5	PC	0,0034	-0,09
PC ae C38:4	PC	0,0037	-0,10
lysoPC a C18:2	PC	0,0040	-0,18
PC ae C44:6	PC	0,0044	-0,11
Tyr/Phe	PROP.	0,0050	-0,10
PC ae C30:1	PC	0,0051	-0,10
lysoPC a C18:0	PC	0,0052	-0,15
C18:1	AC	0,0056	-0,11
PC ae C40:1	PC	0,0057	-0,11
PC aa C36:2	PC	0,0057	-0,10
PC ae C40:5	PC	0,0057	-0,09
PC aa C36:3	PC	0,0058	-0,11
C18:2	AC	0,0060	-0,15
C18	AC	0,0060	-0,11
PC aa C38:3	PC	0,0063	-0,10
PC aa C34:	PC	0,0066	-0,10
Phe	AA	0,0067	-0,09
PC aa C40:2	PC	0,0068	-0,07
PC aa C42:0	PC	0,0070	-0,10
Thr	AA	0,0071	-0,13
PC aa C32:3	PC	0,0075	-0,11
PC aa C42:4	PC	0,0077	-0,09
lysoPC a C17:0	PC	0,0078	-0,15
PC ae C40:2	PC	0,0085	-0,09
PC ae C44:3	PC	0,0085	-0,10
PC ae C38:6	PC	0,0088	-0,11
SM C26:0	SM	0,0090	-0,07
trans-C18:1w9	FFA	0,0090	0,19

SM C14:0	SM	0,0090	-0,09
SM C24:1 (P)	SM	0,0091	-0,07
PC ae C38:5	PC	0,0096	-0,09
PC aa C32:2	PC	0,0100	-0,11
lysoPC a C20:3	PC	0,0101	-0,15
Lys	AA	0,0116	-0,11
C2	AC	0,0118	-0,14
lysoPC a C20:4	PC	0,0131	-0,15
PC aa C28:1	PC	0,0134	-0,09
Gln	AA	0,0144	-0,06
8Me-C18:0	FFA	0,0145	-0,43
Ser	AA	0,0153	-0,10
lysoPC a C14:0	PC	0,0165	-0,24
PC aa C42:1	PC	0,0172	-0,08
PC ae C30:2	PC	0,0178	-0,09
PC ae C36:1	PC	0,0189	-0,08
cis-C11:1w5	FFA	0,0193	-0,48
PC ae C30:0	PC	0,0194	-0,10
Ác. fumárico	OA	0,0198	0,43
cis-C22:1w9	TFA	0,0200	0,11
lysoPC a C28:1	PC	0,0216	-0,19
PC aa C38:1	PC	0,0232	-0,08
SM C24:0	SM	0,0237	-0,07
Val	AA	0,0254	-0,11
lysoPC a C18:1	PC	0,0263	-0,11
lysoPC a C16:1	PC	0,0272	-0,12
PC aa C40:3	PC	0,0273	-0,07
cis-C17:2w7	TFA	0,0276	-0,13
PC aa C38:4	PC	0,0284	-0,10
cis-C11:1w5	TFA	0,0308	-0,37
SM C16:0	SM	0,0320	-0,05
trans-C18:1w9	TFA	0,0332	0,09
cis-C17:2w7	FFA	0,0351	-0,12

cis-C18:2w6	TFA	0,0355	-0,07
17Me-C18:0	FFA	0,0355	-0,27
cis-C20:3w6	TFA	0,0390	-0,11
cis-C15:1w5	FFA	0,0402	-0,09
PC ae C40:6	PC	0,0411	-0,08
PC aa C34:3	PC	0,0442	-0,12
C9:0	TFA	0,0469	0,24
PC ae C42:1	PC	0,0469	-0,08
MetSO/Met	PROP.	0,0471	0,11
His	AA	0,0472	-0,07
PC ae C36:0	PC	0,0486	-0,07
PC aa C40:1	PC	0,0489	-0,15
Glu	AA	0,0490	-0,26

Tabela 21 – Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados nos estágios 5 e 3 da CKD.

Metabólito	Classe	Valor-p	Mud. Múlt. log (Est.5/Est.3)
C5-DC(C6-OH)	AC	3,78E-13	0,98
Creatinina	BN	2,67E-11	0,57
SDMA	BN	1,52E-10	0,42
Cit/Arg	PROP.	8,77E-10	0,34
SDMA/Arg	PROP.	1,34E-09	0,53
Trp	AA	2,93E-09	-0,33
Ác. Cetoglutárico	OA	9,96E-09	0,41
C9	AC	2,75E-08	0,51
DMA total	BN	1,04E-07	0,30
C7-DC	AC	1,37E-06	0,98
Tyr/Phe	PROP.	1,61E-06	-0,15
lysoPC a C20:3	PC	2,35E-05	-0,20
C0	AC	2,71E-05	-0,22
Cit	AA	7,49E-05	0,22
lysoPC a C14:0	PC	0,0002	-0,33

lysoPC a C20:4	PC	0,0004	-0,18
Orn/Arg	PROP.	0,0008	0,14
SM (OH) C22:1	SM	0,0008	-0,11
lysoPC a C16:0	PC	0,0011	-0,13
lysoPC a C18:2	PC	0,0012	-0,19
Tyr	AA	0,0012	-0,16
PC ae C42:3	PC	0,0013	-0,11
C23:0	TFA	0,0014	-0,14
SM (OH) C22:2	SM	0,0014	-0,10
Ala	AA	0,0018	-0,13
lysoPC a C18:0	PC	0,0022	-0,14
lysoPC a C18:1	PC	0,0022	-0,14
MetSO/Met	PROP.	0,0023	0,25
Trans-C18:1w9	FFA	0,0026	0,24
GCA	BA	0,0028	0,42
PC ae C44:4	PC	0,0028	-0,09
Val	AA	0,0033	-0,12
PC ae C42:2	PC	0,0037	-0,11
C5:1-DC	AC	0,0043	0,28
PC ae C34:3	PC	0,0045	-0,13
PC ae C38:2	PC	0,0047	-0,10
Arg	AA	0,0051	-0,11
C21:0	TFA	0,0055	-0,11
Met	AA	0,0061	-0,13
PC ae C36:3	PC	0,0066	-0,09
lysoPC a C16:1	PC	0,0070	-0,15
PC ae C38:1	PC	0,0074	-0,10
Lys	AA	0,0089	-0,10
Pro	AA	0,0097	0,12
PC aa C34:4	PC	0,0112	-0,17
cis-C17:2w7	TFA	0,0114	-0,13
PC ae C36:5	PC	0,0121	-0,10
TDCA	BA	0,0138	0,60

cis-C17:2w9	TFA	0,0139	-0,10
cis-C18:1w7	FFA	0,0142	0,12
cis-C17:2w7	FFA	0,0145	-0,11
Thr	AA	0,0152	-0,12
PC ae C42:4	PC	0,0153	-0,07
C8:1	AC	0,0158	0,39
PC ae C40:1	PC	0,0159	-0,08
lysoPC a C28:1	PC	0,0173	-0,19
lysoPC a C17:0	PC	0,0179	-0,12
Met-SO	BN	0,0185	0,11
cis-C22:1w9	TFA	0,0187	0,10
ADMA	BN	0,0190	0,08
cis-C15:1w5	TFA	0,0191	-0,09
PC ae C36:4	PC	0,0192	-0,08
PC ae C34:2	PC	0,0194	-0,08
PC ae C38:3	PC	0,0210	-0,08
Ser	AA	0,0218	-0,09
Glu	AA	0,0260	0,16
TCA	BA	0,0266	0,58
C3	AC	0,0268	-0,17
PC ae C40:4	PC	0,0283	-0,07
cis-C15:1w5	FFA	0,0287	-0,08
cis-C17:2w9	FFA	0,0289	-0,10
PC ae C44:5	PC	0,0291	-0,07
C8	AC	0,0331	0,34
PC aa C36:5	PC	0,0333	-0,13
SM C22:3	SM	0,0342	-0,09
SM (OH) C24:1	SM	0,0385	-0,07
Leu	AA	0,0413	-0,12
8Me-C18:0	FFA	0,0429	-0,36
PC ae C38:0	PC	0,0441	-0,10
cis-C18:1w9	FFA	0,0443	0,13

Tabela 22 – Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em diabéticos nos estágios 4 e 3 da CKD.

