



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

**Programa de Doctorado 3139 Medicina  
Departamento de Medicina  
Facultad de Medicina y Odontología**

**Tesis doctoral**

**ESTUDIO METABÓLICO DE LOS EFECTOS DE LA HIPERACETATEMIA  
SECUNDARIA A LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO PRESENTE EN EL  
LÍQUIDO DE DIÁLISIS CONVENCIONAL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD  
RENAL CRÓNICA ESTADIO 5D EN HEMODIÁLISIS EN COMPARACIÓN CON  
UN LÍQUIDO DE DIÁLISIS LIBRE DE ESTE**

Autor

**José Jesús Broseta Monzó**

Director

**Julio Hernández Jaras**

**Valencia, enero 2023**



INFORME DEL DIRECTOR PARA EL DEPÓSITO DE LA TESIS

Director

---

Apellidos y nombre: Julio Hernández Jaras  
N.I.F. 13090183D  
Departamento/Instituto: Servicio de Nefrología  
Centro: Hospital Universitari i Politècnic La Fe

Director de la tesis doctoral: “Estudio metabólico de los efectos de la hiperacetatemia secundaria a la concentración de ácido acético presente en el líquido de diálisis convencional en pacientes con enfermedad renal crónica estadio 5D en hemodiálisis en comparación con un líquido de diálisis libre de este”

de D/Dña. José Jesús Broseta Monzó,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emite informe favorable para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 21 de noviembre de 2022

Fdo.:

Firmado digitalmente  
por JULIO  
HERNANDEZ|JARAS  
Fecha: 2022.11.21  
'11:22:28 +01'00

Julio Hernández Jaras  
Director

ESCUELA DOCTORAL  
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



**a mis padres, Matilde y José Luis**

Por su guía, paciencia y dedicación plena a la formación y cuidado de su hijo. Espero seguir siempre despertando su orgullo y mereciendo su cariño.

**a mis abuelos, Matilde, Jesús, Esperanza y Pepe**

Cuyo recuerdo guardo siempre conmigo. Cuánto más pude haber aprendido de ellos si no se hubieran ido.

**a mi tía abuela Amelia y mi tía Salud**

Cuyas historias de hospital, que he escuchado desde muy pequeño, despertaron mi vocación.

**a Míriam**

Compañera de vida para la que no hay palabras suficientes que puedan transmitir su enorme apoyo y todo lo bueno que saca de mí.



## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría mostrar mi más sincero y merecido agradecimiento a todos aquellos que me han ayudado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

Julio Hernández Jaras, mi director, quien no solo me ha guiado y transmitido sus conocimientos a lo largo de este camino, sino que siempre ha sido fuente de consejo y sabiduría.

Marta Roca Marugán, responsable de la Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, así como el resto de su equipo. Su paciencia y diligencia han hecho posible el entendimiento necesario para llevar a cabo este proyecto.

María Pilar Sánchez Pérez, Amparo Soldevila Orient y Ramón Devesa Such, los adjuntos que forman la Sección de Enfermedad Renal Crónica y Terapia Renal Sustitutiva del *Hospital Universitari i Politècnic La Fe* y me acompañaron y orientaron en mi formación como nefrólogo en estas áreas y en el desarrollo de este proyecto.

Inma Teruel Vivo y resto del equipo de enfermería de la Unidad de Hemodiálisis del *Hospital Universitari i Politècnic La Fe*, cuya colaboración y entusiasmo desinteresados han sido vitales para conseguir realizar este trabajo de investigación.

Luis Carlos López Romero y Aina Gómez Bori, miembros de la Unidad de Investigación de Nefrología del *Hospital Universitari i Politècnic La Fe*, porque su amistad y apoyo me han ayudado a levantarme de los tropiezos y empujado hacia la consecución de la meta de este camino.

José Fernando Gómez Alonso, cuyo generoso apoyo permitió poner en marcha este proyecto.

Sergio Bea Granell, mi mentor durante la residencia y, hoy, gran amigo, cuyos consejos me han guiado y acompañado en mi devenir académico y profesional, pero también en el personal.

Alba Cerveró Rubio, por su apoyo incondicional durante todo el período de Formación Sanitaria Especializada y asesoríaa cardiológica de esta Tesis Doctoral. Juntos nos lanzamos, sin saber bien dónde nos metíamos, en esta aventura que representan los Estudios de Doctorado.

Diana Rodríguez Espinosa y Elena Cuadrado Payán, que me han ayudado enormemente en la redacción de los artículos científicos que se recogen en esta Tesis Doctoral. Sus acertadas preguntas e ilusión por el ejercicio de la Medicina fueron fuente de crecimiento personal y profesional cuando era su adjunto y cuya amistad es, actualmente, el principal apoyo en las dificultades del día a día.

Es justo agradecer también a los pacientes de la Unidad de Hemodiálisis del *Hospital Universitari i Politènic La Fe* que aceptaron participar altruistamente en este proyecto de investigación, con la mera ilusión de colaborar para mejorar la calidad de vida y los resultados en salud de todos los pacientes renales.

En segundo lugar, mi reconocimiento a la *Universitat de València* y al *Hospital Universitari i Politènic La Fe*, instituciones que acogieron a un adolescente ilusionado que se adentraba en un camino desconocido y lo convirtieron en el médico que hoy soy. Así mismo, quiero agradecer al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, cuyo apoyo mediante el Programa Doctor-Residente, junto a las anteriores dos instituciones, plantó la semilla de este trabajo.



En tercer lugar, mi gratitud a todas las personas que me han guiado o marcado en mi vida académica y profesional:

A todos mis profesores de la *Facultat de Medicina i Odontologia* de la *Universitat de València* y adjuntos que me han tutorizado durante mi Formación Sanitaria Especializada en el *Hospital Universitari i Politècnic La Fe*, algunos de ellos ya nombrados, quienes han tenido la paciencia de enseñarme, se han implicado en corregir mis errores y me han hecho crecer como médico y como persona.

Merece una mención especial José Luis Moll Guillén, cuya forma de ejercer la Medicina, con tanto humor como rigurosidad científica, me lanzó a embarcarme en esta especialidad.

Al Colegio El Armelar y sus profesores, que en mi infancia me inculcaron los valores de servicio y vocación que me han convertido en la persona que hoy soy.

A todos mis profesores de música, la otra gran ruta académica de mi vida. Sus consejos, inspiración y el desarrollo creativo que me inculcaron se reflejan en mi trabajo y forma de entender la vida.

A mi familia y amigos, que me acompañan en cada decisión y me estimulan para alcanzar cada meta personal y profesional.

Por último, al *Hospital Clínic de Barcelona*, centro donde actualmente ejerzo la Medicina, y a sus profesionales, especialmente a aquellos que me acompañan en el día a día en la Sección de Diálisis y la Unidad de Insuficiencia Cardíaca. Nombrar a cada uno extendería demasiado estas páginas, pero todos ellos hacen de mi mejor médico y persona.



# Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	XV
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	XVI
RESUMEN	XVII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La hemodiálisis: aproximación histórica	3
1.2 La hemodiálisis: principios biofísicos	6
1.3 El líquido de diálisis	10
1.4 Metabolismo del acetato	17
1.5 Alternativas al acetato: diálisis con lactato	19
1.6 Alternativas al ácido acético: diálisis sin ácido débil	20
1.7 Alternativas al ácido acético: sustitución por clorhídrico	22
1.8 Alternativas al ácido acético: sustitución por cítrico	23
1.9 Metabólica	32
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
2.1 Hipótesis de trabajo	41
2.2 Objetivos	42
CAPÍTULO 3. PUBLICACIONES	45
3.1 Primera publicación	47
3.2 Segunda publicación	51
3.3 Tercera publicación	55

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN	59
4.1 El balance de calcio y el metabolismo mineral-óseo	61
4.2 Biomarcadores de daño miocárdico	62
4.3 El perfil inflamatorio	63
4.4 El ciclo TCA	64
4.5 Glucólisis y metabolismo anaerobio	68
4.6 Metabolismo de los ácidos grasos	70
4.7 Cetogénesis	74
4.8 Metabolismo de aminoácidos	74
4.9 Toxinas urémicas	77
4.10 Otras variables medidas	79
4.11 Limitaciones	80
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	83
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA	89
CAPÍTULO 7. ANEXOS	109

## Índice de figuras

IMAGEN 1.	Esquema del paso de la sangre y del líquido de diálisis en el filtro de hemodiálisis durante el tratamiento.	7
IMAGEN 2.	Esquema de un circuito de hemodiálisis que muestra los principales elementos necesarios en el tratamiento.	9
IMAGEN 3.	Distribución de especies carbonatadas en función del pH.	12
IMAGEN 4.	Metabolismo del acetato en la célula humana.	18
IMAGEN 5.	Metabolismo del lactato en la célula humana.	20
IMAGEN 6.	Esquema de tratamiento de la biofiltración libre de acetato.	21
IMAGEN 7.	Efecto quelante del citrato sobre el calcio y la inhibición consecuente de la cascada de la coagulación a diferentes niveles.	27
IMAGEN 8.	Modelo propuesto para la activación del complemento en hemodiálisis.	28
IMAGEN 9.	Sistema del complemento.	29
IMAGEN 10.	Metabolismo del citrato en la célula humana.	31
IMAGEN 11.	Representación esquemática de la cascada ómica y los diferentes aspectos estudiados en cada área de investigación.	33
IMAGEN 12.	Representación esquemática del flujo de trabajo en ciencias ómicas.	35
IMAGEN 13.	Ciclo de los ácidos tricarbónicos, del ácido cítrico o de Krebs.	65
IMAGEN 14.	Metabolismo de lípidos.	71
IMAGEN 15.	Papel del sistema de las carnitinas en el metabolismo de lípidos.	72
IMAGEN 16.	Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada.	75

## Glosario de abreviaturas

En esta Tesis Doctoral se han utilizado los pares conjugados ácido débil-base (por ejemplo, ácido acético/acetato o ácido cítrico/citrato) como sinónimos, ya que la ionización de estos ácidos es completa a pH fisiológico.

<b>Acetil-CoA</b>	Acetilcoenzima A	<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
<b>AFB</b>	Biofiltración libre de acetato	<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato	<b>K</b>	Potasio
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato	<b>Mg</b>	Magnesio
<b>BCAAs</b>	Aminoácidos de cadena ramificada	<b>Na</b>	Sodio
<b>Ca</b>	Calcio	<b>NAD</b>	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
<b>Cl</b>	Cloro	<b>NIDDK</b>	Instituto Nacional de la Diabetes y las Enfermedades Digestivas y Renales
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono	<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>CoA</b>	Coenzima A	<b>pCO<sub>2</sub></b>	Presión parcial de dióxido de carbono
<b>ERC</b>	Enfermedad renal crónica	<b>PHF</b>	Hemofiltración acoplada
<b>ERT</b>	Enfermedad renal terminal	<b>pKa</b>	Constante de disociación ácida
<b>FAD</b>	Flavín adenín dinucleótido	<b>PP</b>	Pirofosfato
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico	<b>PTH</b>	Parathormona
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Bicarbonato	<b>Q<sub>B</sub></b>	Flujo sanguíneo
<b>HD</b>	Hemodiálisis	<b>Q<sub>D</sub></b>	Flujo del líquido de diálisis
<b>HDF</b>	Hemodiafiltración	<b>Q<sub>I</sub></b>	Flujo de infusión
<b>HFR</b>	Reinfusión de hemofiltrado	<b>ROS</b>	Radicales libres de oxígeno
<b>hsCRP</b>	Proteína C ultrasensible	<b>TCA</b>	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
<b>hsTNT</b>	Troponina T ultrasensible	<b>TMAO</b>	N-óxido de trimetilamina

## Resumen

En la actualidad, el líquido de diálisis convencional incluye acetato para conseguir su estabilidad química, es decir, para evitar la precipitación de sales de bicarbonato cálcico o magnésico. Esa concentración de acetato, 3-4 mmol/L, que no superaría la capacidad metabólica del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), desencadena, sin embargo, consecuencias clínicas indeseables por mecanismos no bien dilucidados. Su sustitución por citrato se postula como una mejor alternativa, tanto por evitar la hiperacetatemia, como por sus efectos pleiotrópicos.

En este estudio prospectivo y cruzado se evaluaron los efectos de la hiperacetatemia, al comparar un líquido de diálisis con acetato con uno con citrato, con tres enfoques. Se evaluaron los efectos sobre inflamación, daño miocárdico, balance de calcio y metabolismo mineral óseo. Se realizó metabolómica dirigida para investigar cambios en el metabolismo intermedio. Y metabolómica no dirigida para identificar metabolitos que pudieran explicar de una manera bioquímica los resultados clínicos descritos.

Los resultados muestran que el citrato representa una opción más biocompatible, en términos de mejor perfil inflamatorio y balance aparentemente neutro de calcio; que en la diálisis se produce cetogénesis y se inhibe la degradación de lípidos y aminoácidos; y que se identifican algunos metabolitos cuyas concentraciones difieren con el uso de un líquido u otro, lo que genera hipótesis que podrían, en futuras investigaciones, desvelar los mecanismos implicados en los beneficios del citrato.

## Abstract

Currently, conventional dialysis fluid includes acetate to achieve chemical stability, i.e. to avoid the precipitation of calcium or magnesium bicarbonate salts. This concentration of 3-4 mmol/L of acetate, which would not exceed the metabolic capacity of the tricarboxylic acid (TCA) cycle, nevertheless triggers undesirable clinical consequences by mechanisms that are not well elucidated. Its substitution by citrate is postulated as a better alternative for avoiding hyperacetatemia and its pleiotropic effects.

In this prospective crossover study, the effects of hyperacetatemia were evaluated by comparing acetate and citrate dialysates from three approaches: the effects on inflammation, myocardial damage, calcium balance and bone mineral metabolism; targeted metabolomics to investigate changes in intermediary metabolism; and untargeted metabolomics to identify metabolites that could explain in a biochemical way the clinical results described.

The results show that citrate represents a more biocompatible option in terms of a better inflammatory profile and apparently neutral calcium balance; that dialysis produces ketogenesis and inhibits the degradation of lipids and amino acids; and that the concentrations of some identified metabolites differ with the use of one liquid or another, which generates hypotheses that could, in future research, reveal the mechanisms involved in the benefits of citrate.







# 1

## Introducción



## 1.1 La hemodiálisis: aproximación histórica

---

Los primeros intentos de tratamiento de la uremia datan de la Roma primitiva y Edad Media y consistían en el uso de baños calientes, saunas, sangrías o enemas. No es hasta finales del siglo XIX cuando empieza la historia de la hemodiálisis (HD). En 1861, el químico escocés Thomas Graham, introdujo en la literatura científica, por primera vez, el término “diálisis” para describir el fenómeno de paso pasivo de solutos de bajo peso molecular y de agua a través de una membrana semipermeable por efecto de la presión osmótica. No era un término acuñado por él, de hecho, la etimología del término “diálisis” proviene del griego antiguo “διάλυσις” (diálusis), cuyo significado era separación, disolución de fuerza o debilidad de los miembros; pero sí le atribuyó el significado que aplicamos hoy en día.

En 1913, John J. Abel, Leonard G. Rowntree y Benjamin B. Turner fueron los primeros científicos en aplicar ese concepto para eliminar sustancias de la sangre de perros anestesiados haciéndola pasar a través de tubos de membranas semipermeables de colodión mediante un aparato que, en dos artículos publicados en 1914, denominaron vividifusor o “riñón artificial”<sup>2</sup>.

Sin embargo, el mérito de realizar la primera sesión de HD en un ser humano, en octubre de 1924 en la Universidad de Giessen, Alemania, lo tiene el médico internista Georg Haas<sup>3</sup>. Esta primera diálisis solo duró 15 minutos, pero posteriormente realizó algunas sesiones más largas, con un efecto terapéutico insignificante dadas las limitaciones técnicas. Estas diálisis se realizaban utilizando hirudina, un anticoagulante descubierto en 1880 que

resultaba caro y provocaba reacciones alérgicas porque no se purificaba adecuadamente y procedía de una especie muy distante de la humana, de hecho, se extraía de la saliva de las sanguijuelas.

A partir de este momento, dos avances técnicos marcaron un punto de inflexión en el tratamiento dialítico. En primer lugar, la disponibilidad de heparina, con la que, en 1928, el propio Haas dializó dos pacientes urémicos demostrando una mejoría clínica temporal. Esta se estandarizaría como anticoagulante en 1937. En segundo, el desarrollo de las membranas de celofán que llevaron a expandir las posibilidades de este tratamiento.