Metabólito	Classe	Mud. Múlt. log	
		Valor-p	(D4/D3)
C4:1	AC	0,0063	0,29
Cit/Arg	PROP.	0,0074	0,15
PC aa C42:4	PC	0,0084	0,11
C5-DC(C6-OH)	AC	0,0114	0,49
Cit	AA	0,0134	0,19
cis-C22:6w3 (DHA)	TFA	0,0188	0,13
Phe	AA	0,0398	0,08
cis-C22:5w3	TFA	0,0438	0,10
GDCA	BA	0,0460	0,47
cis-C17:2w6	TFA	0,0471	-0,19
PC ae C38:4	PC	0,0488	0,08
SDMA	BN	0,1692	0,14
Creatinina	BN	0,7538	0,03

5 Tabela 23 – Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em diabéticos nos estágios 5 e 4 da CKD.

Metabólito	Classe	Mud. Múlt. log	
		Valor-p	(D5/D4)
Creatinina	BN	4,23E-06	0,49
UA (1)	SU	3,40E-05	1.18
SDMA/Arg	PROP.	5,12E-05	0,40
C0	AC	5,61E-05	-0,23
C5-DC(C6-OH)	AC	8,10E-05	0,48
Glicosona	SU	9,48E-05	1.19
SDMA	BN	0,0004	0,27
total DMA	BN	0,0010	0,26
C3	AC	0,0024	-0,27
Trp	AA	0,0025	-0,26
SM (OH) C22:2	SM	0,0037	-0,12

C14:1	AC	0,0068	-0,12
17Me-C18:0	FFA	0,0077	-0,50
Tyr	AA	0,0100	-0,18
SM (OH) C14:1	SM	0,0115	-0,11
C16	AC	0,0121	-0,14
C9	AC	0,0145	0,25
Ác. Fumárico	OA	0,0151	0,75
SM (OH) C16:1	SM	0,0159	-0,11
trans-C18:1w9	TFA	0,0159	0,14
SM (OH) C22:1	SM	0,0163	-0,10
Tyr/Phe	PROP.	0,0187	-0,12
Cis-C16:1w13	TFA	0,0202	0,19
Cit/Arg	PROP.	0,0206	0,16
C9:0	TFA	0,0224	0,28
trans-C18:1w9	FFA	0,0236	0,25
Arg	AA	0,0255	-0,14
PC ae C42:3	PC	0,0283	-0,11
PC ae C42:4	PC	0,0297	-0,12
PC ae C44:5	PC	0,0315	-0,11
PC ae C38:2	PC	0,0320	-0,10
PC ae C44:4	PC	0,0322	-0,12
Ala	AA	0,0323	-0,16
PC ae C42:5	PC	0,0332	-0,10
PC ae C38:3	PC	0,0353	-0,09
H1	SU	0,0353	-0,15
PC ae C40:4	PC	0,0361	-0,09
PC ae C42:2	PC	0,0368	-0,11
PC ae C34:2	PC	0,0406	-0,10
Cis-C17:2w7	TFA	0,0444	-0,15
Cis-C11:1w5	FFA	0,0455	-0,57
Orn	AA	0,0465	-0,12
GUDCA	BA	0,0483	-0,48

Tabela 24 – Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em diabéticos nos estágios 5 e 3 da CKD.

Metabólito	Classe	Valor-p	Mud. Múlt. log (D5/D3)
C5-DC(C6-OH)	AC	2,89E-07	0,97
Creatinina	BN	1,03E-06	0,52
SDMA	BN	5,67E-06	0,41
Ác. cetoglutárico	OA	1,14E-05	0,46
SDMA/Arg	PROP.	3,09E-05	0,51
C0	AC	7,11E-05	-0,25
Cit/Arg	PROP.	0,0001	0,31
C9	AC	0,0002	0,38
Trp	AA	0,0004	-0,29
DMA total	BN	0,0004	0,22
GCA	BA	0,0013	0,71
cis-C17:2w7	FFA	0,0014	-0,15
Tyr/Phe	PROP.	0,0018	-0,14
cis-C17:2w7	TFA	0,0028	-0,16
cis-C15:1w5	TFA	0,0083	-0,13
cis-C17:2w9	TFA	0,0083	-0,15
C6:0	FFA	0,0085	-0,07
lysoPC a C20:3	PC	0,0129	-0,16
cis-C17:2w9	FFA	0,0143	-0,13
C3	AC	0,0146	-0,25
cis-C15:1w5	FFA	0,0158	-0,11
cis-C16:1w13	TFA	0,0158	0,23
PC ae C34:3	PC	0,0162	-0,14
cis-C17:2w6	TFA	0,0175	-0,23
Cit	AA	0,0180	0,19
PC ae C44:4	PC	0,0221	-0,10
Pro	AA	0,0241	0,14
TCA	BA	0,0257	1.32
TDCA	BA	0,0337	1.11

PC ae C42:3	PC	0,0352	-0,10
C23:0	TFA	0,0378	-0,14
lysoPC a C14:0	PC	0,0455	-0,24
C8:1	AC	0,0462	0,24
lysoPC a C18:1	PC	0,0468	-0,14

Tabela 25 – Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em não-diabéticos nos estágios 4 e 3 da CKD.

Metabólito	Classe	Valor-p	Mud. Múlt. Log (ND4/ND3)
C5-DC(C6-OH)	AC	0,0005	0,72
Creatinina	BN	0,0005	0,38
C18:2	AC	0,0009	0,30
Met-SO	BN	0,0009	0,24
C10	AC	0,0024	0,30
C9	AC	0,0038	0,41
Orn/Arg	PROP.	0,0039	0,16
PC ae C44:6	PC	0,0049	0,15
C8	AC	0,0060	0,98
C18:1	AC	0,0075	0,13
DMA total	BN	0,0077	0,19
C10:1	AC	0,0087	0,66
PC aa C42:0	PC	0,0104	0,13
PC ae C32:2	PC	0,0117	0,11
12S-HETE	BA	0,0123	-0,84
PC aa C42:1	PC	0,0138	0,14
cis-C18:1w7	TFA	0,0144	0,11
Cit/Arg	PROP.	0,0144	0,14
SM C26:1	SM	0,0180	0,07
PC ae C32:1	PC	0,0187	0,09
Ác. cetoglutárico	OA	0,0188	0,21
C5	AC	0,0189	0,19
C5:1-DC	AC	0,0197	0,40

SM C16:0	SM	0,0208	0,07
cis-C20:2w6	FFA	0,0211	0,10
Cit	AA	0,0229	0,15
cis-C18:1w7	FFA	0,0243	0,15
Orn	AA	0,0269	0,14
Asn	AA	0,0302	0,08
Lactato	OA	0,0306	-0,14
cis-C18:2w6	FFA	0,0313	0,11
PC aa C30:2	PC	0,0313	0,09
SM C16:1	SM	0,0320	0,08
MetSO/Met	PROP.	0,0325	0,24
Phe	AA	0,0340	0,09
SDMA/Arg	PROP.	0,0352	0,27
PC aa C42:2	PC	0,0359	0,11
SDMA	BN	0,0375	0,19
PC aa C38:0	PC	0,0396	0,12
cis-C18:2w6	TFA	0,0396	0,07
C8:1	AC	0,0402	0,37
Trp	AA	0,0412	-0,13
ADMA	BN	0,0430	0,10
SM (OH) C16:1	SM	0,0491	0,08
Tyr/Phe	PROP.	0,0491	-0,09

Tabela 26 – Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em não-diabéticos nos estágios 5 e 4 da CKD.

Metabólito	Classe	Valor-p	Mud. Múlt. Log (ND5/ND4)
SM (OH) C22:2	SM	8,21E-05	-0,20
Cit/Arg	PROP.	0,0002	0,24
PC ae C38:3	PC	0,0002	-0,17
PC ae C38:2	PC	0,0003	-0,21
PC ae C36:3	PC	0,0005	-0,17
Glicosona	SU	0,0005	1.13

C18:2	AC	0,0007	-0,29
C5-DC(C6-OH)	AC	0,0008	0,29
PC ae C38:1	PC	0,0012	-0,21
SM (OH) C22:1	SM	0,0013	-0,19
Creatinina	BN	0,0014	0,30
PC ae C40:4	PC	0,0016	-0,14
PC ae C34:2	PC	0,0017	-0,17
PC ae C42:3	PC	0,0020	-0,18
SDMA	BN	0,0022	0,25
PC aa C38:3	PC	0,0024	-0,16
PC aa C36:3	PC	0,0024	-0,15
Trp	AA	0,0025	-0,24
Met	AA	0,0026	-0,19
PC ae C32:1	PC	0,0026	-0,12
PC aa C34:3	PC	0,0032	-0,18
PC ae C40:3	PC	0,0033	-0,12
PC ae C44:3	PC	0,0036	-0,16
SM C20:2	SM	0,0039	-0,17
C9	AC	0,0040	0,30
C21:0	TFA	0,0042	-0,15
PC aa C34:4	PC	0,0044	-0,24
PC ae C36:2	PC	0,0050	-0,14
PC aa C32:2	PC	0,0051	-0,16
SDMA/Arg	PROP.	0,0052	0,28
His	AA	0,0053	-0,14
PC aa C36:2	PC	0,0058	-0,15
PC ae C42:2	PC	0,0058	-0,17
SM C16:1	SM	0,0060	-0,12
PC aa C40:2	PC	0,0063	-0,11
PC ae C36:4	PC	0,0067	-0,14
PC ae C42:4	PC	0,0073	-0,13
SM C24:1	SM	0,0074	-0,11
Ala	AA	0,0077	-0,16

PC aa C34:2	PC	0,0077	-0,12
total DMA	BN	0,0084	0,21
SM C18:1	SM	0,0084	-0,15
PC aa C40:3	PC	0,0094	-0,12
PC ae C34:3	PC	0,0096	-0,19
PC ae C44:6	PC	0,0102	-0,14
PC ae C40:1	PC	0,0106	-0,15
PC aa C36:1	PC	0,0108	-0,12
PC aa C36:0	PC	0,0109	-0,12
SM (OH) C24:1	SM	0,0113	-0,13
PC ae C40:2	PC	0,0116	-0,13
Gln	AA	0,0116	-0,09
lysoPC a C18:2	PC	0,0129	-0,24
PC ae C32:2	PC	0,0133	-0,11
Phe	AA	0,0135	-0,13
C16	AC	0,0136	-0,10
PC ae C40:5	PC	0,0137	-0,12
PC aa C38:4	PC	0,0140	-0,15
PC ae C36:1	PC	0,0145	-0,11
PC aa C38:5	PC	0,0159	-0,14
Tyr	AA	0,0164	-0,18
PC ae C38:0	PC	0,0168	-0,18
C23:0	TFA	0,0172	-0,16
PC aa C32:3	PC	0,0180	-0,14
C0	AC	0,0182	-0,22
lysoPC a C16:0	PC	0,0184	-0,15
PC aa C36:6	PC	0,0185	-0,21
lysoPC a C18:0	PC	0,0187	-0,19
Glu	AA	0,0191	-0,34
PC ae C38:6	PC	0,0193	-0,14
PC ae C38:4	PC	0,0199	-0,12
PC aa C28:1	PC	0,0218	-0,13
PC aa C36:4	PC	0,0228	-0,13

PC ae C36:5	PC	0,0233	-0,13
Cis-C18:4w3	TFA	0,0239	-0,51
PC aa C42:0	PC	0,0246	-0,11
C14:2	AC	0,0255	-0,10
PC ae C40:6	PC	0,0265	-0,14
SM (OH) C16:1	SM	0,0266	-0,10
PC ae C34:1	PC	0,0272	-0,10
Arg	AA	0,0274	-0,11
C18	AC	0,0276	-0,11
PC ae C36:0	PC	0,0281	-0,09
SM C14:0	SM	0,0289	-0,12
PC aa C38:1	PC	0,0291	-0,12
SM C24:0	SM	0,0294	-0,10
SM C18:0	SM	0,0297	-0,10
PC ae C44:4	PC	0,0298	-0,12
SM C26:1	SM	0,0302	-0,09
Lys	AA	0,0303	-0,11
PC ae C38:5	PC	0,0304	-0,11
PC aa C42:4	PC	0,0330	-0,10
lysoPC a C17:0	PC	0,0332	-0,18
PC aa C42:1	PC	0,0344	-0,12
Thr	AA	0,0347	-0,13
lysoPC a C16:1	PC	0,0368	-0,19
PC ae C44:5	PC	0,0384	-0,11
PC ae C30:1	PC	0,0387	-0,12
SM C22:3	SM	0,0392	-0,11
SM C26:0	SM	0,0395	-0,09
PC ae C34:0	PC	0,0405	-0,09
PC aa C42:5	PC	0,0440	-0,08
PC ae C30:0	PC	0,0443	-0,10
Cis-C20:3w6	TFA	0,0457	-0,12
lysoPC a C28:1	PC	0,0466	-0,28
H4	SU	0,0466	0,28

C18:0	TFA	0,0473	-0,08
Asn	AA	0,0482	-0,09
C18:1	AC	0,0482	-0,12
C14:1	AC	0,0482	-0,10
PC ae C42:5	PC	0,0492	-0,08
PC ae C30:2	PC	0,0499	-0,11

Tabela 27 – Metabólitos supra-regulados e infra-regulados, de modo significativo e altamente significativo, comparados em não-diabéticos nos estágios 5 e 3 da CKD.

Metabólito	Classe	Valor-p	Mud. Múlt. Log (ND5/ND3)
C5-DC(C6-OH)	AC	1,42E-07	1,00
Creatinina	BN	1,67E-06	0,67
Trp	AA	2,03E-06	-0,38
Cit/Arg	PROP.	2,65E-06	0,38
SDMA	BN	1,59E-05	0,43
Orn/Arg	PROP.	2,40E-05	0,22
SDMA/Arg	PROP.	2,94E-05	0,55
C9	AC	4,56E-05	0,72
DMA total	BN	6,36E-05	0,40
Ác. Cetoglutárico	OA	0,0002	0,36
PC aa C34:4	PC	0,0003	-0,38
Tyr/Phe	PROP.	0,0005	-0,16
lysoPC a C20:3	PC	0,0009	-0,24
Cit	AA	0,0010	0,27
lysoPC a C14:0	PC	0,0012	-0,44
MetSO/Met	PROP.	0,0016	0,32
lysoPC a C20:4	PC	0,0021	-0,24
C8	AC	0,0028	0,96
Ala	AA	0,0030	-0,16
SM C22:3	SM	0,0031	-0,18
C5:1-DC	AC	0,0034	0,50
Met-SO	BN	0,0034	0,18

SM (OH) C22:1	SM	0,0037	-0,16
Tyr	AA	0,0042	-0,19
lysoPC a C18:2	PC	0,0048	-0,21
Met	AA	0,0049	-0,15
PC aa C36:6	PC	0,0057	-0,23
PC aa C36:4	PC	0,0057	-0,18
lysoPC a C28:1	PC	0,0057	-0,35
SM (OH) C22:2	SM	0,0063	-0,14
PC aa C38:4	PC	0,0063	-0,18
Arg	AA	0,0064	-0,13
cis-C11:1w5	FFA	0,0066	-0,61
lysoPC a C16:0	PC	0,0069	-0,15
PC ae C40:1	PC	0,0075	-0,13
PC ae C38:2	PC	0,0078	-0,14
PC ae C38:1	PC	0,0079	-0,16
PC ae C38:0	PC	0,0080	-0,18
Lys	AA	0,0091	-0,13
lysoPC a C16:1	PC	0,0097	-0,22
SM C20:2	SM	0,0104	-0,18
Thr	AA	0,0118	-0,14
ADMA	BN	0,0120	0,11
lysoPC a C18:0	PC	0,0126	-0,17
His	AA	0,0126	-0,10
PC ae C36:4	PC	0,0126	-0,14
Val	AA	0,0153	-0,16
PC ae C38:3	PC	0,0167	-0,15
PC ae C38:4	PC	0,0172	-0,13
PC aa C38:5	PC	0,0176	-0,14
C23:0	TFA	0,0190	-0,14
PC ae C42:2	PC	0,0191	-0,13
C21:0	TFA	0,0194	-0,11
PC ae C42:3	PC	0,0203	-0,11
12S-HETE	BA	0,0205	-0,64

PC aa C34:3	PC	0,0212	-0,17
Lactato	OA	0,0228	-0,15
Cis-C22:1w9	TFA	0,0241	0,13
PC ae C36:3	PC	0,0247	-0,12
lysoPC a C18:1	PC	0,0249	-0,14
Trans-C18:1w9	FFA	0,0264	0,29
Cis-C18:4w3	TFA	0,0277	-0,59
PC ae C40:4	PC	0,0291	-0,11
PC ae C44:3	PC	0,0298	-0,12
PC aa C36:3	PC	0,0322	-0,13
SM (OH) C24:1	SM	0,0339	-0,10
C0	AC	0,0342	-0,19
PC aa C36:5	PC	0,0366	-0,18
Leu	AA	0,0367	-0,16
PC ae C36:5	PC	0,0376	-0,13
Cis-C20:5w3 (EPA)	TFA	0,0392	-0,21
Cis-C18:1w7	FFA	0,0402	0,17
PC aa C38:3	PC	0,0406	-0,14
Xle	AA	0,0413	-0,15
PC ae C42:4	PC	0,0431	-0,09
Cis-C20:3w6	TFA	0,0450	-0,16

Aplicabilidade Industrial

A presente invenção possibilita a previsão e o diagnóstico de doenças renais, de uma maneira aperfeiçoada e em um estágio inicial da doença, e permite ainda uma detecção mais sensível de mudanças patológicas nos rins. De fato, os biomarcadores de acordo com a invenção podem ser facilmente detectados em amostras biológicas, em particular, amostras de sangue e/ou urina, seu nível sendo consistentemente correlacionado ao grau de doença/distúrbio renal, e às suas mudanças de nível. Além disso, os biomarcadores de acordo com a invenção são também fundamentalmente valiosos, pelo fato de que podem adequadamente avaliar a nefrotoxicidade em modelos de animais ou em experimentos clínicos da fase I. Em outras palavras, são também adequados para avaliar nefrotoxicidade pré-clínica e clínica,

isto é, também, em um estágio bastante prematuro do desenvolvimento dos produtos farmacêuticos, notadamente, em modelos de animais ou em experimentos clínicos da fase I.