De hecho, el holandés Willem Johan Kolff, a pesar de desarrollar sus primeros prototipos de diálisis bajo la ocupación alemana de su país en la Segunda Guerra Mundial, desarrolló, en 1943, el “riñón artificial rotatorio”, con el que dializó quince pacientes que, desafortunadamente, no sobrevivieron. Sin embargo, en 1945, consiguió que una paciente con fracaso renal agudo, por primera vez, sobreviviera gracias a la diálisis<sup>2</sup>.

Paralelamente, y sin tener conocimiento de los avances entre laboratorios debido a las limitaciones en la comunicación que imponía la guerra, un grupo canadiense de dos cirujanos, Gordon Murray y Edmund Delorme, y el químico Newell Thomas, desarrollaron un riñón artificial con el que, en 1946, realizarían la primera diálisis en norteamérica. En este caso, se realizaron tres sesiones de diálisis que permitieron sostener la vida de una paciente hasta que pudo recuperarse de un fracaso renal agudo<sup>2</sup>.

En 1947, el sueco Nils Alwall describió un dializador modificado que podía combinar mejor diálisis y ultrafiltración como consecuencia de que las membranas de celofán utilizadas en estos podían soportar una mayor presión y estaban en un cilindro herméticamente cerrado para poder generar diferentes relaciones de presión. Otro gran avance en este campo fueron los dializadores de placas que, en lugar de bombear la sangre a través de tubos membranosos, dirigían el flujo de la solución de diálisis y la sangre a través de capas alternas de material membranoso en los que, por primera vez, se emplea una nueva membrana de celulosa regenerada con cuproamónio (cuprophán), de mayor porosidad para los solutos y el agua que los materiales usados hasta entonces. Pero, el gran paso adelante fue el desarrollo, en 1964, del primer dializador de fibra hueca que sustituyó los hasta entonces tradicionales tubos membranosos y membranas planas y cuyo principio se mantiene en los dializadores de hoy en día <sup>45</sup>.

En el campo del acceso vascular, el estadounidense Belding Hibbard Scribner, en 1960, inventó la que se conocería como fístula Scribner. Implantaba quirúrgicamente una cánula de teflón en una vena y otra en una arteria que se unían en un cortocircuito circulatorio o, para realizar la diálisis, se conectaban al dializador. A través de esta, el primer paciente en programa crónico de HD consiguió sobrevivir once años. Más tarde, en 1966, Michael Brescia y James Cimino empezaron a realizar el procedimiento quirúrgico de las fístulas internas nativas, aún utilizadas hoy en día.

A partir de 1965, con el éxito conseguido por estos primeros tratamientos, surge un creciente interés de la industria por la diálisis. Se desarrollan y

producen en gran número monitores y nuevas membranas enfocadas al aclaramiento de sustancias de mayor peso molecular, lo que, a mediados de los años setenta del siglo XX, llevó al desarrollo de membranas más porosas, obtenidas a partir de materiales sintéticos o de la modificación de las membranas de celulosa<sup>4</sup>. Estos avances han permitido llegar al tratamiento de HD de la actualidad.

## 1.2 La hemodiálisis: principios biofísicos

---

El principio fisicoquímico principal por el que funciona la HD es el transporte difusivo, que consiste en el intercambio de sustancias entre la sangre urémica y el líquido de diálisis a través de una membrana semipermeable, el dializador, por el gradiente osmótico (IMAGEN 1). Cada soluto, de forma independiente al resto, atravesará los poros del dializador, siempre que su tamaño no supere el diámetro de estos (habitualmente los dializadores están contruidos para no superar el punto de corte de la masa molecular de la albúmina, que es de 67 kDa), para pasar desde la sangre urémica, que circula dentro de las fibras huecas o capilares, hacia el líquido de diálisis, que circula por la parte exterior de dichas fibras y en sentido opuesto para mantener el gradiente de concentración a lo largo de todo el capilar, o viceversa, dependiendo de la diferencia de concentraciones entre ambos compartimentos<sup>6</sup>. Este transporte difusivo confiere una alta capacidad de eliminación de toxinas urémicas de pequeño tamaño (< 10 kDa), pero, no alcanza una depuración óptima de toxinas de mediano a gran peso molecular (10 – 50 kDa).



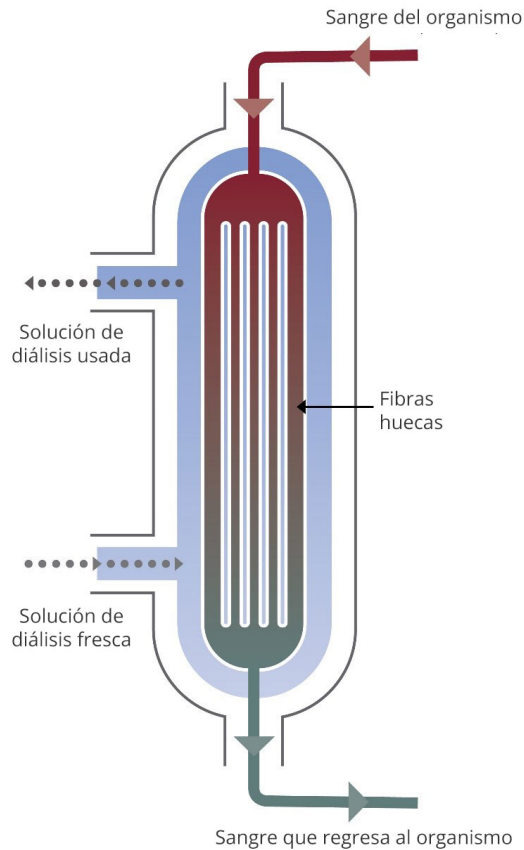


IMAGEN 1. Esquema del paso de la sangre y del líquido de diálisis en el filtro de hemodiálisis durante el tratamiento. Reproducido de Hemodiálisis | Instituto Nacional de la Diabetes y las Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK, por sus siglas en inglés), (<https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-rinones/insuficiencia-renal/hemodialisis>). CC BY.

Además, se produce la ultrafiltración, que no es más que la eliminación del exceso de líquido que hay entre el peso seco o teórico y el que se mide en el paciente justo antes del inicio de la sesión. Para ello se aplica presión hidrostática en el compartimento sanguíneo para que el volumen de agua plasmática deseado pase desde este hacia el del líquido de diálisis.

Para alcanzar una mayor eficacia depurativa, sobre todo en lo que concierne a toxinas de tamaños moleculares mayores, se han desarrollado diferentes técnicas. Entre ellas destaca la hemodiafiltración (HDF) en línea, que busca optimizar al máximo el mecanismo utilizado en la ultrafiltración. El gradiente de presión hidrostática entre ambos compartimentos permite, por un mecanismo conocido como transporte convectivo, el paso de solutos desde el compartimento sanguíneo hacia el líquido de diálisis a través del dializador junto con su solvente, el agua plasmática. Posteriormente, se utilizará el propio líquido de diálisis para reponer el volumen extra de ultrafiltrado. Este extra de ultrafiltración del agua plasmática se puede medir mediante el flujo de infusión (Q<sub>I</sub>) y se recomienda que no supere el 33% del flujo sanguíneo (Q<sub>B</sub>), es decir, que la fracción de filtración no supere este porcentaje. El estudio ESHOL reportó una mayor supervivencia de los pacientes que recibieron HDF en línea en comparación con HD<sup>7</sup>. Este aumento está en relación con el volumen convectivo alcanzado en la sesión<sup>8</sup>, habiéndose establecido un objetivo mínimo de 21 litros de sustitución para alcanzar una mejoría en la supervivencia<sup>9</sup>. Esto hace que la HDF en línea se postule como el nuevo estándar de tratamiento de HD<sup>10</sup>.

Aunque, más recientemente, se han desarrollado unas membranas con un diámetro del poro aumentado (denominadas en inglés, *medium cut-off*), que permiten optimizar el paso de moléculas de mayor tamaño a través de estos mediante el transporte difusivo. A esta nueva técnica de diálisis se la ha llamado HD extendida<sup>8</sup>.

Para llegar al dializador, la sangre es extraída del paciente mediante un acceso vascular, ya sea una fístula arteriovenosa nativa o protésica o un catéter venoso central temporal (percutáneo) o permanente (tunelizado). Desde allí, por medio de una bomba sanguínea que permite pautar el  $Q_B$ , aproximadamente de 250 – 500 mL/min. La sangre es, por medio de esta bomba, llevada a través de las líneas de diálisis hacia el dializador, donde se producen los mecanismos previamente expuestos. Desde allí, la sangre continúa de vuelta hacia el paciente (IMAGEN 2).

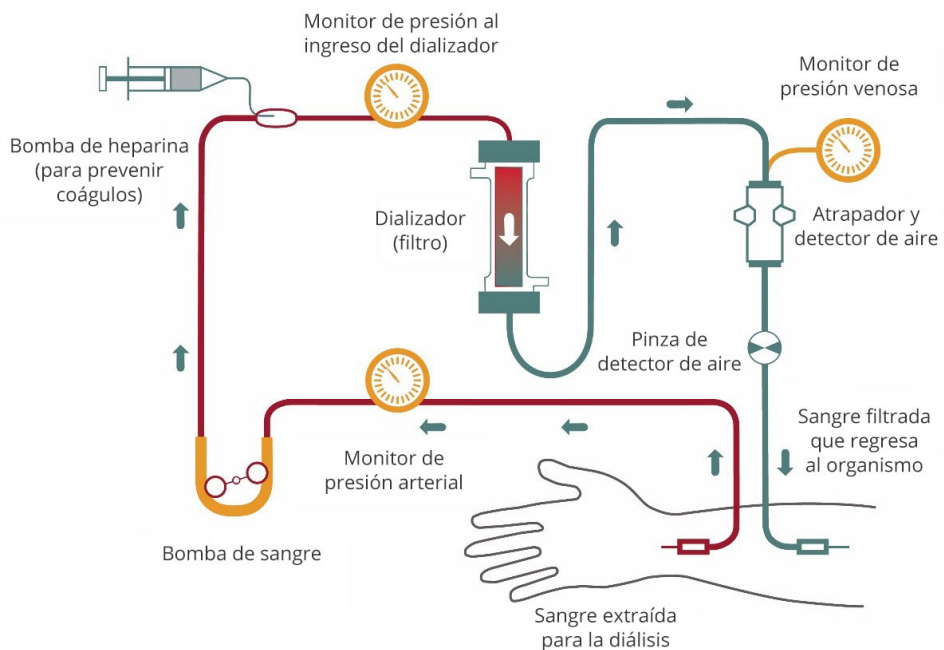


IMAGEN 2. Esquema de un circuito de hemodiálisis que muestra los principales elementos necesarios en el tratamiento. Reproducido de Hemodiálisis | Instituto Nacional de la Diabetes y las Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK, por sus siglas en inglés), (<https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-rinones/insuficiencia-renal/hemodialisis>). CC BY.

En este proceso, hay una serie de biosensores que buscan conseguir dos objetivos. Por un lado, mantener la máxima seguridad, en términos de maximizar la tolerancia hemodinámica y evitar la aparición de potenciales complicaciones durante el tratamiento como son el embolismo gaseoso, la desconexión accidental de las líneas o la hemólisis. Por otro, que el tratamiento de diálisis alcance la mayor eficacia en dosis de diálisis y litros de sustitución. En este sentido, los principales determinantes de la eficacia de la diálisis son el  $Q_B$ , flujo del líquido de diálisis ( $Q_D$ ), superficie del filtro y, sobre todo, el tiempo de diálisis.

### 1.3 El líquido de diálisis

---

La función del líquido de diálisis es corregir la composición de la sangre urémica devolviendo los niveles de sus componentes a cifras fisiológicas, tanto reduciendo la concentración de toxinas urémicas como corrigiendo las anomalías electrolíticas y del equilibrio ácido-base<sup>11</sup>. Esto hace que la composición del líquido de diálisis sea tan relevante como el dializador, el tiempo de tratamiento, la modalidad de diálisis, el  $Q_B$  o el  $Q_D$ <sup>11-13</sup>. No en vano, las concentraciones óptimas de varios de los componentes del líquido de diálisis, para mantener o restaurar el medio interno, son objeto de discusión todavía. Es el caso de los cuatro cationes (sodio [Na], potasio [K], calcio [Ca] y magnesio [Mg]) y dos aniones (bicarbonato [ $HCO_3^-$ ] y cloro [Cl]) más importantes en el medio extracelular<sup>11-20</sup>.

Precisamente, el líquido de diálisis permite uno de los objetivos principales de la HD, la corrección de la acidosis metabólica que produce la uremia. En el paciente en HD, el metabolismo proteico genera un balance positivo a consecuencia de la imposibilidad de excretar amonio en orina, que lleva, a su vez, a una reducción de la concentración sérica de bicarbonato<sup>21</sup>. Además, la HD no permite la retirada de gran cantidad de hidrogeniones, por lo que la regeneración del bicarbonato durante el tratamiento se realiza mediante la ganancia de bases<sup>22</sup>.

En la actualidad, el líquido de diálisis utilizado en nuestro medio contiene un concentrado de bicarbonato de 32-35 mmol/L como fuente para la ganancia de bases y, en definitiva, la corrección del equilibrio ácido-base. Esto hace que uno de los aspectos más desafiantes de la producción de líquidos de diálisis sea permitir la coexistencia de una solución de cationes divalentes (calcio y magnesio) y bicarbonato sin precipitación<sup>12</sup>.

Para cuantificar la tendencia que tienen las moléculas a disociarse en una solución acuosa contamos con la constante de disociación ácida (pKa). Esta constante, que depende de otros factores como la temperatura o el pH, es una medida cuantitativa de la fuerza de un ácido o una base en disolución. La ecuación de Henderson-Hasselbalch define la relación entre el pH y las concentraciones de un ácido y una base conjugados.

$$pH = pKa + \log \frac{[base\ conjugada]}{[ácido\ conjugado]}$$

Al inicio de la diálisis, en los años cuarenta del siglo XX, se empezó utilizando el bicarbonato sódico como fuente de bases para corregir la acidosis de los pacientes junto con diferentes cloruros, en particular de sodio y de calcio<sup>12</sup>. Por ello es de particular interés el caso de las especies carbonatadas (IMAGEN 3). Cuando el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) se disuelve en agua, da lugar a las siguientes reacciones de equilibrio con las correspondientes pKa, que se anotan en condiciones de temperatura y pH fisiológicos.

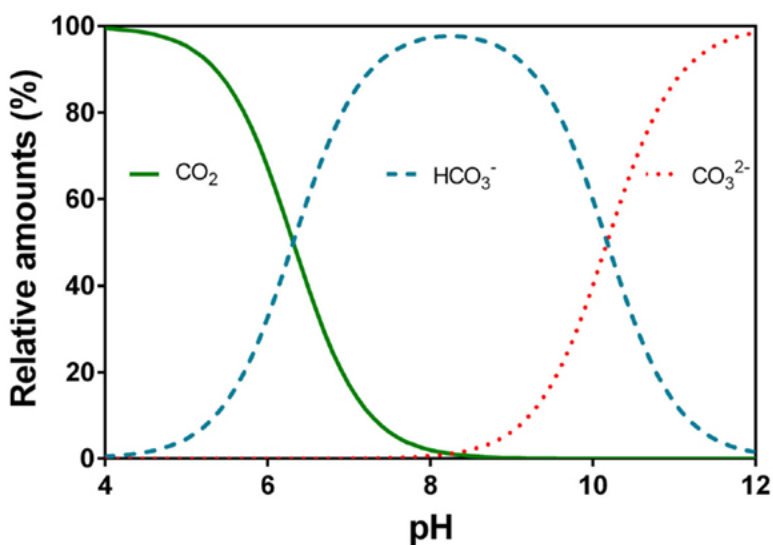
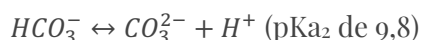
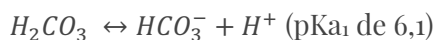
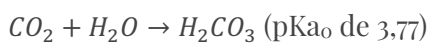
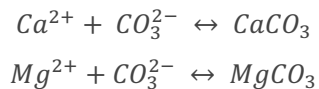


IMAGEN 3. Distribución de especies carbonatadas en función del pH. El ejemplo dado es a 20°C y conductividad eléctrica de 250  $\mu$ S/cm y con una pKa<sub>1</sub> de 6,532 y una pKa<sub>2</sub> de 10,329. Reproducido de Pedersen O, Colmer TD, Sand-Jensen K. Underwater photosynthesis of submerged plants – recent advances and methods. *Front Plant Sci.* 2013;4:140. CC BY 3.0.