Com base nesses fundamentos, é possível a preparação de um kit, adequado para ajudar na produção de um diagnóstico mais confiável quando do início de doenças renais, especificamente, doença renal crônica (CKD) e nefropatia diabética (DN), e monitorar a progressão das mesmas.

Lista de Referências

- 10 - Boron W.F., Boulpaep E.L., *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*; 1a. Edição, Filadélfia: Elsevier Science; 2003, p. 737-747, 757-765, 769-772, 793-795;
- Star R., Hostetter T., Hortin G.L., *New Markers for Kidney Disease*; Clin. Chem., 2002; 48(9) 1374-1376;
- Barr D.B., Wilder L.C., Caudill S.P., Gonzalez A.J., Needham L.L., Pirkle J.L.,
15 *Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements*; Environ. Health Perspect.; 2005; 13(2) 192-200;
- Herget-Rosenthal S., van Wijk J.A., Bröcker-Preuss M., Bökenkamp A., *Increased urinary cystatin C reflects structural and functional renal tubular impairment independent of glomerular filtration rate*; Biochem., 2007; 40(13-14) 946-51;
- 20 - Basi S., Fesler P., Mimran A., Lewis J.B., *Microalbuminuria in Type 2 Diabetes and Hypertension: A marker, treatment, or innocent bystander?*; Diabetes Care, 2008; 31(2) S194-201;
- Wolf G., Ritz E., *Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes Prevention and Patient Management*; J. Am. Soc. Nephrol., 2003; 14(5) 1396-1405;
- 25 - Comper W.D., Osicka T.M., *Detection of urinary albumin*; Adv Chronic Kidney Dis., 2005; 12(2) 170-6;
- Vallance P., Leone A., Calver A., Collier J., Moncada S., *Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure*; Lancet, 1992; 339(8793) 572-5;
- 30 - Wahbi N., Dalton R.N., Turner C., Denton M., Abbs I., Swaminathan R., *Dimethylarginines in chronic renal failure*; J. Clin. Pathol., 2001; 54(6) 470-3;

- Fleck C., Janz A., Schweitzer F., Karge E., Schwertfeger M., Stein G., *Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients*; Kidney Int. Suppl., 2001; 78:S14-8;
- Martens-Lobenhoffer J., Bode-Böger S.M., *Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids*; J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2007; 15;851(1-2) 30-41;
- Zatz R., Baylis C., *Chronic nitric oxide inhibition model six years on*; Hypertension; 1998; 32(6) 958-64;
- Fouque D., Holt S., Guebre-Egziabher F., Nakamura K., Vianey-Saban C., Hadj-Aïssa A., Hoppel C.L., Kopple J.D., *Relationship between serum carnitina, acylcarnitinas, and renal function in patients with chronic renal disease*; J. Ren. Nutr.; 2006; 16(2) 125-31;
- Loughrey C.M., Young I.S., Lightbody J.H., McMaster D., McNamee P.T., Trimble E.R., *Oxidative stress in haemodialysis*; QJM; 1994; 87(11):679-83;
- Ha H., Kim K.H., *Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy*; Kidney Int Suppl.; 1995; 51:S18-21, (Revisão);
- Mashima R., Nakanishi-Ueda T., Yamamoto Y., *Simultaneous determination of methionine sulfoxide and methionine in blood plasma using gas chromatography-mass spectrometry*; Anal Biochem.; 2003; 313(1) 28-33;
- Yokoyama T., Kamijo-Ikemori A., Sugaya T., Hoshino S., Yasuda T., Kimura K., *Urinary excretion of liver type fatty acid binding protein accurately reflects the degree of tubulointerstitial damage*; Am. J. Pathol., 2009; (Public. ainda sem impressão);
- Komaba H., Fukagawa M., *Disturbance of phosphorus metabolism in chronic kidney disease*; Clin. Calcium; 2009; 19(2) 166-72;
- Friedman D.J., Talbert M.E., Bowden D.W., Freedman B.I., Mukanya Y., Enjyoji K., Robson S.C., *Functional ENTPD1 polymorphisms in African Americans with diabetes and end-stage renal disease*; Diabetes; 2009; 58(4) 999-1006;
- Atamer A., Kocyijit Y., Ecder S.A., Selek S., Ilhan N., Ecder T., Atamer Y., *Effect of oxidative stress on antioxidant enzyme activities, homocysteine and lipoproteins in chronic kidney disease*; J. Nephrol.; 2008; 21(6) 924-30;
- Reich H.N., Oudit G.Y., Penninger J.M., Scholey J.W., Herzenberg A.M., *Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease*. Kidney Int.; 2008; 74(12) 1610-6;

-
- Gutiérrez O.M., Mannstadt M., Isakova T., Rauh-Hain J.A., Tamez H., Shah A., Smith K., Lee H., Thadhani R., Jüppner H., Wolf M., *Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis*; N. Engl. J. Med.; 2008; 359(6) 584-92;
 - 5 - Zhou H., Cheruvanky A., Matsumoto T., Hiramatsu N., Cho M.E., Berger A., Leelahavanichkul A., Doi K., Chawla L.S., Illei G.G., Kopp J.B., Balow J.E., Austin H.A. 3rd, Yuen P.S., Star R.A., *Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease*; Kidney Int.; 2008; 74(5) 613-21;
 - Honda H., Oureshi A.R., Heimbürger O., Barany P., Wang K., Pecoits-Filho R., Stenvinkel P., Lindholm B, *Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin a as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD*; Am. J. Kidney Dis.; 2006; 47:139-48;
 - 10 - National Kidney Foundation, *K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease*;
 - 15 www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/toc.htm, Online2009-05-15;
 - Sakane N., Fujiwara S., Domichi M., Tsuzaki K., Matsuoka Y., Hamada T., Saiga Y., Kotani K., *Oxidative stress, inflammation, and atherosclerotic changes in retinal arteries in the Japanese population; results from the Mima study*; Endocr. J. 2008; 55(3) 485-488;
 - 20 - Rolo A.P., Palmeira C.M., *Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress*; Toxicol. Appl. Pharmacol.; 2006; 212(2) 167-78;
 - Ha H., Hwang I.A., Park J.H., Lee H.B., *Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy*; Diabetes Res. Clin. Pract.; 2008; 82(1) 42-5, (Revisão);
 - 25 - Sampanis C.H., *Management of hyperglycemia in patients with diabetes mellitus and chronic renal failure*; Hippokratia; 2008; 12(1) 22-7;
 - Williams R., Van Gaal L., Lucioni C., *CODE-2 Advisory Board. Assessing the impact of complications on the costs of Type II diabetes*; Diabetologia; 2002; 45(7)S13-7;
 - Wen C.P., Cheng T.Y., Tsai M.K., Chang Y.C., Chan H.T., Tsai S.P., Chiang P.H., Hsu C.C., Sung P.K., Hsu Y.H., Wen S.F., *All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: a prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan*; Lancet; 30 2008; 371(9631) 2173-82;
 - Massi-Benedetti M., *CODE-2 Advisory Board. The Cost of Diabetes Type II in Europe The CODE-2 Study*; Diabetologia; 2002; 45(7)S1-4.

REIVINDICAÇÕES

1. Conjunto biomarcador metabólico para avaliação de doença nos rins, **caracterizado** pelo fato de compreender pelo menos dois aminoácidos, pelo menos duas acilcarnitinas e, pelo menos, duas aminas biogênicas.
5
2. Conjunto biomarcador, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender ainda uma proporção de produto/substrato em relação a uma reação enzimática, preferivelmente, a proporção SDMA/arginina, a proporção citrulina/arginina, a proporção ornitina/arginina e/ou a proporção sulfóxido de metionina/metionina.
10
3. Conjunto biomarcador, de acordo com a reivindicação 1 e/ou reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que os aminoácidos são selecionados da Tabela 1, as acilcarnitinas são selecionadas da Tabela 2 e as aminas biogênicas são selecionadas da Tabela 3, conforme indicado no relatório descritivo, respectivamente.
15
4. Conjunto biomarcador, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de compreender ainda um ou mais metabólitos selecionados do grupo que consiste de poliaminas, fosfatidilcolinas, mono- e oligossacarídeos redutores, esfingomielinas, eicosanóides, ácidos de bile, açúcares fosforilados, ácidos orgânicos mono-, di- e trivalentes, e nucleotídeos.
20
5. Conjunto biomarcador, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que os aminoácidos são selecionados de Cit, Phe, Asn, Trp, His, Orn, Tyr, Met, Ala, Arg, Thr, Lys, Gln, Ser, Val, Glu, e Pro, as acilcarnitinas são selecionadas de C0, C5-DC(C6-OH), C5:1-DC, C8, C9, C10, C10:1, C14:1, e C18:1, as aminas biogênicas são selecionadas de MetSO, creatinina, SDMA, ADMA, DMA total, e serotonina, e as proporções são selecionadas de proporção de SDMA/arginina, proporção de citrulina/arginina, proporção de ornitina/arginina, e/ou proporção de sulfóxido de metionina/metionina.
25
30

6. Uso de uma combinação de metabólitos, compreendendo pelo menos dois aminoácidos, pelo menos duas acilcarnitinas e pelo menos duas aminas biogênicas, **caracterizado** pelo fato de que o dito uso se faz na forma de um conjunto biomarcador para avaliação de doença dos rins em uma amostra de sangue.

5

7. Método para avaliação de doença dos rins em um sujeito mamífero, **caracterizado** pelo fato de que o dito método compreende a obtenção de uma amostra biológica do sujeito, preferivelmente, sangue e/ou urina, e medição na amostra biológica da quantidade de pelo menos dois aminoácidos, pelo menos duas acilcarnitinas e, pelo menos, duas aminas biogênicas.

10

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de compreender ainda a medição na amostra biológica da proporção de um produto/substrato em relação a uma reação enzimática, preferivelmente, a proporção SDMA/arginina, a proporção citrulina/arginina, a proporção ornitina/arginina e/ou a proporção sulfóxido de metionina/metionina.

15

9. Método, de acordo com a reivindicação 7 e/ou reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que os aminoácidos são selecionados da Tabela 1, as acilcarnitinas são selecionadas da Tabela 2 e as aminas biogênicas são selecionadas da Tabela 3, conforme indicado no relatório descritivo, respectivamente.

20

10. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 7 a 9, **caracterizado** pelo fato de compreender ainda a medição na amostra biológica da quantidade de um ou mais metabólitos, selecionados do grupo que consiste de poliaminas, fosfatidilcolinas, mono- e oligossacarídeos redutores, esfingomielinas, eicosanóides, ácidos de bile e intermediários de metabolismo energético.

25

11. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 7 a 10, **caracterizado** pelo fato de que os aminoácidos são selecionados de Cít, Phe, Asn, Trp, His, Orn, Tyr, Met, Ala, Arg, Thr, Lys, Gln, Ser, Val, Glu, e Pro, as acilcarnitinas são selecionadas de C0, C5-DC(C6-OH), C5:1-DC, C8, C9, C10, C10:1, C14:1, e C18:1, as aminas biogênicas são selecionadas de MetSO, creatinina, SDMA, ADMA, DMA total,

30

e serotonina, e as proporções são selecionadas de proporção de SDMA/arginina, proporção de citrulina/arginina, proporção de ornitina/arginina, e/ou proporção de sulfóxido de metionina/metionina.

5 12. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 7 a 11, **caracterizado** pelo fato de que a medição é baseada em um método analítico quantitativo, preferivelmente, cromatografia, espectroscopia e espectrometria de massa.

10 13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que a cromatografia compreende GC, LC, HPLC e UPLC; a espectroscopia compreende UV/Vis, IR, e NMR; e a espectroscopia de massa compreende ESI-QqQ, ESI-QqTOF, MALDI-QqQ, MALDI-QqTOF, e MALDI-TOF-TOF.

15 14. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 7 a 13, **caracterizado** pelo fato de que a doença de rins é a doença crônica de rins (CKD), preferivelmente, nefropatia diabética (DN).

20 15. Kit, adaptado para realização do método de acordo com quaisquer das reivindicações 7-14, **caracterizado** pelo fato de compreender um dispositivo, cujo dispositivo compreende um ou mais poços e um ou mais suplementos, impregnados com pelo menos um padrão interno.