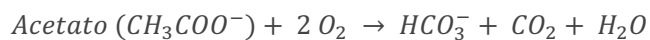
El pH de la mezcla del líquido de diálisis alcanzaba un valor suficientemente alto como para que se produjera la segunda disociación del ácido carbónico, con lo que el anión carbonato en unión con las sales de los cationes divalentes precipitaban.



En aquel momento se decidió evitar, o al menos minimizar, esta precipitación mediante el borboteo y disolución en el baño de diálisis de una cantidad de CO<sub>2</sub> suficiente para bajar el pH a 7,4.

En 1964, el nefrólogo francés Charles Mion, durante una estancia formativa en el laboratorio de Scribner, descubrió que la sustitución del bicarbonato de sodio por acetato de sodio evitaba la precipitación de estas sales de calcio y magnesio<sup>23</sup>. Esta solución constituyó un progreso remarcable en la HD.

El acetato de sodio se metaboliza, principalmente en músculo e hígado, en bicarbonato de forma equimolar, por lo que, *a priori*, constituye un precursor de bicarbonato estable y económico<sup>12</sup>.



Este metabolismo se explica según el modelo cinético de Michaelis-Menten, según el cual, la velocidad de reacción máxima se alcanzaría a una concentración de 2-3 mmol/L de acetato, lo que implica que niveles

superiores de acetato no se transformarán en bicarbonato, sino que se acumularán. De hecho, las concentraciones utilizadas de acetato de sodio, de 35 – 45 mmol/L, llevaba a una hiperacetatemia con valores en plasma, al finalizar la sesión, de hasta 15 mmol/L, muy superiores a los fisiológicos (<0,15 mmol/L)<sup>12,24-26</sup> y, por ello, hasta pasadas cuatro horas posdiálisis, no se alcanzaba el pico máximo de concentración de bicarbonato<sup>22,27</sup>.

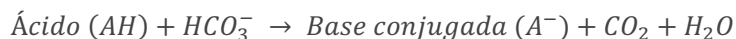
El resultado durante la diálisis era el de una mayor tasa de eliminación que de generación de bicarbonato intradiálisis, dado que por gradiente de concentración la pérdida de bicarbonato desde el compartimento sanguíneo hacia el líquido de diálisis era muy elevada, con el consecuente descenso de los niveles de este<sup>12</sup> sumado a una pérdida de otros aniones orgánicos como el lactato, el citrato o el  $\beta$ -hidroxibutirato que representan una pérdida de base potencial que equivaldría a una generación equimolar de hidrogeniones<sup>22</sup>.

El perfeccionamiento de la técnica de HD, el aumento de QB gracias a las mejoras en los accesos vasculares y la inclusión de pacientes con mayor limitación para el metabolismo del acetato, es decir, de edades más avanzadas, desnutridos o diabéticos<sup>28</sup>, junto al desarrollo tecnológico, hicieron que el uso del bicarbonato en el líquido de diálisis no fuera tan engorroso<sup>29</sup>, llevó a que, en los años ochenta del siglo XX, la diálisis con acetato se abandonara en favor de la HD con bicarbonato<sup>30</sup>.

Este retorno al uso de bicarbonato como fuente principal de ganancia de bases traía de vuelta el problema de la estabilidad química. Para evitar la



precipitación de sales, se optó por dos mecanismos. El primero fue separar el líquido de diálisis en dos concentrados: el llamado concentrado ácido, que contiene las soluciones de cloruros de sodio, potasio, calcio y magnesio, y otro concentrado que contiene bicarbonato sódico en polvo, de forma que la mezcla se hace directamente en el monitor, lo que evita la precipitación. El segundo, el aporte de un ácido débil a modo de sistema tampón que genera CO<sub>2</sub> disuelto y, así, evita que se alcance la segunda disociación del bicarbonato y su consecuente precipitación<sup>12</sup>.



Ya que el acetato de sodio se había utilizado como componente principal del líquido de diálisis, parece lógico que el ácido débil escogido fuera justamente el ácido acético (con una pKa de 4,76), esta vez a concentraciones de 3-4 mmol/L, cifras mucho menores que conferirían seguridad, ya que no parecen superar la tasa de metabolismo máxima de acetilcoenzima A (acetil-CoA) del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs (TCA), que cae desde los 300 mmol/h (4,5 mmol/Kg/h) en sujetos sanos a 150-250 mmol/h (2,5-3,5 mmol/Kg/h) en pacientes en HD<sup>28,30-32</sup>.

La concentración de CO<sub>2</sub> disuelto suele expresarse bajo la forma de presión parcial de dióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>)<sup>12</sup>.

$$\text{CO}_2 = 0,03 \times \text{pCO}_2$$

El uso habitual de 4 mmol/L de acetato hace que la medida a la salida del dializador sea unos 20 mmHg mayor que la pCO<sub>2</sub> arterial<sup>29</sup>, lo que correspondería a una ganancia aproximada de 0,6 mmol/L de CO<sub>2</sub>. Gran parte de esa ganancia se metaboliza en bicarbonato por el sistema tampón hemoglobina. El resto, podría mitigar, en parte, el aumento de pH por la elevada concentración de bicarbonato en el líquido de diálisis creando una relativa acidosis respiratoria que se corrige mediante la ventilación<sup>29</sup>. De hecho, el pH es menor a la salida que a la entrada del dializador, una acidificación transitoria que activa la síntesis de bradicininas y óxido nítrico<sup>33</sup>.

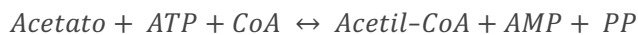
No hay que desdeñar el papel del metabolismo del acetato en la diálisis estándar como generador de bases, ya que el 35% del bicarbonato aportado durante la HD a los pacientes viene del metabolismo del acetato, ya que el 90% del bicarbonato es neutralizado por la generación de hidrogeniones<sup>22,34</sup>.

Parece relevante, pues, para llegar a una HD adecuada, que se mantenga un equilibrio ácido-base tal que la ganancia de bases compense la pérdida de aniones durante las diálisis y la generación de hidrogeniones en el período interdialítico, pero también que los niveles de pH y bicarbonato se mantengan en unos límites razonables tanto en las determinaciones prediálisis como en las posdiálisis. Para ello hay que individualizar el bicarbonato prescrito en el baño, pues la ingesta proteica de cada paciente marca su ganancia neta de ácidos<sup>22,35,36</sup>.

## 1.4 Metabolismo del acetato

---

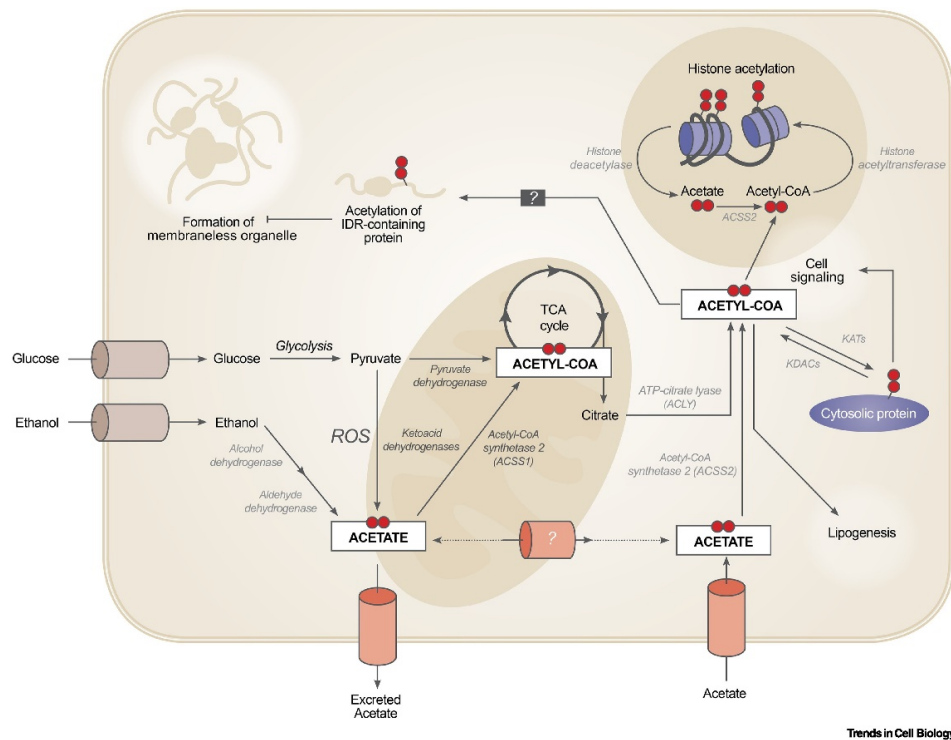
El acetato entra rápidamente en las células y se une a la coenzima A (CoA) para formar la acetil-CoA por medio de la acetil-CoA sintetasa para luego continuar su oxidación en el ciclo TCA. En esta reacción, se consume un hidrogenión, se genera un anión bicarbonato y se consume un adenosín trifosfato (ATP), así como se atrapa un cofactor CoA.



Las consecuencias de esta oxidación del acetato son la caída de la concentración de ATP y acumulación de adenosín monofosfato (AMP) que, tanto por la activación de la óxido nítrico sintetasa como por su desfosforilación a adenosina, llevan a vasodilatación y, con ello, a inestabilidad hemodinámica y mala tolerancia a las diálisis<sup>26</sup>. Además, la acumulación intracelular de pirofosfato (PP) produce la precipitación de pirofosfato cálcico en la mitocondria, lo que juega un papel importante en la calcificación vascular. Y el exceso de acetato produce una depleción del cofactor CoA, necesario para el adecuado funcionamiento del ciclo de TCA<sup>25</sup>, lo que podría llevar a la acumulación de metabolitos intermedios<sup>22,37</sup>.

A pesar de que parece que el metabolismo del acetil-CoA por el ciclo de TCA no se saturaría, de manera independiente, se ha demostrado que se activan otras rutas metabólicas alternativas (IMAGEN 4)<sup>12,38</sup>. Induce el crecimiento y proliferación celulares mediante la acetilación de histonas<sup>39</sup>, la biosíntesis de esteroides y ácidos grasos de cadena larga, o la conversión en cuerpos

cetónicos<sup>40</sup>. Y la interleucina-1 (IL-1), implicada en la inflamación, la activación linfocitaria y la estimulación de la óxido nítrico sintetasa<sup>26</sup>. De hecho, aunque por mecanismos no bien dilucidados, la concentración de acetato en el líquido de diálisis utilizado en la HD convencional actual se ha asociado a diferentes efectos sistémicos indeseables a largo plazo<sup>41-43</sup>.



Trends in Cell Biology

IMAGEN 4. Metabolismo del acetato en la célula humana. Reproducido con permiso de Bose S, Ramesh V, Locasale JW. Acetate Metabolism in Physiology, Cancer, and Beyond. *Trends Cell Biol.* 2019 Sep;29(9):695-703). Todos los derechos reservados por licenciatario.

Por ello, aun cuando la ausencia de inestabilidad hemodinámica a estas concentraciones de acetato y la falta de evidencia científica robusta y largoplacista hacen que siga siendo el ácido débil más utilizado<sup>44</sup>, se han buscado diferentes alternativas, incluyendo el uso de otras modalidades de

diálisis que permiten una mezcla estable sin necesidad de un sistema tampón o el uso de otros agentes acidificantes débiles como los ácidos láctico, pirúvico, clorhídrico o cítrico como alternativa al acetato<sup>12,26</sup>.

## 1.5 Alternativas al acetato: diálisis con lactato

---

Otra opción que se ha explorado es el uso de ácido láctico (pKa de 3,86) como principal componente del líquido, en sustitución del bicarbonato, como fuente de ganancia de bases<sup>45</sup>. Al igual pasa con el acetato, el lactato actúa como precursor del bicarbonato, metabolizándose en hígado y músculo (IMAGEN 5). Sin embargo, su acumulación es más peligrosa, ya que puede provocar acidosis láctica.

Es cierto que, en el contexto de la HD crónica, el lactato presenta ventajas en relación con el acetato en términos de reducción de los síntomas y mayor estabilidad hemodinámica, pero no iguala los resultados alcanzados por el bicarbonato y, además, genera hipoxemia como el acetato<sup>45,46</sup>. De hecho, al compararlo con bicarbonato en el contexto de terapias de reemplazo renal continuas en unidades de cuidados intensivos, el lactato se ha relacionado con el desarrollo de más eventos cardiovasculares y una peor estabilidad hemodinámica, por lo que su uso se ha desaconsejado<sup>47,48</sup>. Sin embargo, la pertinencia de estas terapias continuas como modelo para la HD crónica es limitada, en particular debido a la diferente dosis acumulada y al patrón de exposición. Hoy en día, el líquido de diálisis con lactato como componente

principal es el más extendido en HD domiciliaria, si bien es cierto que utiliza bajos QD que impactarían en una menor ganancia de lactato<sup>49</sup>.

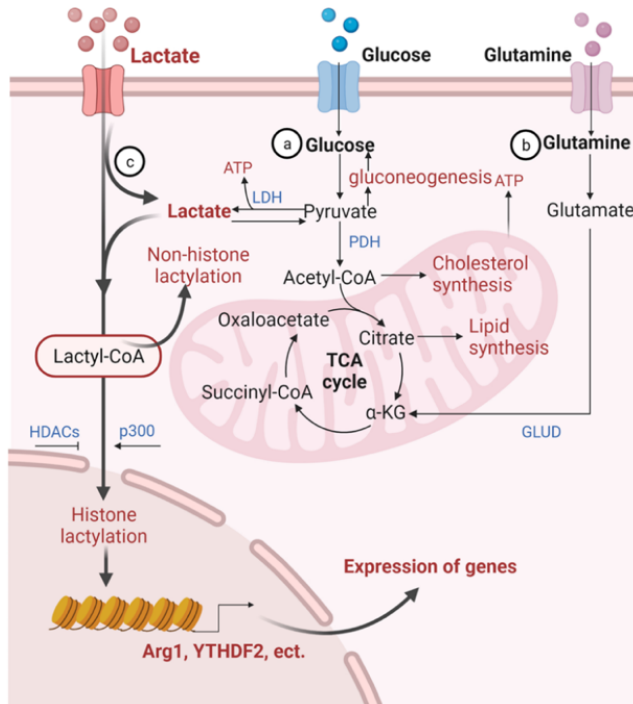


IMAGEN 5. Metabolismo del lactato en la célula humana. Reproducido de Li X, Yang Y, Zhang B, et al. Lactate metabolism in human health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):305. CC BY 4.0.

## 1.6 Alternativas al ácido acético: diálisis sin ácido débil

Se han utilizado, también, algunas técnicas para evitar el uso de acetato, y de cualquier otro ácido débil, en el líquido de diálisis. Es el caso de la biofiltración libre de acetato (AFB), una variante de HDF, en que el líquido de diálisis al que se enfrenta la sangre urémica en el filtro no contiene un tampón para corregir la acidosis, sino que la ganancia de bases se consigue

mediante la infusión intravenosa de bicarbonato<sup>12,50</sup>, lo que hace que la corrección del equilibrio ácido-base sea sencilla y controlable. La disponible en nuestro medio utiliza bicarbonato sódico 1/6 M como reposición en posdilución (o posfiltro), con un requerimiento de 1,5 – 2 L/hora (IMAGEN 6).

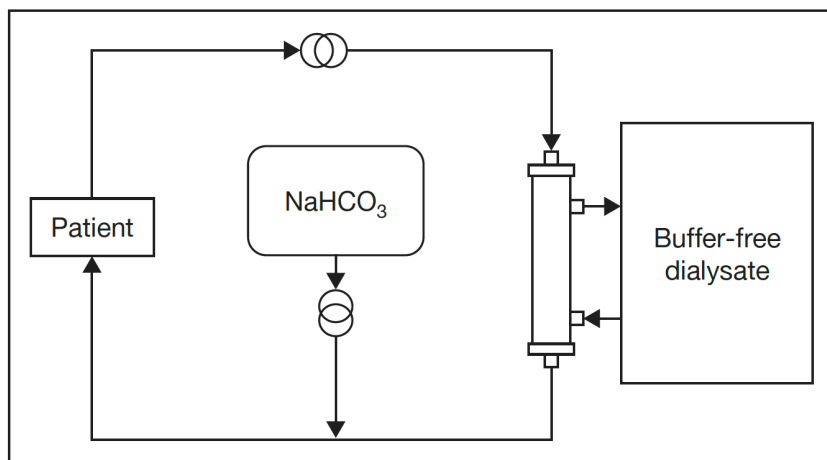


IMAGEN 6. Esquema de tratamiento de la biofiltración libre de acetato. Reproducido con permiso de Santoro A, Guarnieri F, Ferramosca E, et al. Acetate-Free Biofiltration. *Contrib Nephrol.* 2007;158:138-152. Todos los derechos reservados por licenciatario.

Esta técnica ha demostrado prevenir la hiperacetatemia y restablecer la homeostasis interna con una menor producción de metabolitos intermedios<sup>37,38</sup>, lo que se traduce en una mejor tolerancia hemodinámica<sup>51</sup>, mejor perfil inflamatorio<sup>52</sup>, así como una mejora en la calidad de vida, el equilibrio ácido-base y la dosis de diálisis<sup>53-55</sup>.

La superioridad de la HDF en línea en términos de supervivencia, además del mayor coste y dificultad logística en afinar la modelización de las transferencias de solutos, hacen que el uso de estas técnicas de diálisis sin

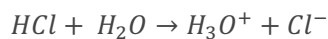
acetato ni otro ácido no esté muy extendido<sup>12</sup>. Sin embargo, con el uso de las técnicas convectivas, el aporte de acetato respecto a la HD convencional es mucho mayor<sup>32,43</sup>, por lo que la posibilidad de disponer de un líquido con un ácido débil alternativo en lugar de acetato es muy atractiva, disponiendo en la actualidad de dos propuestas.

## 1.7 Alternativas al ácido acético: sustitución por clorhídrico

---

Desde 2007 se dispone de un líquido de diálisis libre de acetato que lo sustituye por ácido clorhídrico (HCl). Su uso es bastante lógico, ya que el cloro es el principal anión en el medio extracelular y su concentración sanguínea varía para mantener la neutralidad eléctrica del organismo, es decir, el balance catión/anión, el equilibrio ácido-base y la osmolaridad plasmática<sup>12</sup>.

A diferencia del acetato, es un ácido fuerte, se disocia completamente en agua, por lo que a la misma concentración genera un pH mucho más ácido, lo que conlleva ciertos problemas logísticos de fabricación, acondicionamiento y utilización.



Esta nueva alternativa se ha utilizado con éxito en HD convencional para evitar la hiperacetatemia crónica<sup>56,57</sup>. En HDF en línea, la comparación entre



ambos ha demostrado que el líquido libre de acetato reduce parámetros inflamatorios y la hiperacetatemia<sup>42,43,58,59</sup>.

También se ha empleado en variantes de HDF como son la reinfusión de hemofiltrado (HFR), que es una técnica de HDF en la que el líquido de reemplazo está constituido por ultrafiltrado del paciente "regenerado" a través de un cartucho que contiene resina de estireno hidrofóbica. Utilizando esta técnica se observó que la troponina T aumenta tras una sesión de diálisis con el líquido convencional con 3 mmol/L de acetato, mientras que descendía significativamente con el líquido con HCl, lo que los autores correlacionaron con una mejoría de la función microvascular cardíaca<sup>60</sup>. O en la hemofiltración acoplada (PHF, del inglés *paired hemofiltration*), que es una técnica de HDF diseñada para evitar la interferencia entre los transportes difusivo y convectivo, de forma que, se acopla un primer filtro, donde se realiza una ultrafiltración de 9 – 12 litros, a un segundo donde se realiza HD convencional. La reposición del líquido se realiza entre ambos filtros<sup>61</sup>. Esta técnica, utilizando un líquido de HCl mejora la tolerancia hemodinámica y la hiperacetatemia<sup>62</sup>.

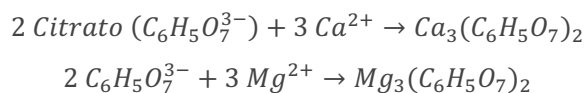
## 1.8 Alternativas al ácido acético: sustitución por cítrico

---

La primera publicación que utiliza citrato en el líquido de diálisis, en el año 2000, utilizaba una mezcla que incorporaba 0,8 mmol/L de citrato y 0,3 mmol/L de acetato<sup>63</sup>. Sin embargo, entre las opciones barajadas para eliminar el acetato del líquido de diálisis, su sustitución completa por 1

mmol/L de ácido cítrico (pKa<sub>1</sub> de 3,09, pKa<sub>2</sub> de 3,74 y pKa<sub>3</sub> de 5,41) se postula como la opción más biocompatible y ventajosa a nivel clínico<sup>12,64</sup>.

Una de las principales preocupaciones sobre el uso del citrato han sido los posibles acontecimientos adversos relacionados con sus efectos de fijación del calcio y magnesio<sup>65-67</sup>. Conocer el balance de calcio en su totalidad es difícil<sup>16,17</sup>, pero la calcemia suele aumentar significativamente en las diálisis con el líquido con acetato. Más del 80% de los pacientes en diálisis tienen un balance positivo de calcio incluso con una concentración de calcio en el líquido de diálisis de 2,5 mEq/L (1,25 mmol/L)<sup>68-70</sup>, mientras que la quelación del líquido con citrato se traduciría en un balance de calcio menor o incluso negativo<sup>71,72</sup>. De hecho, 1 mmol de citrato es capaz de quelar 1,5 mmol de estos iones divalentes<sup>12</sup>, lo que provoca una salida de estos iones desde el plasma hacia el líquido de diálisis por gradiente difusivo.



Por este motivo, muchos autores señalan la necesidad de ajustar al alza el calcio y magnesio en el líquido de diálisis<sup>12,16,17,72-75</sup>. En el caso del magnesio es relevante, ya que la hipomagnesemia es un predictor de mortalidad cardiovascular y por cualquier causa en pacientes en HD<sup>75,76</sup> y se ha evaluado su relación con el líquido de diálisis, siendo más frecuente en aquellos líquidos con citrato<sup>15</sup>. En este estudio, sin embargo, corrigiendo por niveles de magnesio, los pacientes con citrato tenían una mejor supervivencia. No hay recomendaciones específicas sobre la concentración de magnesio que

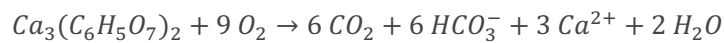
debe tener el líquido de diálisis, aunque se han evaluado diferentes concentraciones *in vitro* que han demostrado efectos positivos en términos de reducción del estrés oxidativo y el daño lipídico, especialmente en condiciones inflamatorias<sup>77</sup>.

La concentración de calcio en el líquido de diálisis ha sido, de hecho, un tema de debate desde que se inició la HD. En la década de los años sesenta del siglo XX, se empezaron a utilizar concentraciones de 2,5 mEq/L por ser los niveles plasmáticos normales de calcio. Sin embargo, con estos niveles se observaba un balance negativo que empeoraba el hiperparatiroidismo secundario, por lo que se adoptó una concentración de 3,5 mEq/L. Este cambio se convirtió en la norma hasta que entraron en escena los quelantes cálcicos de fósforo y los análogos activos de la vitamina D. Dado que la introducción de estos fármacos proporciona una mayor ingesta oral de calcio, sus niveles en el líquido de diálisis se redujeron hasta el estándar actual de 2,5-3 mEq/L<sup>17</sup>.

Si se evalúan los parámetros habituales de metabolismo mineral-óseo, como una forma aproximada de evaluar ese balance de calcio, se observan, de hecho, diferencias consistentes en la disminución relativa de calcio iónico y aumento de parathormona (PTH) comparando el uso del líquido de citrato con el de acetato que se mantienen a corto<sup>72,78-80</sup> y largo plazo<sup>81,82</sup>. Se ha señalado la necesidad de suplementar 0,15 mmol/L de calcio en el líquido de citrato para equilibrar el balance de calcio al conseguido con el de acetato<sup>83</sup>, sin embargo, la suplementación nos volvería al balance positivo de calcio, cuando un balance neutro podría tener ciertos beneficios clínicos. Es más, diferentes estudios no han detectado diferencias significativas en la

aparición de acontecimientos adversos<sup>84-87</sup>. Por el contrario, la diálisis con citrato se ha asociado a un efecto protector en otros estudios<sup>71,78,88</sup>.

Además, el calcio iónico aumenta unos 30 a 60 minutos después del final de la sesión, ya que el citrato cálcico se metaboliza en bicarbonato y libera calcio en los hepatocitos, por ello el papel de la insuficiencia hepática en la acumulación y toxicidad por citrato<sup>12,26</sup>.



Además, es bien sabido que la ERT conlleva un aumento exponencial del riesgo de muerte, que se atribuye sobre todo a la enfermedad cardiovascular y está estrechamente relacionada con el trastorno mineral y óseo de la enfermedad renal crónica (ERC) y la inflamación<sup>89-92</sup>. De hecho, la primera causa de muerte en los pacientes con ERC es la enfermedad cardiovascular, a tal punto que, las personas con ERC tienen más probabilidad de sufrir un evento cardiovascular que de progresar a enfermedad renal crónica terminal (ERT)<sup>93</sup>.

En este sentido, la ganancia de calcio durante la diálisis se ha relacionado con efectos cardiovasculares a corto plazo, principalmente de mejora de la tolerancia hemodinámica durante las sesiones de diálisis<sup>78,81,88,94-96</sup>, por medio de la reducción de presión arterial sistólica y diastólica y de las resistencias periféricas, sin reducir el volumen de eyección sistólico<sup>88</sup>; y la producción de arritmias, ya que el calcio bajo alarga el intervalo QT corregido<sup>97</sup>. Pero también con efectos a largo plazo, asociados a la sobrecarga

crónica de calcio, como la calcificación vascular, que es menor con un calcio bajo<sup>98-100</sup> y resulta ser un fuerte predictor de mortalidad en esta población<sup>11,13,16,17,101</sup>. Sin embargo, los resultados clínicos no son claramente mejores entre los pacientes con un balance acumulado de calcio negativo, al entrar en juego otras complicaciones cardiovasculares como la cardiomiopatía, la insuficiencia cardíaca congestiva o las arritmias<sup>101</sup>. Además, el paro cardíaco repentino se produce tanto con gradientes de calcio bajos como altos entre el dializador y la sangre<sup>102</sup>. Por lo tanto, es aconsejable conseguir un equilibrio cero de calcio<sup>98</sup>.

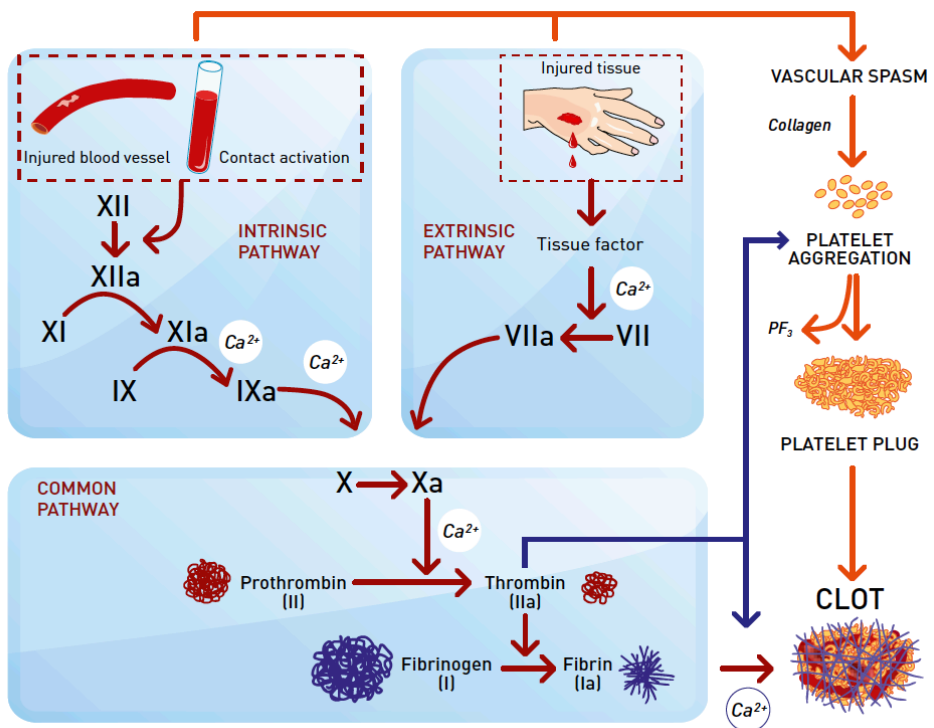


IMAGEN 7. Efecto quelante del citrato sobre el calcio y la inhibición consecuente de la cascada de la coagulación a diferentes niveles. Reproducido de Novel BiCart Select® Citrate system improves dialysis therapy. HCEN15413\_2. 2012.03. Gambro Lundia AB.

El calcio es un cofactor necesario en la cascada de la coagulación por lo que el efecto quelante sobre este provoca una inhibición a varios niveles de esta cascada (IMAGEN 7)<sup>103</sup>. Ello, aun cuando la concentración de citrato es la quinta parte de la utilizada para la anticoagulación regional con citrato, desencadena una menor trombogenicidad, que revierte en un ahorro de heparina<sup>65,84,85,87,104</sup> y una mejor dosis de diálisis<sup>63,88,105-107</sup>, sin afectar a la seguridad del tratamiento<sup>108-111</sup>.

Además, la diálisis induce la activación del sistema de complemento, lo que produce efectos a corto plazo como la promoción de la coagulación e inflamación, pero también a largo, como la predisposición para desarrollar infecciones, fibrosis y eventos cardiovasculares (IMAGEN 8)<sup>112</sup>.

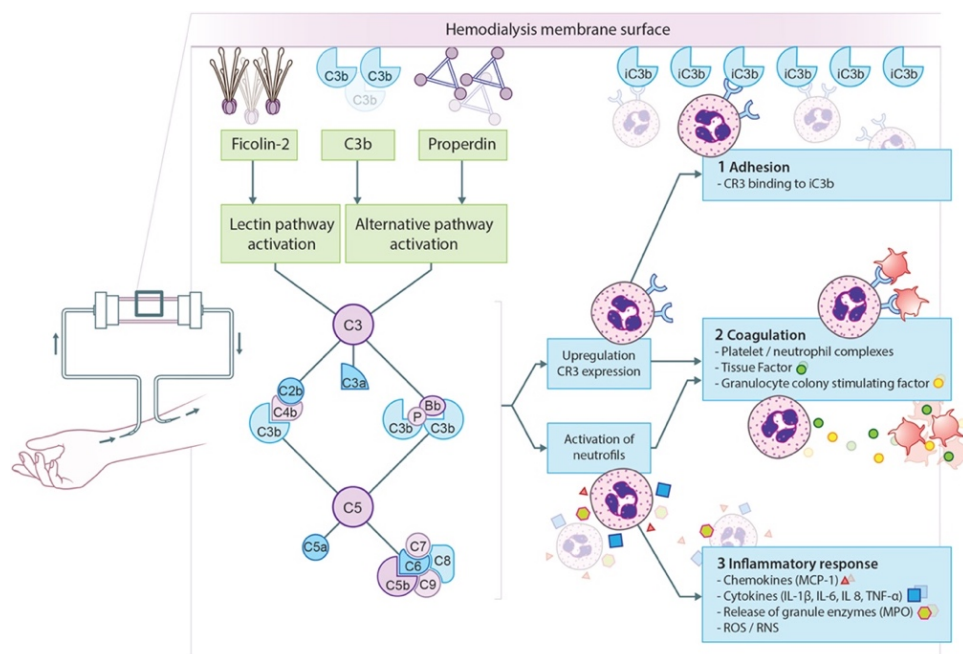


IMAGEN 8. Modelo propuesto para la activación del complemento en hemodiálisis. Reproducido de Poppelaars F, Faria B, Gaya da Costa M, et al. The Complement System in Dialysis: A Forgotten Story? *Front Immunol.* 2018;9:71. CC BY 4.0.

El citrato en el líquido de diálisis tendría un cierto efecto inhibitorio sobre esta activación debido a su capacidad de quelar calcio y magnesio (IMAGEN 9)<sup>112-115</sup>.