Figura 1

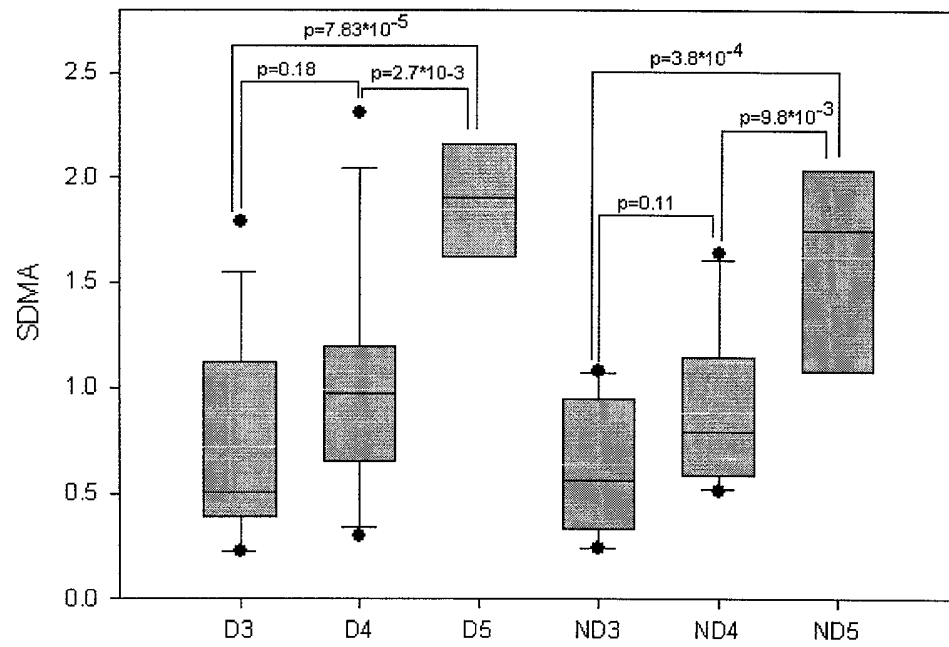


Figura 2

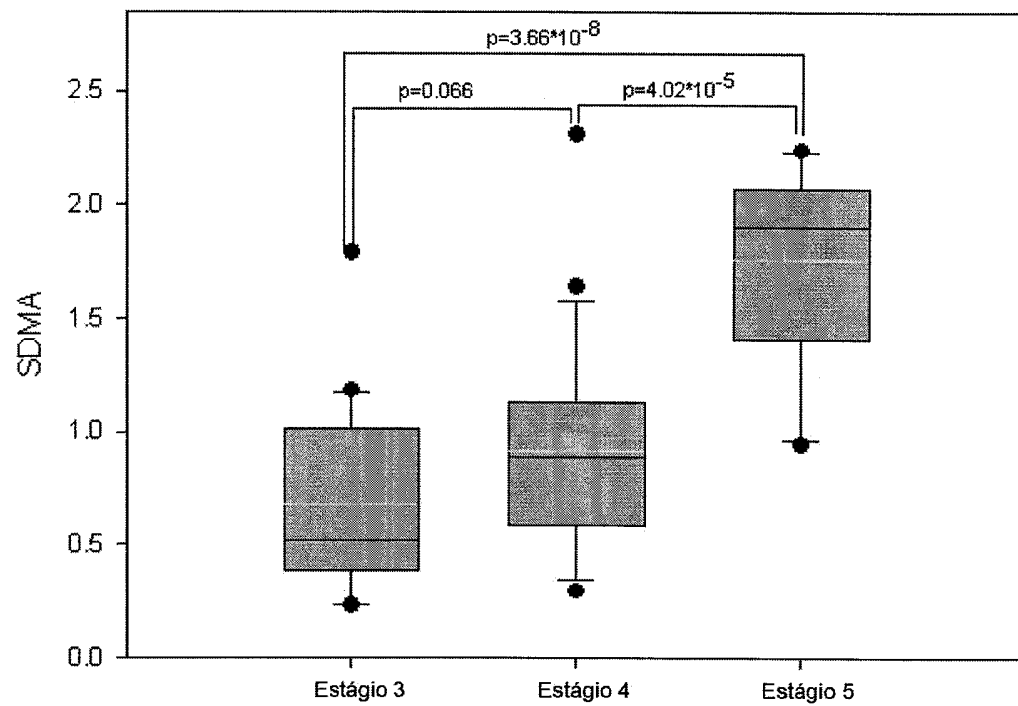


Figura 3

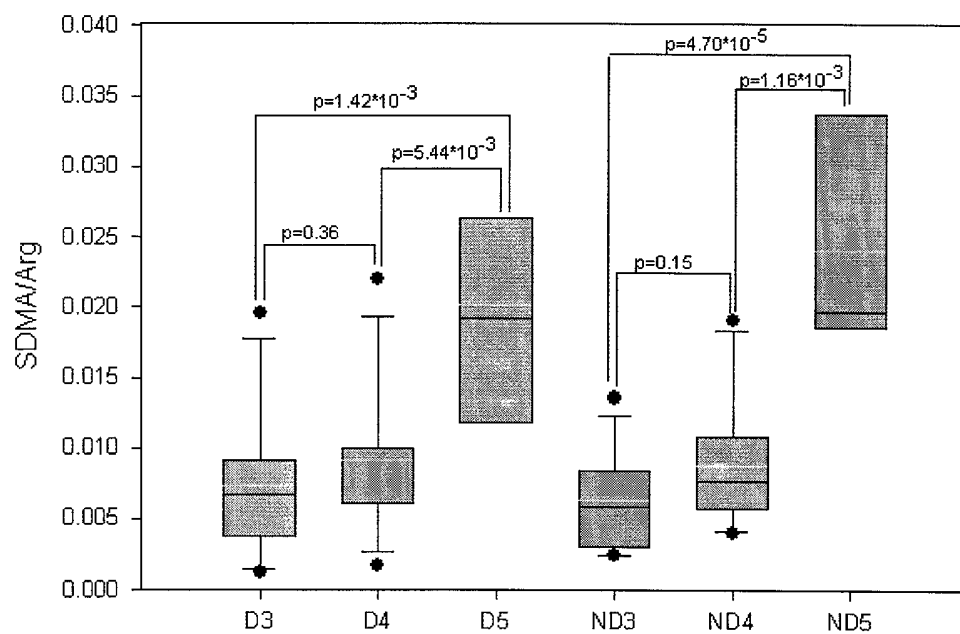


Figura 4:

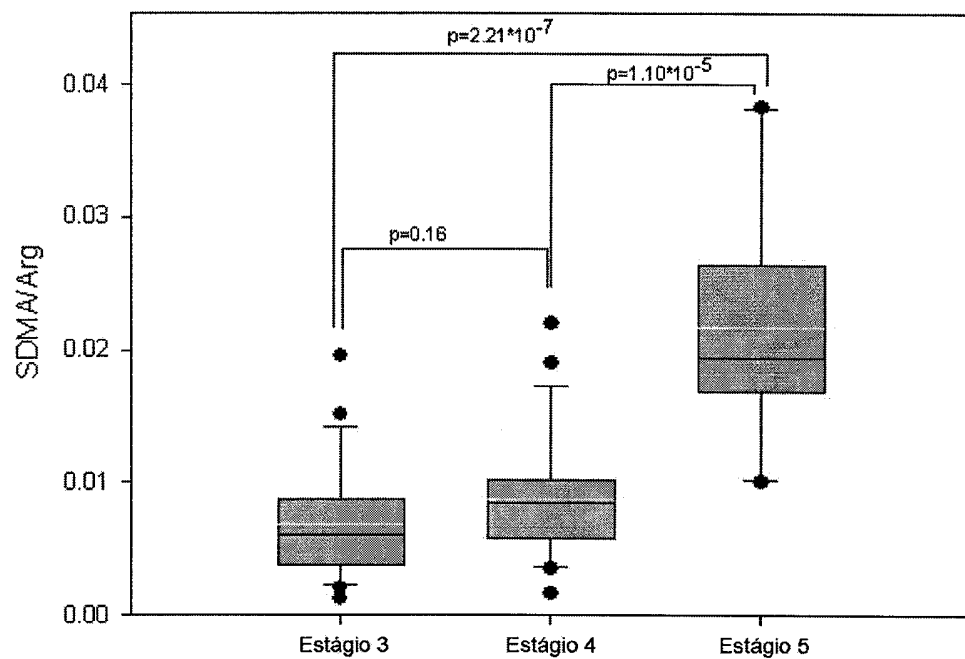


Figura 5:

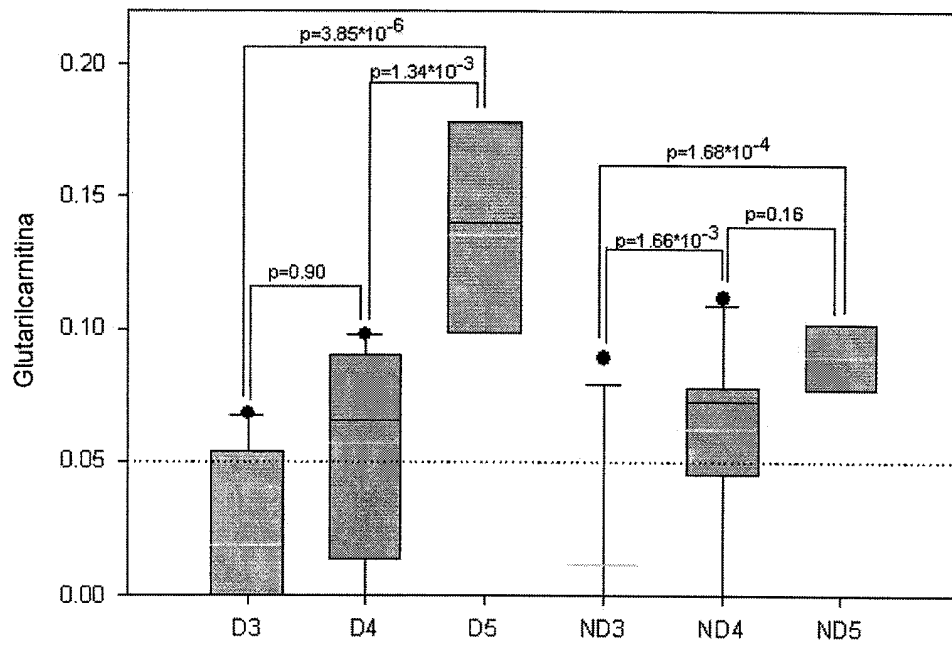


Figura 6:

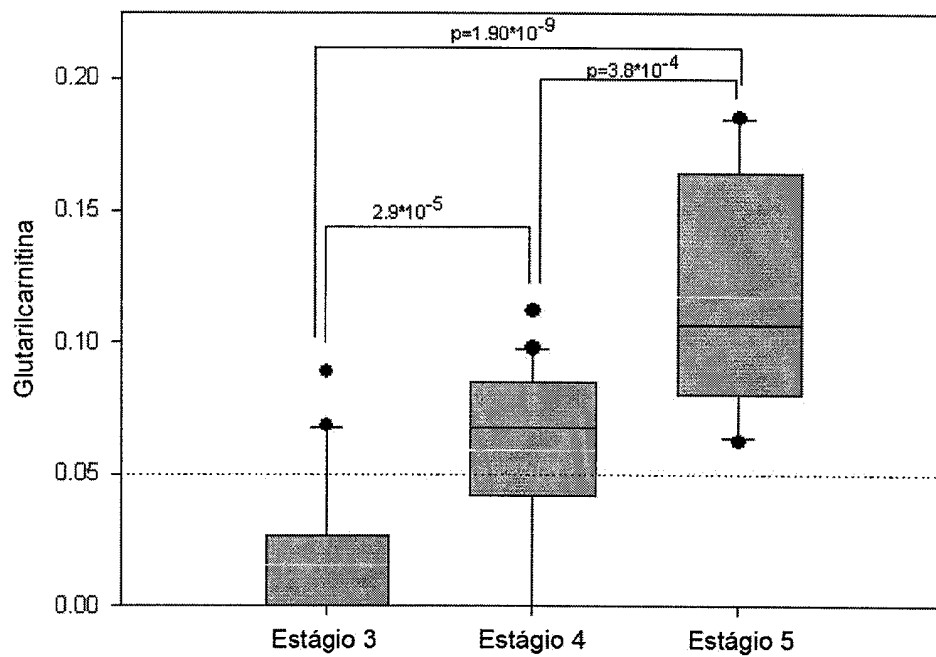


Figura 7:

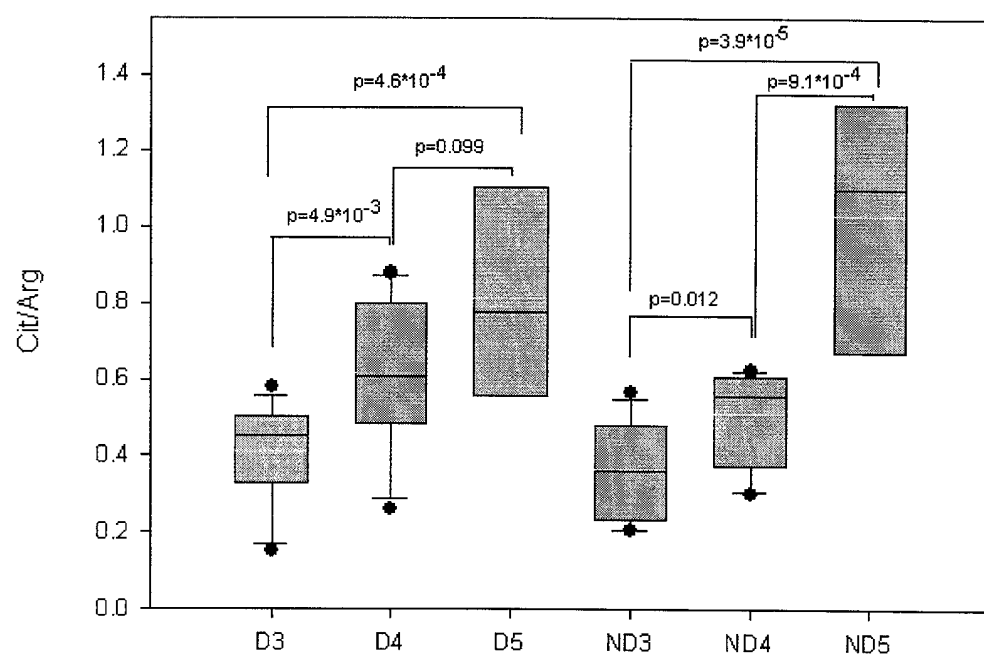


Figura 8:

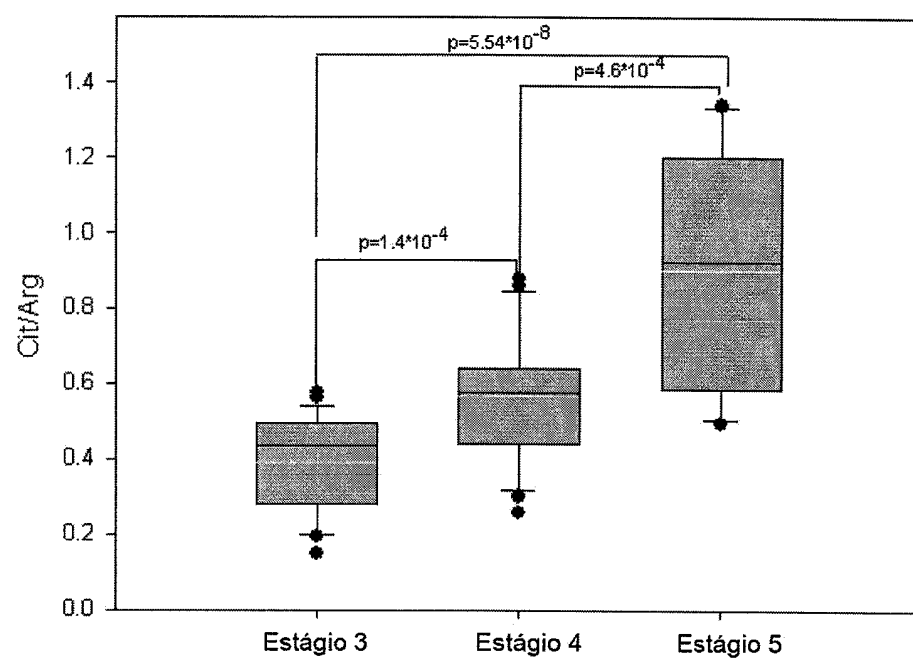


Figura 9:

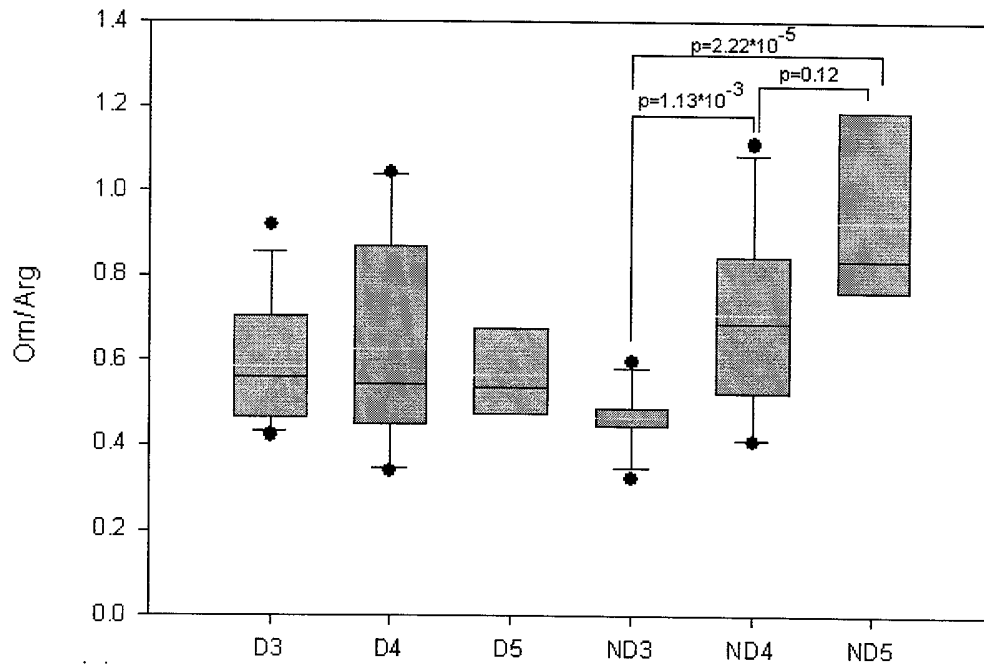


Figura 10:

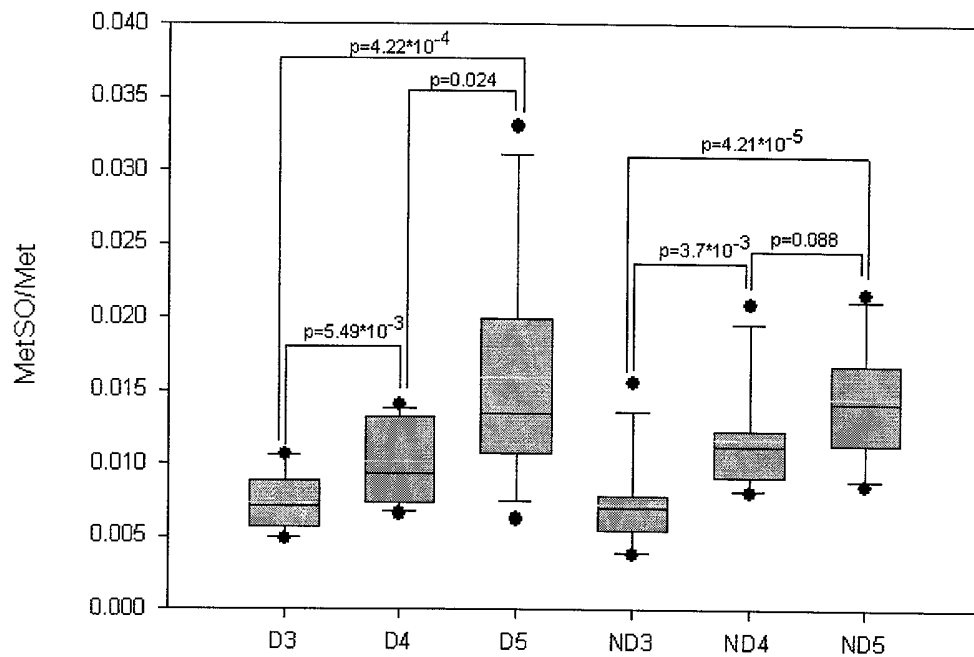


Figura 11:

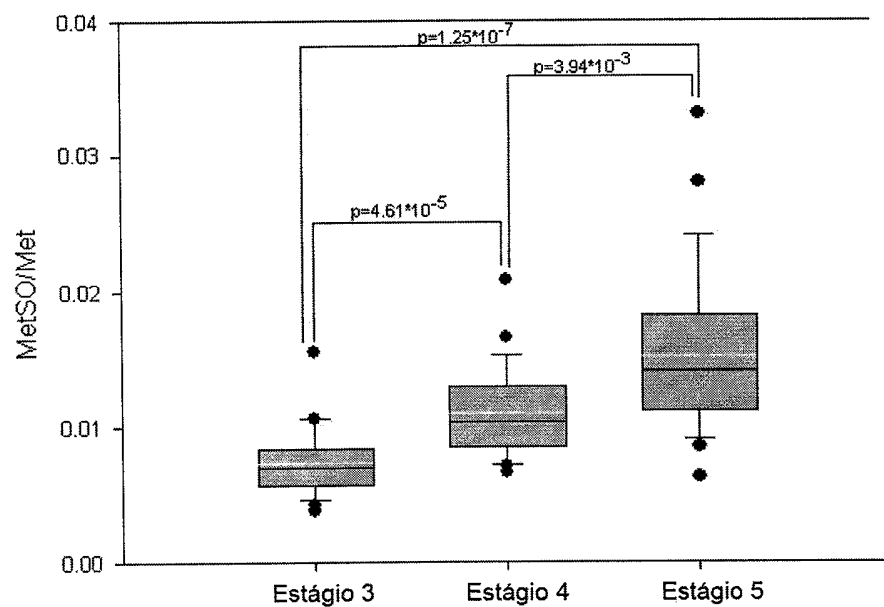


Figura 12:

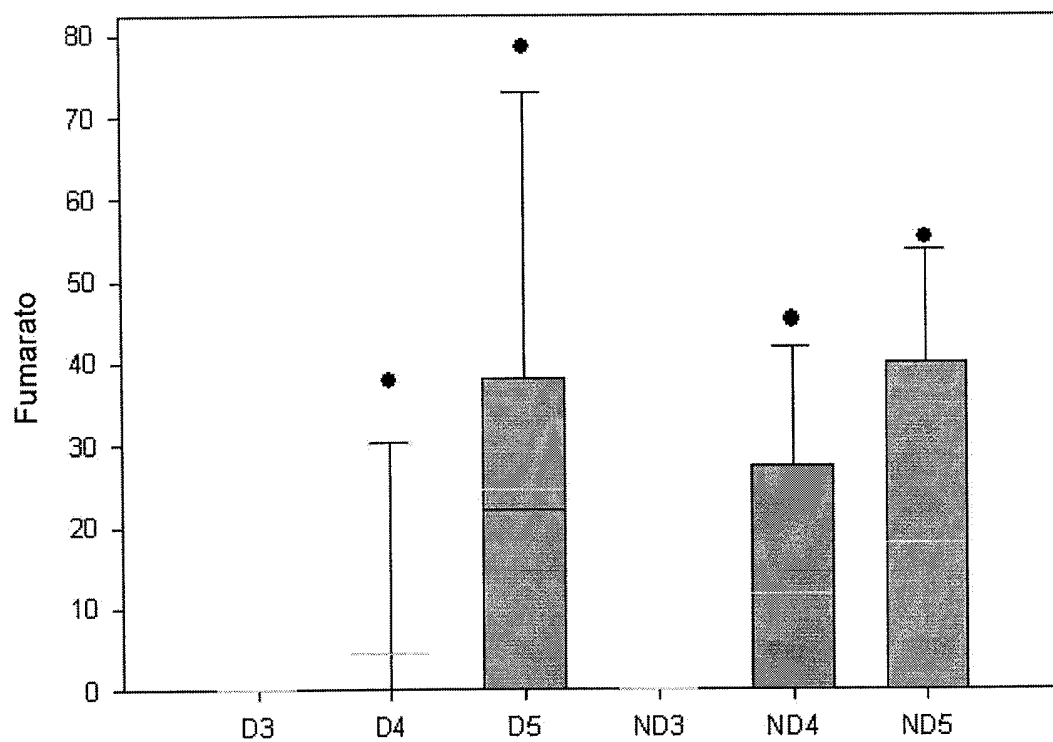


Figura 13:

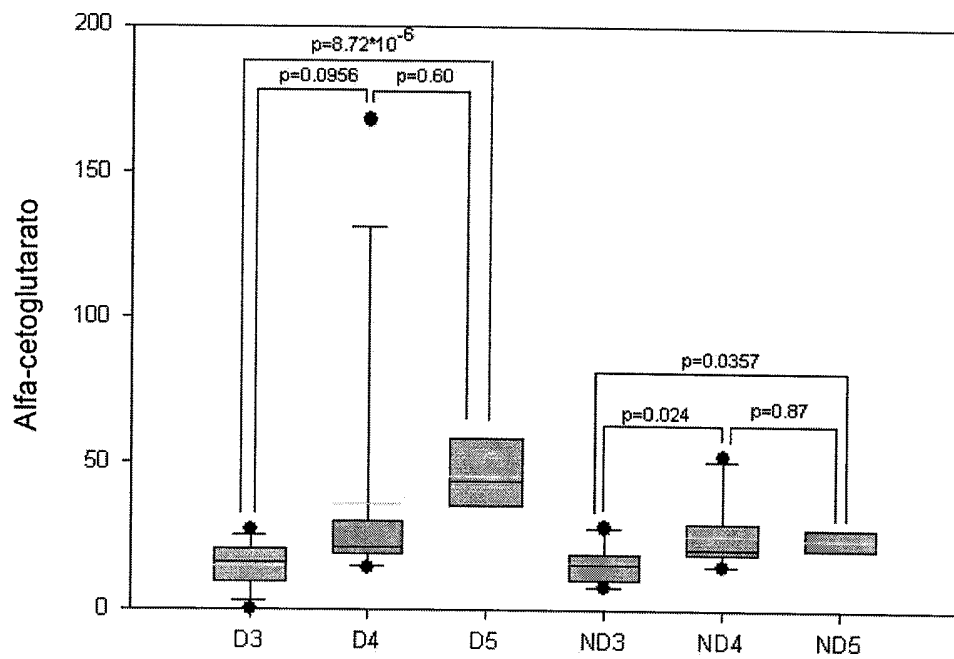
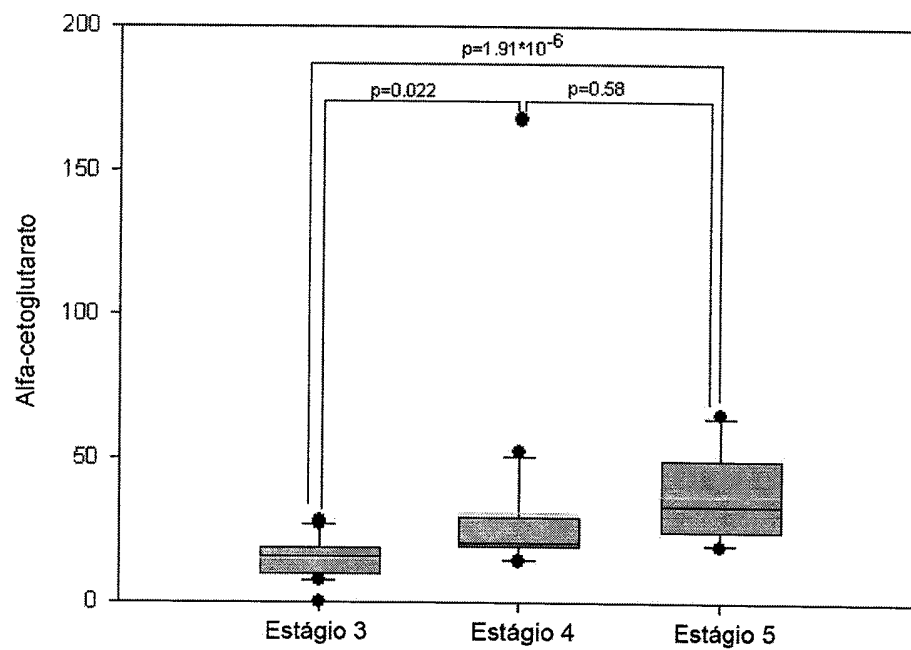


Figura 14:



RESUMO**“NOVOS BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE DOENÇAS NOS RINS”**

A presente invenção está correlacionada a um conjunto biomarcador
5 metabólito para avaliação de doença nos rins, compreendendo pelo menos dois
aminoácidos, pelo menos duas acilcarnitinas e, pelo menos, duas aminas biogênicas.
Além disso, a presente invenção se refere a um método para avaliação de doença nos
rins de um sujeito mamífero, cujo método compreende a obtenção de uma amostra
biológica do sujeito, preferivelmente, sangue e/ou urina, e medição na amostra biológica
10 da quantidade de pelo menos dois aminoácidos, pelo menos duas acilcarnitinas e, pelo
menos, duas aminas biogênicas, assim como, a um kit, adaptado para a realização do
método. Ao empregar os específicos biomarcadores e o método de acordo com a
presente invenção, se torna possível, de um modo mais adequado e confiável, avaliar
doenças nos rins.