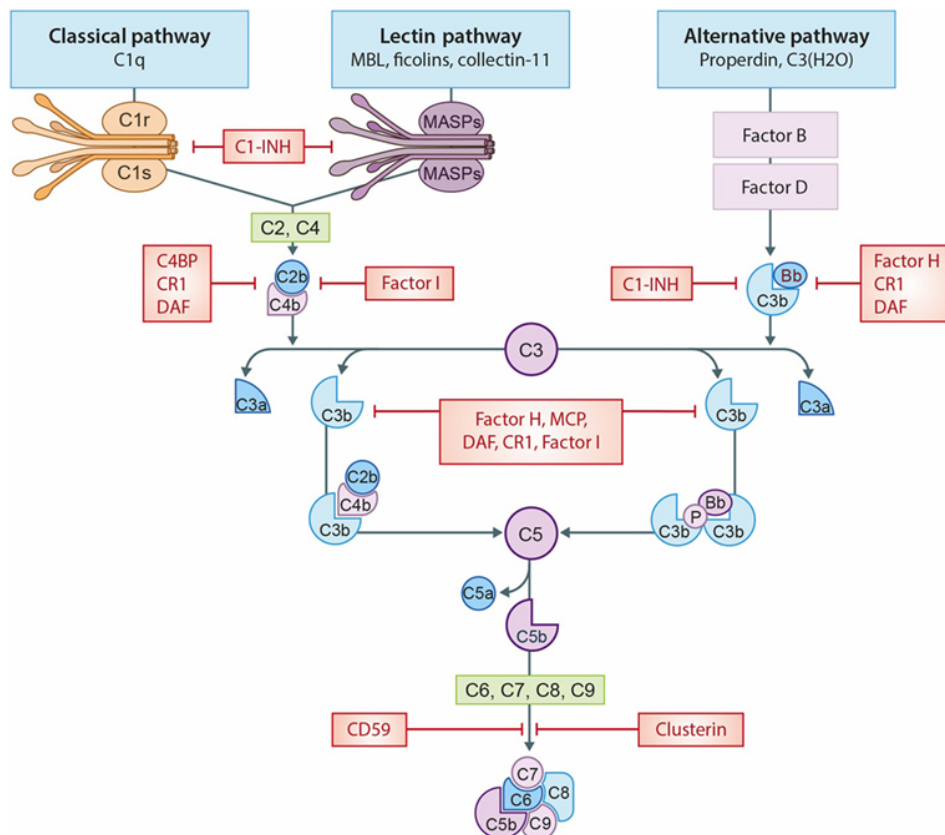


IMAGEN 9. Sistema del complemento. El calcio es un cofactor necesario para la unión de los tres componentes de C1 y juega un papel fundamental en las colectinas. Por su parte, el magnesio, es necesario para la formación de la convertasa de C3 (C4bC2a), que hidroliza C3. Reproducido de Poppelaars F, Faria B, Gaya da Costa M, et al. The Complement System in Dialysis: A Forgotten Story? *Front Immunol.* 2018;9:71. CC BY 4.0.

Este efecto sobre las cascadas de la coagulación y el complemento se ha postulado como causante de una menor adsorción de proteínas a la

membrana del dializador, aunque las posibles implicaciones para la eficacia de la diálisis y la biocompatibilidad de este hallazgo están aún por dilucidar<sup>116</sup>.

La HD provoca, además, la activación de un conjunto de rutas metabólicas interrelacionadas y altamente reguladas que inducen apoptosis y se relacionan con el estrés oxidativo, la activación de citocinas inflamatorias y la disfunción mitocondrial<sup>117</sup>. El líquido de citrato, en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con el de acetato, provoca menor inflamación<sup>84,105,107,113,118–120</sup>, menor estrés oxidativo<sup>121</sup>, menor daño endotelial<sup>118,119</sup>, menor daño celular<sup>122</sup> y menor daño microvascular<sup>105</sup>. Estos hallazgos parecen relacionados con un efecto quelante sobre otros cationes metálicos, la menor producción de citocinas inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés), así como una restauración del glutatión mitocondrial<sup>26</sup>.

Además, confiere un mejor equilibrio ácido-base, con un efecto neutro o positivo en los niveles de bicarbonato prediálisis, pero, sobre todo, una menor alcalemia posdiálisis<sup>71,78,88,123</sup>, la cual está relacionada con la calcificación vascular. Y de forma pleiotrópica, pero probablemente en relación con un mejor perfil inflamatorio, mejora los perfiles de anemia<sup>123</sup> y nutricional<sup>81,123</sup>.

Un aspecto importante es su metabolismo (IMAGEN 10). El citrato regula el equilibrio energético del organismo. Puede ser oxidado a través del ciclo TCA o transportado al citosol como sustrato para la enzima ATP citrato liasa, que



escinde el citrato para regenerar acetil-CoA y oxaloacetato. Niveles elevados de citrato citosólico inducen el anabolismo, inhiben la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos, a la par que aumentan la síntesis de estos últimos. Por su parte, el citrato mitocondrial puede inhibir la piruvato deshidrogenasa, y así el paso de piruvato a acetil-CoA, y la succinato deshidrogenasa que cataliza el paso de succinato a fumarato en el ciclo TCA<sup>124</sup>.

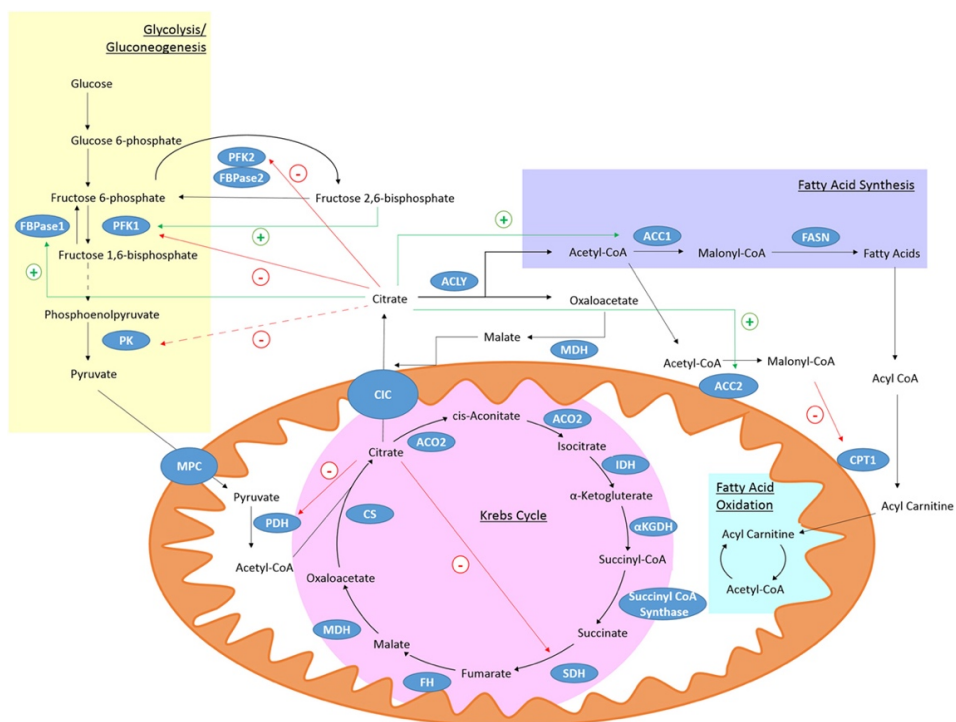


IMAGEN 10. Metabolismo del citrato en la célula humana. Reproducido de Williams NC, O'Neill LAJ. A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation. *Front. Immunol.* 2018;9:141. CC BY 4.0.

Se han planteado diferentes situaciones clínicas en las que el uso de citrato en lugar de acetato sería claramente beneficioso: inestabilidad

hemodinámica, niveles bajos de PTH, calcificación vascular, hipercalcemia o hipermagnesemia, contraindicación para el uso de heparina, alcalosis metabólica posdiálisis, sintomatología asociada con el aumento de niveles de bicarbonato (insuficiencia respiratoria crónica con retención de CO<sub>2</sub>, cefalea o insuficiencia hepática avanzada), si no se alcanza la dosis de diálisis deseada o malnutrición<sup>78</sup>.

## 1.9 Metabolómica

---

La metabolómica es el estudio exhaustivo de las moléculas endógenas de pequeña masa molecular, es decir, de menos de 1,5 kDa, denominadas metabolitos, presentes en muestras que pueden comprender desde células, líquidos biológicos a, incluso, tejidos. A diferencia de lo que ocurre con la genómica, los metabolitos son dinámicos, ya que los factores extrínsecos los modifican constantemente, por lo que el momento de la medición de estos es crucial.

El metaboloma no es más que el conjunto de esos metabolitos medidos mediante metabolómica. Entre estos se encuentran los lípidos, aminoácidos, vitaminas, esteroides, glúcidos, nucleótidos, ácidos grasos y ácidos orgánicos. El metaboloma comprende los productos intermedios de las reacciones bioquímicas, que representan el último escalón de la cascada ómica (IMAGEN 11).

Su estudio proporciona, potencialmente, una visión más profunda de la respuesta del organismo a diversas situaciones y ofrece la información necesaria para analizar su relevancia fisiopatológica<sup>125</sup> por tanto, representa la aproximación más cercana al estudio del fenotipo que disponemos actualmente.

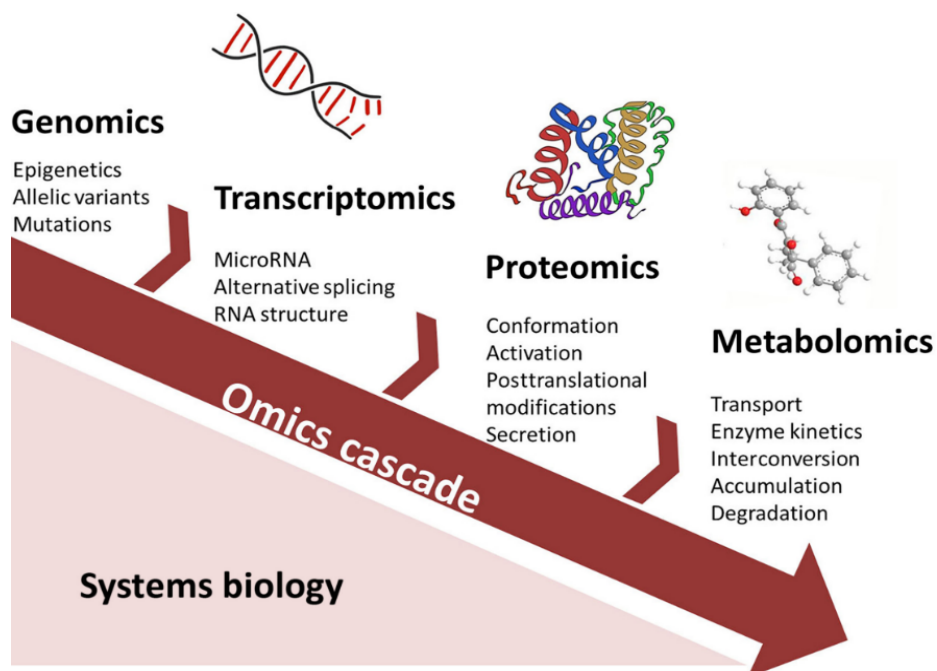


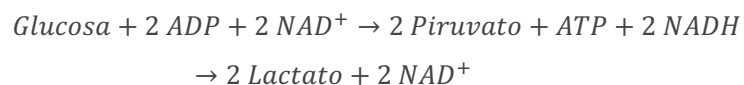
IMAGEN 11. Representación esquemática de la cascada ómica y los diferentes aspectos estudiados en cada área de investigación. Reproducido con permiso de Bedia C. *Chapter Two - Experimental Approaches in Omic Sciences*. In: Jaumot J, Bedia C, Tauler R, eds. *Comprehensive Analytical Chemistry, Vol 82: Data Analysis for Omic Sciences: Methods and Applications*. Elsevier; 2018. Todos los derechos reservados por licenciatario.

El concepto de metabolismo intermediario se refiere a la suma de una gran red de procesos químicos intracelulares implicados en la producción de los componentes celulares y la conversión de energía. Incluye la síntesis (anabolismo) y degradación (catabolismo) de macromoléculas<sup>126,127</sup>.

La energía celular se genera, principalmente, a partir de la respiración aeróbica, que consiste en la oxidación aeróbica de glúcidos, lípidos o proteínas derivados, bien de la digestión de una comida, bien la degradación de las reservas internas; o del metabolismo anaeróbico de la glucosa<sup>126,127</sup>.

En la respiración aeróbica, los combustibles metabólicos se descomponen en sustratos básicos (glucosa, aminoácidos, ácidos grasos libres o glicerol). A continuación, se producen procesos que oxidan, es decir, eliminan electrones de estos sustratos de alto potencial y los transfieren a sustratos de menor potencial. Durante estos procesos se libera energía. Las coenzimas (nicotinamida-adenina-dinucleótido [NAD] y flavín adenín dinucleótido [FAD]) son compuestos intermedios de almacenamiento de energía que ayudan a la transferencia de electrones de las reacciones metabólicas (glucólisis y ciclo TCA) a la cadena de transporte de electrones. En la cadena de transporte de electrones, estos se transfieren a través de una serie de portadores de menor potencial y la energía liberada durante este proceso se utiliza para formar ATP. Estos electrones se combinan finalmente con el aceptor final de electrones, el oxígeno (O<sub>2</sub>), para formar agua. Durante el metabolismo aeróbico, el oxígeno se consume al final de la cadena de transporte de electrones produciendo CO<sub>2</sub> a través del ciclo TCA<sup>126</sup>.

Por su parte, el metabolismo anaeróbico de la glucosa podría resumirse así<sup>126</sup>:



Como puede verse, ambos mecanismos implican la oxidación de moléculas que constituyen combustibles metabólicos. Su diferencia radica en el tipo de aceptor final de electrones que utilizan<sup>127</sup>.

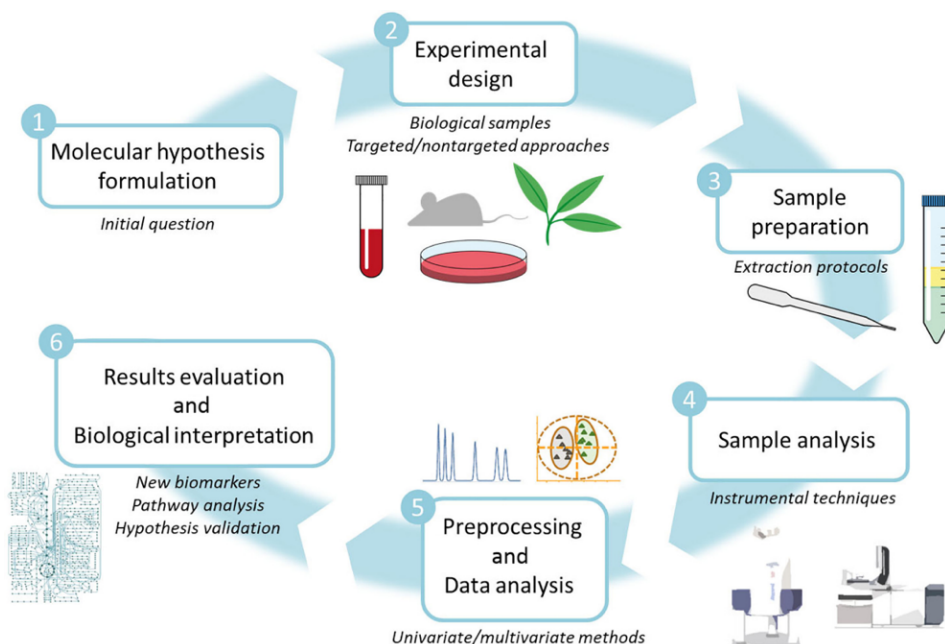


IMAGEN 12. Representación esquemática del flujo de trabajo en ciencias ómicas. Reproducido con permiso de Bedia C. *Chapter Two - Experimental Approaches in Omic Sciences*. In: Jaumot J, Bedia C, Tauler R, eds. *Comprehensive Analytical Chemistry, Vol 82: Data Analysis for Omic Sciences: Methods and Applications*. Elsevier; 2018. Todos los derechos reservados por licenciatario.

Los estudios metabolómicos comparten unos pasos comunes (IMAGEN 12). En primer lugar, se debe establecer la hipótesis y los objetivos del trabajo. Seguidamente, se establece el diseño experimental que mejor consiga alcanzar esos objetivos. Hay dos enfoques posibles a la hora de realizar un estudio metabolómico: los estudios dirigidos y los no dirigidos. Los primeros podrían no considerarse estrictamente metabolómica, pues mide metabolitos concretos preespecificados con el objetivo de estudiar un

sistema biológico determinado o validar estudios no dirigidos previos. En el caso de estos últimos, se analizan e intentan determinar el máximo número de metabolitos presentes en la muestra.

Ese diseño experimental incluye escoger adecuadamente el tipo de muestra que queremos analizar y atender a su correcta recolección y posterior procesado en el laboratorio. Se dispone principalmente de dos métodos de medición de los metabolitos, la espectroscopia por resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas. Por último, el análisis estadístico adecuado para afianzar una correcta interpretación y evaluación de los resultados que den una respuesta fiable a la pregunta de investigación.

Con estos métodos, aplicados específicamente en HD, donde la técnica, por sí misma puede empeorar varias funciones metabólicas<sup>134</sup>, se ha investigado la correlación de varios metabolitos con enfermedad cardiovascular y muerte, parámetros inflamatorios, el estado nutricional, la función cognitiva, la hipoxia y el estrés oxidativo, el desgaste de la masa corporal, el prurito urémico y la alteración del ciclo del sueño<sup>128,133,135-138</sup>. Además, se ha utilizado la metabolómica para comparar técnicas y filtros de diálisis, pero no se ha realizado ningún estudio, hasta donde sabemos, sobre los efectos del líquido de diálisis en el metaboloma<sup>139,140</sup>.

Un problema a la hora de diseñar estudios de metabolómica en HD es que, al ser los metabolitos de una masa molecular pequeña, son ampliamente dializables<sup>25</sup>, por lo que la interpretación de sus cambios en el plasma debe evaluarse cautelosamente.







# 2

## Hipótesis y objetivos



## 2.1 Hipótesis de trabajo

---

La concentración de ácido acético que se añade al líquido convencional de HD para evitar la precipitación del bicarbonato con los cationes divalentes provoca una hiperacetatemia en el organismo que aumenta la actividad de ciertas rutas metabólicas con implicaciones clínicas bien demostradas, pero cuyos mecanismos biológicos subyacentes no han sido dilucidados del todo. Muchas de estas rutas, además, impactan sobre el perfil inflamatorio y el metabolismo mineral-óseo, dos factores ampliamente relacionados con resultados cardiovasculares, que representan la causa principal de morbimortalidad de estos pacientes.

La metabolómica es una herramienta que permite estudiar, de una forma dinámica, los metabolitos presentes en el plasma. En el campo de la HD, teniendo en cuenta el factor de confusión que supone la alta dializabilidad de los metabolitos por ser estos de pequeña masa molecular, abre las puertas a alcanzar un mayor conocimiento de los efectos secundarios del uso del ácido acético en el líquido de diálisis, así como de los cambios inducidos en el metaboloma por otras variables de la ERC o del propio tratamiento.

La hipótesis que plantea esta Tesis Doctoral es que la hiperacetatemia secundaria a la concentración de ácido acético añadido al líquido de HD activa diferentes rutas metabólicas que tienen implicaciones clínicas en el corto plazo y pronósticas en el largo plazo en pacientes en programa crónico de HD.

## 2.2 Objetivos

---

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el de investigar el posible efecto yatrogénico que tiene la hiperacetatemia inducida por el ácido acético del líquido de diálisis sobre el metabolismo de pacientes con ERC estadio 5D en programa crónico de HD en comparación con un líquido que lo sustituye por ácido cítrico.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos de investigación:

- Evaluar los efectos producidos por el cambio de líquido de diálisis en el corto plazo en términos de balance de calcio y biomarcadores de daño miocárdico durante el tratamiento de la HD.
- Comprobar los efectos producidos por ese cambio en el medio plazo en términos de perfil inflamatorio y metabolismo mineral óseo.
- Examinar los cambios inter e intradiálisis en ciertas rutas metabólicas de interés mediante metabolómica dirigida con ambos líquidos de diálisis.
- Comparar las variaciones inter e intradiálisis en el perfil metabólico de los pacientes inducidos por uno u otro líquido mediante metabolómica no dirigida.





# 3

## Publicaciones





### 3.1 Primera publicación

---

#### **Improvements in Inflammation and Calcium Balance of Citrate versus Acetate as Dialysate Buffer in Maintenance Hemodialysis: A Unicentric, Cross-Over, Prospective Study**

José Jesús Broseta, Luis Carlos López Romero, Alba Cerveró, Ramón Devesa Such, Amparo Soldevila, Sergio Bea Granell, Pilar Sánchez Perez y Julio Hernández Jaras.

Revista: Blood Purification ISSN: 0253-5068

Volumen: 50 Número: 6 Páginas: 914-920

DOI: 10.1159/000513419

Recepción: 12 de agosto de 2020

Aceptación: 27 de noviembre de 2020

Publicación: 3 de febrero de 2021

Perfil de la publicación según Journal Citation Reports

- Año (acorde al momento de publicación): 2019
- Factor de impacto de la revista: 2.116
- Ranking por categorías: Hematología: Q3 (54/76); Urología y Nefrología: Q2 (41/85)

### **Título en castellano**

Mejoras en la inflamación y el balance de calcio con el uso de citrato frente a acetato como tampón del líquido de diálisis en hemodiálisis crónica: un estudio prospectivo, cruzado y unicéntrico.

### **Resumen en castellano**

Introducción. La composición del líquido es un aspecto crucial en el tratamiento de diálisis. Dos de sus elementos más controvertidos son la concentración óptima de calcio y el uso de acetato como tampón. Además, entre las diferentes alternativas para conseguir una diálisis sin acetato, el uso de citrato se postula como la opción más adecuada. El objetivo de este estudio es identificar los posibles efectos beneficiosos del líquido de diálisis con citrato en comparación con el de acetato, tanto a corto, especialmente en lo que respecta al equilibrio de calcio intradiálisis y los biomarcadores de daño cardíaco, como a medio plazo, es decir, tras doce sesiones realizadas con cada líquido, mediante la evaluación de biomarcadores inflamatorios y del metabolismo mineral óseo.

Métodos: Se trata de un estudio prospectivo, cruzado y unicéntrico. Cada paciente se sometió a 24 sesiones de diálisis, 12 con cada líquido. Las muestras de sangre se tomaron en 2 sesiones diferentes con cada ácido débil. Se incluyen biomarcadores inflamatorios y del metabolismo mineral óseo. La concentración de calcio de ambos líquidos fue de 1,5 mmol/L, mientras que todos los demás parámetros de diálisis y el tratamiento de los pacientes no fueron modificados durante el período de estudio.

Resultados: No hubo diferencias en el calcio ionizado prediálisis (1,11 frente a 1,08 mmol/L) al comparar el líquido con citrato frente al que contenía acetato. Sin embargo, hubo un aumento significativo del calcio iónico con el uso de acetato en las muestras de sangre tomadas inmediatamente después de la diálisis y de 30 minutos después cuando se utilizó acetato. Por el contrario, los niveles de calcio iónico permanecieron estables con el uso de citrato. Los biomarcadores inflamatorios también se redujeron tras el uso de citrato.

Conclusiones: El uso de citrato proporciona interesantes ventajas en comparación con el acetato. Mantiene estables los niveles de calcio iónico durante las sesiones de diálisis con un efecto neutro o negativo en el balance de calcio y mejora el estado inflamatorio crónico que conlleva el tratamiento de hemodiálisis a largo plazo. Estos efectos beneficiosos podrían conducir a una mejora de los resultados clínicos.



## 3.2 Segunda publicación

---

### **Impact of Acetate versus Citrate Dialysates on Intermediary Metabolism— A Targeted Metabolomics Approach**

José Jesús Broseta, Marta Roca, Diana Rodríguez Espinosa, Luis Carlos López Romero, Aina Gómez Bori, Elena Cuadrado Payán, Ramón Devesa Such, Amparo Soldevila, Sergio Bea Granell, Pilar Sánchez Perez y Julio Hernández Jaras.

Revista: International Journal of Molecular Sciences

EISSN: 1422-0067    Volumen: 23    Número: 19    Página: 11693

DOI: 10.3390/ijms231911693

Special issue: Cellular and Molecular Research of Kidney Diseases

Recepción: 30 de agosto de 2022

Aceptación: 30 de septiembre de 2022

Publicación: 2 de octubre de 2022

Perfil de la publicación según Journal Citation Reports

- Año (acorde al momento de publicación): 2021
- Factor de impacto de la revista: 6.208
- Ranking por categorías: Bioquímica y biología molecular: Q<sub>1</sub> (69/297);  
Química, multidisciplinar: Q<sub>2</sub> (50/179)

### **Título en castellano**

Impacto del acetato frente al citrato en el líquido de diálisis sobre el metabolismo intermedio – Un estudio metabolómico con un enfoque dirigido.

### **Resumen en castellano**

El acetato se utiliza ampliamente como tampón del líquido de diálisis para evitar la precipitación de sales de bicarbonato. Sin embargo, incluso a bajas concentraciones que no superarían la capacidad metabólica del ciclo del ácido tricarboxílico de Krebs, se activan otras rutas metabólicas que provocan consecuencias clínicas indeseables por mecanismos poco conocidos. Este estudio pretende añadir información que permita explicar de una manera biológica las mejoras clínicas encontradas en los pacientes que utilizan el líquido de diálisis con citrato. Se diseñó un estudio metabolómico con un enfoque dirigido, prospectivo, cruzado y unicéntrico para analizar las diferencias entre dos líquidos de diálisis, uno con 4 mmol/L de acetato y otro con 1 mmol/L de citrato. Se escogieron 15 metabolitos para investigar los cambios inducidos en el ciclo del ácido tricarboxílico, la glucólisis, el metabolismo anaeróbico, el metabolismo de los cuerpos cetónicos y el de los triglicéridos y los aminoácidos. Veintiún pacientes completaron el estudio. El citrato aumentó durante las sesiones de diálisis cuando se utilizó el líquido con este, sin superar los valores normales. Otras diferencias encontradas en los siguientes pasos del ciclo del ácido tricarboxílico mostraron una mayor acumulación de sustratos cuando se utilizó el líquido con acetato. Mientras que el lactato disminuyó, el piruvato

se mantuvo estable y la cetogénesis se potenció durante la diálisis. La acetilcarnitina y el mio-inositol se redujeron durante la diálisis, mientras que el glicerol se mantuvo constante. Por último, el glutamato y el glutarato disminuyeron debido a la inhibición de la degradación de aminoácidos. Este estudio plantea nuevas hipótesis que deben ser investigadas para comprender mejor los procesos bioquímicos que la diálisis y los diferentes tampones del líquido de diálisis inducen en el metabolismo del paciente.





### 3.3 Tercera publicación

---

#### **The metabolomic differential plasma profile between dialysates. Pursuing to understand the mechanisms of citrate dialysate clinical benefits**

José Jesús Broseta, Marta Roca, Diana Rodríguez Espinosa, Luis Carlos López Romero, Aina Gómez Bori, Elena Cuadrado Payán, Sergio Bea Granell, Ramón Devesa Such, Amparo Soldevila, Pilar Sánchez Perez y Julio Hernández Jaras.

Revista: *Frontiers in Physiology*      EISSN: 1664-042X

Volumen: 0    Página: 2372    DOI: 10.3389/fphys.2022.1013335

Research Topic: Proteomics, mass spectrometry and bioinformatics in renal pathophysiology

Recepción: 6 de agosto de 2022

Aceptación: 27 de octubre de 2022

Publicación: 13 de noviembre de 2022

Perfil de la publicación según Journal Citation Reports

- Año (acorde al momento de publicación): 2021
- Factor de impacto de la revista: 4.755
- Ranking por categorías: Fisiología: Q2 (24/86)

### **Título en castellano**

El perfil metabolómico diferencial en plasma entre los líquidos de diálisis. Persiguiendo comprender los mecanismos de los beneficios clínicos del líquido de diálisis con citrato.

### **Resumen en castellano**

Antecedentes: En la actualidad, el líquido de diálisis a base de bicarbonato necesita un tampón para evitar la precipitación de sales de bicarbonato con los cationes divalentes y el acetato, a concentraciones de 3-4 mmol/L, es el más utilizado. Sin embargo, el citrato se postula como una opción preferida debido a su asociación con mejores resultados clínicos por mecanismos poco conocidos. En ese sentido, este estudio de generación de hipótesis pretende identificar los posibles metabolitos que podrían explicar de una manera biológica estas mejoras encontradas en los pacientes que utilizan el líquido de diálisis con citrato.

Métodos: Se diseñó un estudio metabolómico con un enfoque no dirigido, prospectivo, cruzado y unicéntrico para analizar las diferencias entre dos líquidos de diálisis que solo se diferencian en su tampón, uno conteniendo 4 mmol/L de acetato y el otro, 1 mmol/L de citrato. Las muestras de sangre se recogieron en cuatro momentos (antes, a mitad, justo después y 30 minutos después de la diálisis) y se analizaron con un enfoque metabolómico no dirigido basado en la espectrometría de masas UPLC-Q-ToF.

Resultados: De entre las 31 variables metabolómicas más discriminantes obtenidas de las muestras de plasma de los 21 participantes, se seleccionaron

las que tenían potenciales implicaciones clínicas. Estas muestran que, tras la diálisis con el líquido con citrato, algunas toxinas urémicas parecen ser mejor aclaradas, la vía de degradación de la lisina se ve afectada y los niveles de aminoácidos de cadena ramificada son de 9 a 10 veces más altos que con el de acetato después de la diálisis, y, por su parte, la diálisis con acetato afecta al aclaramiento de acilcarnitina.

Conclusión: Aunque la mayoría de los cambios metabólicos observados en este estudio podrían ser atribuibles al propio tratamiento de diálisis, este identifica con éxito algunas variables metabólicas que difieren entre el líquido de diálisis con citrato y con acetato, lo que plantea nuevas hipótesis que pueden desvelar, en futuras investigaciones, los mecanismos implicados en las mejoras clínicas observadas con el citrato.



# 4

## Discusión



## 4.1 El balance de calcio y el metabolismo mineral-óseo

---

El uso de citrato, además de aportar los beneficios clínicos comentados en la introducción, ha demostrado seguridad a largo plazo<sup>141-144</sup> y, en algunos estudios, una reducción de la mortalidad<sup>145,146</sup>, por lo que su uso cada vez está más extendido. Sin embargo, tal y como se ha expuesto, la capacidad de quelación del calcio y magnesio es uno de los elementos que más incertidumbre y discusión genera y que más está frenando la sustitución del líquido de diálisis con acetato por el de citrato como estándar en el tratamiento de diálisis.

Nuestro estudio evaluó los niveles de calcio iónico prediálisis, posdiálisis y en el rebote, es decir, 30 minutos después de finalizar dos sesiones de diálisis, una con cada líquido. Encontrando que los niveles prediálisis no diferían significativamente entre ambos, pero que, al utilizar el líquido con acetato, estos aumentaban en la determinación posdiálisis y se mantenían elevados en el rebote, traduciendo un balance positivo de calcio iónico; mientras que los niveles al utilizar el líquido con citrato se mantenían sin diferencias estadísticamente significativas entre mediciones, lo que se podría interpretar como un balance neutro.

Esta ganancia de calcio que encontramos cuando utilizamos el líquido con acetato no es baladí. El aumento del calcio posdiálisis se relaciona con calcificación vascular. De hecho, se ha observado que este provoca la calcificación *ex vivo* de anillos aórticos de rata, mientras que unos niveles inalterados de calcio sérico conllevan una reducción en los depósitos de

calcio en estos de hasta cinco veces<sup>70</sup>. En este mismo sentido, se ha establecido que la diálisis con citrato afecta favorablemente a la propensión a la calcificación medida por el test T50, que predice la mortalidad en pacientes en hemodiálisis<sup>98</sup>. Por lo que se puede establecer que la sustitución de acetato por citrato conlleva una reducción de la calcificación en los pacientes en HD<sup>99</sup>.

Los niveles de calcio total prediálisis después de doce sesiones con uno u otro líquidos no mostraban diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados se asociaron a niveles séricos de PTH y de fósforo más elevados después de las doce sesiones con el líquido de citrato, lo que se podría explicar por la eliminación del efecto inhibitorio de la hipercalcemia relativa producida por el acetato y no necesariamente por un balance negativo de calcio<sup>147</sup>. Aunque los niveles prediálisis de fósforo fueron más altos tras doce sesiones con el líquido con citrato, su eliminación intradiálisis también fue superior con este. Sorprendentemente, no encontramos una menor incidencia de alcalosis posdiálisis, otro de los factores que se relaciona con mayor calcificación vascular, a diferencia de lo descrito en otros estudios publicados<sup>78</sup>.

## 4.2 Biomarcadores de daño miocárdico

---

La HD se asocia a isquemia miocárdica repetida que, en ausencia de enfermedad arterial coronaria, puede deberse a una disfunción microvascular coronaria<sup>148</sup>. Esta provoca una reducción global y segmentaria



de la función cardíaca sistólica<sup>149</sup> y sería, a su vez, responsable del aturdimiento miocárdico inducido por la HD, una entidad frecuente que puede contribuir al desarrollo de la insuficiencia cardíaca y al aumento de la mortalidad<sup>150</sup>. Además, la disfunción ventricular izquierda inducida por la HD se asocia a un aumento de las arritmias ventriculares, algo muy importante si tenemos en cuenta que la muerte súbita es la principal causa de mortalidad de estos pacientes<sup>151</sup>.

La troponina T ultrasensible (hsTnT) es un biomarcador de la necrosis miocárdica que, además, ha demostrado ser útil en predecir la mortalidad y los eventos adversos cardiovasculares en HD<sup>152-154</sup>. Nuestros resultados muestran que sus valores posdiálisis son más bajos tras el uso del líquido con citrato frente al de acetato. Sin embargo, dado que los niveles de hsTnT descienden con ambos líquidos, algo que contrasta con otros estudios publicados<sup>60,155</sup>, no podemos excluir del todo que este hallazgo se deba a un mayor aclaramiento de hsTnT y no a un efecto cardioprotector. Además, los cambios en la hsTnT no reflejan necesariamente el daño cardíaco inducido por la diálisis, ya que los niveles de hsTnT solo pueden elevarse después de 6 a 12 horas tras un episodio isquémico, por lo que sacar conclusiones en base exclusivamente a este hallazgo sería erróneo.

### 4.3 El perfil inflamatorio

---

Hay amplia evidencia sobre la respuesta inflamatoria inducida por la HD, siendo esta respuesta más notable durante las dos horas posteriores a la

sesión<sup>156</sup>. Nuestro estudio también sugiere que, a medio plazo, incluso después de solo doce sesiones de diálisis, el cambio de líquido con acetato al de citrato conduce a una reducción de todos los parámetros de inflamación medidos: IL-6, proteína C reactiva ultrasensible (hsCRP) y procalcitonina. Este hallazgo es de gran importancia, ya que la inflamación crónica representa un factor de riesgo cardiovascular independiente<sup>92,157</sup>, donde no solo la IL-6<sup>158-160</sup>, sino también la hsCRP<sup>152</sup>, se han establecido como fuertes predictores de mortalidad cardiovascular y por todas las causas en los pacientes en HD.

#### 4.4 El ciclo TCA

---

El ciclo TCA consiste en una serie de reacciones químicas que permiten la liberación de energía a partir de la oxidación del acetyl-CoA (IMAGEN 13).

Varios estudios han observado que los niveles posdiálisis de acetyl-CoA, tras el uso de un líquido de diálisis con acetato, superan entre 20 y 70 veces los fisiológicos a pesar de las aparentemente pequeñas concentraciones de acetato en el líquido de diálisis<sup>37,38,56</sup>.

En nuestro estudio nos propusimos el objetivo de evaluar los diferentes pasos del ciclo TCA mediante metabolómica dirigida en la búsqueda de generar nuevas hipótesis sobre el efecto iatrogénico de la hiperacetatemia. Para ello medimos tres metabolitos de la primera oxidación del carbono

(citrato, isocitrato y 2-oxoglutarato) y tres de la segunda (succinato, fumarato y malato).

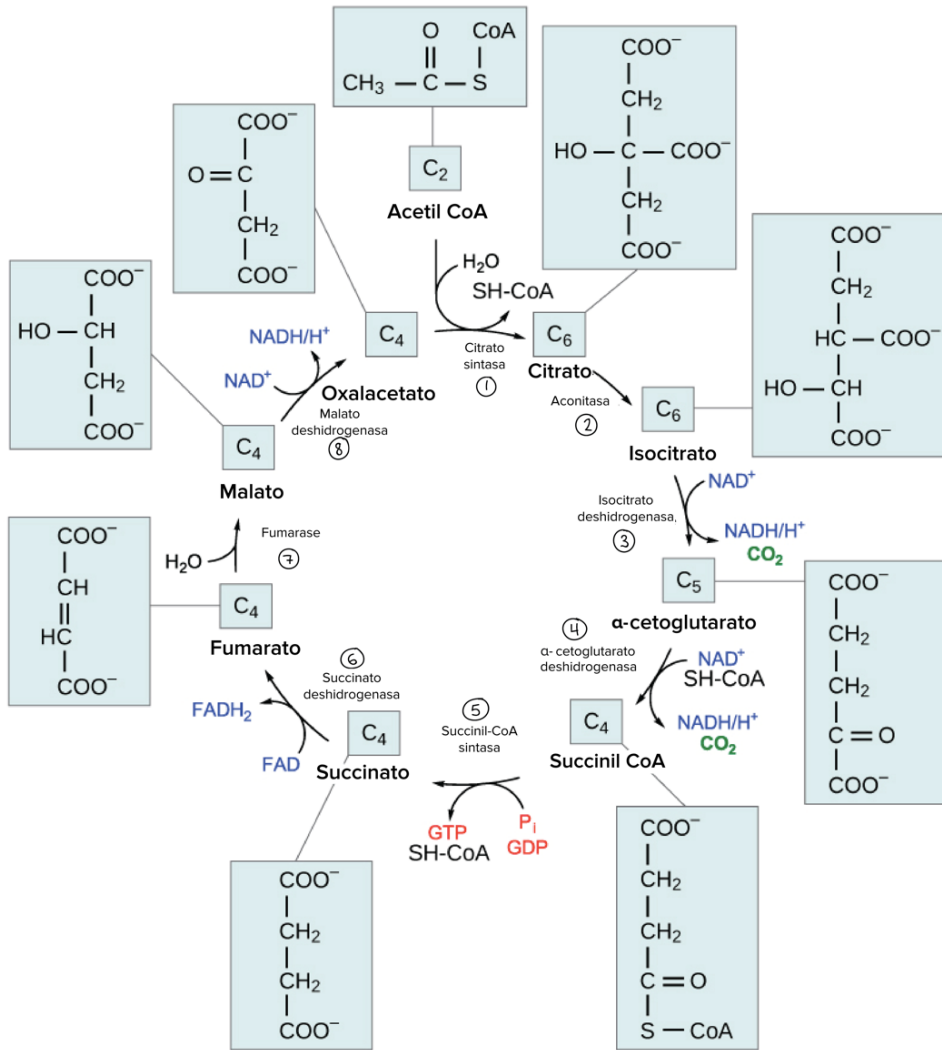


IMAGEN 13. Ciclo de los ácidos tricarbóxicos, del ácido cítrico o de Krebs. Reproducido de *El ciclo del ácido cítrico (artículo)* | Khan Academy. (<https://es.khanacademy.org/science/biology/cellular-respiration-and-fermentation/pyruvate-oxidation-and-the-citric-acid-cycle/a/the-citric-acid-cycle>). CC BY-NC-SA 4.0.

En nuestros resultados, durante la diálisis, los niveles de citrato aumentaron en sangre cuando se utilizó el líquido con este ácido débil, mientras que disminuyeron cuando se utilizó el de acetato, aunque no se produciría una acumulación suprafisiológica, pues no se superó en ninguna de las mediciones el límite superior del rango normal de citrato<sup>161,162</sup>, a diferencia de la franca hiperacetatemia tras una diálisis con acetato. Esto se podría deber a un mejor equilibrio entre la generación de citrato y su pérdida por el dializador frente al del acetato<sup>38,56</sup>. Por otro lado, en el medio plazo, es decir, tras doce sesiones con el líquido con ácido acético, los pacientes presentaron niveles prediálisis elevados de citrato en comparación con el uso del otro líquido. Esta diferencia, a la luz de los hallazgos intradiálisis, probablemente estaría en relación con la acumulación crónica de acetyl-CoA.

El citrato se isomeriza en isocitrato, cuyos niveles disminuyen más intensamente durante las sesiones con acetato. Además, la diferencia en los niveles prediálisis sugieren que esta se mantendría a largo plazo. Los niveles de isocitrato observados en todas las condiciones del estudio son considerablemente inferiores a los fisiológicos<sup>161</sup>.

El siguiente paso sería el 2-oxoglutarato, también llamado  $\alpha$ -cetoglutarato, un intermediario clave en el ciclo TCA, entre otros motivos, porque limita su tasa de metabolización<sup>163</sup>. Los niveles de 2-oxoglutarato fueron 3-4 veces superiores a los fisiológicos en todas las situaciones de nuestro estudio<sup>161</sup>, con un aumento no significativo durante las sesiones de diálisis, aunque los niveles posdiálisis se vuelven significativamente más altos con el líquido con ácido cítrico, algo que no se encuentra en estudios anteriores<sup>25</sup>. En el uso del

líquido con acetato, el bloqueo del cofactor CoA, agravado por el déficit de carnitina en los pacientes en HD, podría jugar un papel, ya que este es necesario en los siguientes pasos del ciclo TCA<sup>22</sup>.

Si pasamos al estudio de la segunda oxidación del carbono, los niveles de succinato aumentan durante las sesiones de diálisis, lo que sería común a ambos líquidos; sin embargo, son inferiores a los niveles fisiológicos en todas las situaciones de estudio<sup>25,161,164</sup>, probablemente por sus pérdidas en el dializador.

El fumarato, un metabolito que también interviene en otras rutas metabólicas como el ciclo de la urea, no se modificó durante las sesiones de diálisis, pero mantuvo niveles pre y posdiálisis más altos cuando los pacientes se dializaban con el líquido con ácido acético, alcanzando niveles 10 veces superiores a los observados en adultos sanos<sup>25,161,164</sup>. En este sentido la diferencia puede radicar en la potencial inhibición del citrato sobre la succinato deshidrogenasa, enzima que cataliza el paso de succinato a fumarato.

En consonancia con los datos publicados anteriormente, el malato se mantiene estable durante las sesiones de diálisis y cerca de los niveles fisiológicos<sup>25,161,164</sup>.

Estos cambios en los metabolitos del ciclo TCA no deben considerarse triviales. El acetil-CoA, el succinato y el fumarato pueden alterar la respuesta del sistema inmunitario<sup>163</sup>. El succinato, el malato y el fumarato promueven

la proliferación de tumores debido a su capacidad para inhibir las enzimas que contienen la prolil-hidroxilasa<sup>165</sup>. La linfangiogénesis y el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre se han asociado con el acetil-CoA y el 2-oxoglutarato, respectivamente. Este último también está relacionado con la disminución del catabolismo proteico, el aumento de la síntesis de proteínas y el incremento de los niveles plasmáticos circulantes de hormonas como la insulina, la hormona del crecimiento y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1)<sup>163</sup>. Además, desempeña un papel en la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup><sup>166</sup>.

Si bien, los niveles de acetil-CoA no parecen superar la tasa máxima de su metabolismo por el ciclo TCA, sabemos que este entra en otras rutas metabólicas desencadenando alteraciones del metabolismo<sup>12,38</sup>.

## 4.5 Glucólisis y metabolismo anaerobio

---

La glucólisis es un conjunto de reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato generando energía. Tiene tres pasos irreversibles mediados por las enzimas fosfofructoquinasa, hexoquinasa y piruvato quinasa. El citrato inhibe la fosfofructoquinasa y la hexoquinasa, mientras que la piruvato quinasa es inhibida tanto por el citrato como por el acetil-CoA. Por lo tanto, ambos líquidos de diálisis pueden potencialmente inhibirla.

El piruvato tiene dos rutas metabólicas posibles. Por un lado, puede producir acetil-CoA a través del complejo piruvato deshidrogenasa, por otro, puede convertirse, en una reacción bidireccional catalizada por la lactato deshidrogenasa, en lactato, en el conocido como metabolismo anaeróbico de la glucosa.

El metabolismo del acetato del líquido de diálisis desplaza al piruvato como fuente de acetil-CoA durante las sesiones de HD<sup>22</sup>, lo que, unido a su generación por la glucólisis y a la degradación del oxalacetato (acumulado a su vez por el aumento del metabolismo del acetil-CoA en el ciclo TCA), en piruvato por la acción de la piruvato carboxilasa, podría incrementar sus niveles<sup>38</sup>. Además, el efecto de la descarboxilación y posterior oxidación de una molécula de acetil-CoA en el ciclo del TCA, que es favorable a la oxidación y desplaza a los pares óxido-reductores, aumentaría los niveles de piruvato a expensas del lactato<sup>38</sup>.

Si bien, nuestros resultados, de acuerdo con otros previamente publicados<sup>25,37</sup>, no mostraron diferencias en los niveles de piruvato entre las diferentes mediciones, probablemente porque este se esté convirtiendo en lactato. No en vano, este último es el ácido orgánico producido predominantemente durante la HD, lo que resulta en un uso ineficiente de los sustratos metabólicos para la producción de energía y una pérdida irreversible de bases, contribuyendo al aumento de la pCO<sub>2</sub><sup>34</sup>. En nuestro estudio, los niveles de lactato se redujeron durante la diálisis, particularmente cuando se utilizó el líquido con ácido cítrico, pero se

mantuvieron por encima del rango fisiológico en todas las situaciones de estudio.

Es, pues, interesante comparar la relación lactato/piruvato, que es mayor en las mediciones de prediálisis con ácido acético y aumenta durante la sesión con este, mientras que, con ácido cítrico, disminuye. Estos resultados son coherentes con otras publicaciones<sup>37,38</sup>.

## 4.6 Metabolismo de los ácidos grasos

---

En condiciones de exceso de acetil-CoA, como ocurre durante las sesiones de HD, este es dirigido fuera de la mitocondria en forma de acetilcarnitina y se convierte en malonil-CoA (IMAGEN 14), principal precursor de los ácidos grasos, que inhibe su degradación y activa su biosíntesis<sup>167</sup>.

En el metabolismo lipídico juega un papel fundamental el conocido como sistema de las carnitinas (IMAGEN 15). Para que este sistema desempeñe su papel en la coordinación del equilibrio energético, tienen importancia dos variables alteradas durante la diálisis: la concentración tisular de carnitina y la relación entre esta y sus ésteres<sup>168</sup>. Y es que la diálisis induce una depleción en los niveles de carnitina, ya que esta se dializa con un coeficiente de cribado elevado, lo que limita el metabolismo de acetato por esa vía, favoreciendo efectos clínicos no deseados<sup>30</sup>. En cambio, las acilcarnitinas aumentan en los pacientes en HD debido a su deficiente excreción<sup>169</sup>.



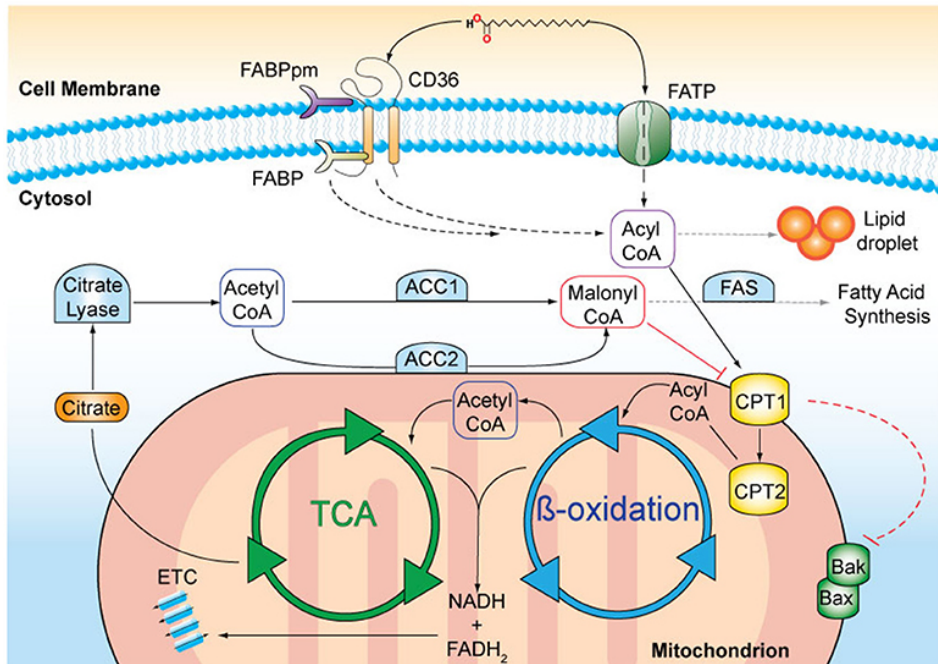


IMAGEN 14. Metabolismo de lípidos. Reproducido de Maher M, Diesch J, Casquero R, et al. Epigenetic-Transcriptional Regulation of Fatty Acid Metabolism and Its Alterations in Leukaemia. *Front. Genet.* 2018;9:405. CC BY 4.0.

La función general de las acilcarnitinas es transportar grupos acilo desde el citoplasma hasta la mitocondria para que puedan ser descompuestos para producir energía<sup>170</sup> en un proceso conocido como  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. La elevación de sus niveles podría indicar disfunción mitocondrial y parece asociarse a mortalidad cardiovascular en pacientes incidentes en HD<sup>171</sup>. Además, algunas de ellas son también proapoptóticas<sup>172</sup>.

En el estudio de metabolómica no dirigida, encontramos dos acilcarnitinas, la 3-hidrodecanoil y la 9-decanoilcarnitina, cuyas intensidades se redujeron significativamente tras una diálisis con el líquido con acetato, pero

no con el de citrato. Estas son acilcarnitinas de cadena media, que son algo menos abundantes que las de cadena corta<sup>170</sup>. Se forman a través de la esterificación con la L-carnitina o a través del metabolismo peroxisomal de las acilcarnitinas de cadena más larga<sup>173,174</sup> y se han relacionado con trastornos hereditarios del metabolismo de los ácidos grasos<sup>170</sup>. En particular, la 9-decanoilcarnitina está elevada en el plasma de sujetos con sobrepeso<sup>175</sup> y disminuida en pacientes con esquizofrenia o fiebre mediterránea familiar<sup>176,177</sup>. El estudio de las acilcarnitinas es un área de investigación activa, y es probable que se descubran muchas funciones nuevas tanto fisiológicas como fisiopatológicas<sup>170</sup>.

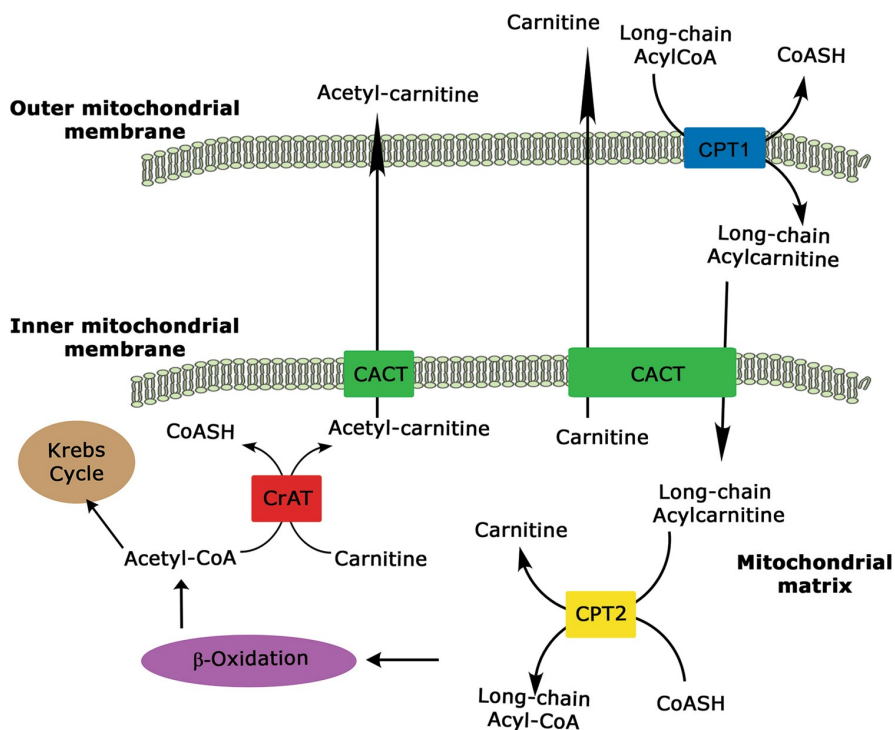
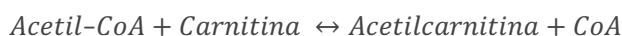


IMAGEN 15. Papel del sistema de las carnitinas en el metabolismo de lípidos. Reproducido de Melone MAB, Valentino A, Margarucci S, et al. The carnitine system and cancer metabolic plasticity. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):228. CC BY 4.0.

Por otro lado, en el de metabolómica dirigida, observamos que los niveles de acetilcarnitina disminuyen durante la diálisis. Esta es una forma acetilada de la carnitina que constituye el principal representante del grupo acilo y desempeña un papel importante en las vías anabólicas y catabólicas del metabolismo celular.



La falta de acetilcarnitina en pacientes en HD se ha relacionado con complicaciones cardíacas, deterioro de la capacidad funcional, hipotensión intradiálisis sintomática y anemia resistente a la eritropoyetina<sup>178</sup>. También se ha hipotetizado su papel en varios procesos neurodegenerativos<sup>179</sup>. Su descenso no puede considerarse solo en términos de modulación de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, a causa de las importantes pérdidas a través del dializador<sup>22</sup>.

El otro metabolito estudiado en términos de metabolismo lipídico ha sido el glicerol, liberado al torrente sanguíneo cuando se catabolizan lípidos para producir energía. Los niveles de glicerol no cambiaron durante la diálisis, lo que apoyaría la inhibición de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos; además, algunas mediciones estuvieron por debajo del límite de cuantificación de la técnica, lo que representa un potencial sesgo para su interpretación, pero apuntarían en la misma dirección. De hecho, los niveles de glicerol medidos están muy por debajo de los fisiológicos<sup>164,180</sup>.

## 4.7 Cetogénesis

---

La HD induce cetogénesis. Los altos niveles de acetil-CoA pueden combinarse en el hepatocito en acetoacetil-CoA, esencial para sintetizar colesterol y cuerpos cetónicos<sup>22</sup>. Esto es clínicamente significativo, ya que se relaciona con eventos cardiovasculares y muerte por todas las causas en pacientes en HD<sup>181</sup>.

Para evaluar la cetogénesis, en nuestro estudio de metabolómica dirigida, medimos dos metabolitos. El 3-hidroxiacetato, cuyos niveles aumentaron durante la sesión de diálisis, independientemente del uso de un líquido o el otro, lo que es coherente con publicaciones anteriores, que afirman que es el segundo ácido orgánico predominante producido durante la diálisis<sup>34,37,38</sup>. Y el acetoacetato, cuyos niveles prediálisis fueron más altos tras doce sesiones con el líquido con citrato, pero los posdiálisis fueron más altos con el acetato. En cualquier caso, sus niveles fueron suprafiológicos en todas las mediciones<sup>161</sup> y traducen, de nuevo, un aumento de los cuerpos cetónicos.

## 4.8 Metabolismo de aminoácidos

---

Durante la HD, los aminoácidos se pierden a través del dializador con la consiguiente modificación de su perfil plasmático<sup>182</sup>. Diferentes resultados de nuestros estudios nos aportan luz sobre la modulación de su metabolismo durante la diálisis, más allá de estas pérdidas.

En el estudio de metabolómica no dirigida se encontró que una variable caracterizada putativamente como aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs, por sus siglas en inglés), presentaba unos valores que diferían significativamente entre líquidos tanto en la medición posdiálisis como en la del rebote, siendo de 8 a 10 veces mayor cuando se utilizó el líquido con citrato en lugar de acetato. Estos son aminoácidos proteínogénicos y tienen diferentes rutas metabólicas (IMAGEN 16).

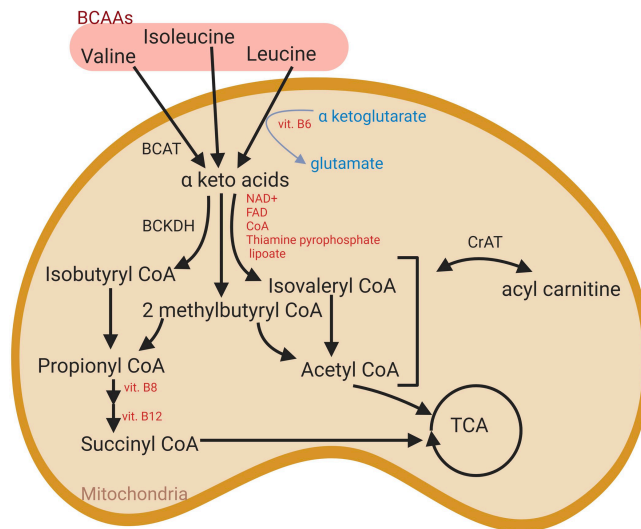


IMAGEN 16. Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada. Reproducido de de Meeüs d'Argenteuil C, Boshuizen B, Oosterlinck M, et al. Flexibility of equine bioenergetics and muscle plasticity in response to different types of training: An integrative approach, questioning existing paradigms. *PLoS One* 2021;16(4):e0249922. CC BY-NC-SA 4.0.

La isoleucina se sintetiza a partir de piruvato y  $\alpha$ -cetobutirato, concentraciones de compuestos que pueden verse afectadas por la ganancia de acetato y citrato durante la diálisis<sup>38</sup>, y se cataboliza a  $\alpha$ -cetoglutarato, que se oxida y se desdobra en propionil-CoA, que posteriormente se convierte en succinil-CoA, un intermediario del ciclo TCA que, a su vez, puede

convertirse en oxaloacetato, que participaría en la gluconeogénesis, y acetyl-CoA, que puede introducirse en el ciclo TCA o utilizarse en la síntesis de cuerpos cetónicos o ácidos grasos<sup>183,184</sup>.

Por su parte, la leucina estimula especialmente la síntesis de proteínas, aumenta la reutilización de aminoácidos en muchos órganos e inhibe la degradación de las proteínas, algo que se ve favorecido porque también induce la liberación de insulina<sup>185-188</sup>. Sin embargo, al igual que otros BCAA, este efecto se asocia con resistencia a la insulina a largo plazo<sup>186,189,190</sup>. Además, dadas sus propiedades cetogénicas, la leucina es una importante fuente de calorías y podría considerarse una fuente de energía incluso más importante que la glucosa<sup>191</sup>. Así mismo, la leucina es un componente importante de las subunidades de la ferritina y de otras proteínas "tampón"<sup>192</sup>, y es necesaria en estados de estrés como la cirugía, los traumatismos, la cirrosis, las infecciones o la fiebre<sup>193</sup>, no solo como fuente de energía sino, también, por su potencial capacidad de atenuar la respuesta inflamatoria<sup>194-196</sup>. La ERC y la HD también podrían considerarse estados de estrés, aunque el papel de la leucina en estos escenarios específicos aún está por estudiar.

Del mismo modo, cuando se utilizó el líquido con ácido cítrico, se produjo una disminución significativa de la intensidad relativa de otros dos metabolitos, el ácido 2,3,4,5-Tetrahidro-2-piridincarboxílico y el ácido D-1-Piperideina-2-carboxílico, que desempeñan un papel clave en la degradación de la lisina<sup>197,198</sup>, un aminoácido esencial necesario para la formación de proteínas que juega un papel importante en la absorción de

calcio, la formación de proteínas musculares, la recuperación de condiciones de estrés y la producción de hormonas, enzimas y anticuerpos<sup>199</sup>.

El glutamato desempeña un papel importante en el metabolismo energético y en la síntesis de varios aminoácidos, ácidos nucleicos y cofactores. Puede convertirse en 2-oxoglutarato mediante la glutamato deshidrogenasa, metabolito que, como ya se ha comentado, aumenta durante las sesiones de diálisis. Por su parte, el ácido glutárico se produce durante el metabolismo de algunos aminoácidos, como la lisina y el triptófano.

Tanto glutarato como glutamato disminuyeron durante la diálisis en nuestro estudio, aunque, solo cuando se utilizó el líquido con ácido cítrico, la reducción del glutamato alcanzó significación estadística. De hecho, como se comentó antes, los niveles de 2-oxoglutarato utilizando este líquido eran mayores que con el de acetato. Los niveles de glutarato previos a la diálisis son superiores a los fisiológicos<sup>161</sup>, mientras que los de glutamato, inferiores<sup>200</sup>. Esto refleja la inhibición del metabolismo de los aminoácidos, lo que compensaría parcialmente sus elevadas pérdidas observadas durante las sesiones<sup>201,202</sup>.

## 4.9 Toxinas urémicas

---

Se identificaron algunos metabolitos que podrían etiquetarse como toxinas urémicas según el Grupo de Trabajo Europeo sobre Toxinas Urémicas<sup>203</sup>. Se caracterizaron putativamente los fenoles, de los cuales el p-cresol, un

metabolito del metabolismo de los aminoácidos aromáticos producido por la microbiota intestinal (principalmente las enterobacterias), parece ser la forma isomérica más plausible. En las concentraciones encontradas en condiciones de uremia, el p-cresol inhibe la función fagocítica y disminuye la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales estimuladas por citocinas<sup>204</sup>. También se ha reportado que tiene varios efectos tóxicos<sup>205</sup>. Aunque medido como reducción de intensidad relativa, en 0,16 veces, en nuestro estudio, esto representaría un 84% de eliminación que difiere del 30% descrito previamente en hemodiálisis de alto flujo<sup>205</sup>.

Otras toxinas urémicas detectadas fueron<sup>203</sup>: N1-metil-2-piridona-5-carboxamida, que es un producto de la degradación de la NAD que produce la inhibición de la PARP-1, lo que a su vez conduce al fracaso de la reparación del ADN<sup>206,207</sup>, y que también se ha relacionado con los cánceres colorrectales y la pelagra<sup>208,209</sup>; y la N-(3-acetamidopropil)pirrolidina-2-ona, cuyos niveles aumentan en el linfoma no Hodgkin<sup>210,211</sup> y es un producto catabólico de la espermidina que se ha identificado como un biomarcador de la disminución del filtrado glomerular. Además, la creatinina y el fosfato de hidrógeno también se eliminaron significativamente durante la diálisis.

Cuando se utilizó el líquido con ácido cítrico, se identificaron tres toxinas urémicas más que presentaban cambios significativos: el N-óxido de trimetilamina (TMAO), el fenol y el ácido hipúrico<sup>203</sup>. El TMAO es un producto de oxidación de la trimetilamina derivado de la conversión de la ingesta dietética de lecitina o carnitina por la microbiota intestinal<sup>212</sup>. El organismo lo utiliza como osmolito para contrarrestar los efectos del



aumento de la concentración de urea<sup>213</sup>. Si esta diferencia es consecuencia de una mejor dosis de diálisis utilizando el líquido de citrato o de un efecto metabólico no puede definirse con este estudio, pero el aumento de los niveles de TMAO se asocia a un incremento del depósito de colesterol<sup>214</sup> y al riesgo de sufrir eventos cardiovasculares<sup>212</sup>; por tanto, cuanto mayor sea el aclaramiento, mayor será el beneficio cardiovascular conseguido<sup>215</sup>.

#### 4.10 Otras variables medidas

---

Entre las 31 variables metabólicas identificadas en el estudio de metabolómica no dirigida, siete de ellas no pudieron ser anotadas y permanecen desconocidas. Una de ellas, concretamente la *m/z* 539,9853, resulta de gran interés por ser la única que incrementa su intensidad en 2,87 veces, lo que refleja que su producción durante la diálisis con ácido cítrico supera su aclaramiento en el dializador.

Por otra parte, se identifican algunas variables metabólicas sin potencial implicación clínica. Se trata de compuestos que actúan como componentes de la dieta, elementos que se encuentran en los alimentos de origen vegetal o se usan como aditivos alimentarios, algunos principios activos o sus derivados, e incluso otras sustancias químicas que manifiestan exposiciones ambientales. Entre estos grupos destacan el ácido DL-2-aminooctanoico, un aminoácido que se ha relacionado con el cáncer colorrectal<sup>209</sup>; el neocaspireno, que es un monoterpenoide, constituyente lipídico de la membrana celular, pero también un aditivo alimentario; y la L-isoleucyl-L-

prolina, que es un producto de descomposición incompleta de la digestión de las proteínas o del catabolismo proteico y se ha relacionado con el asma<sup>216</sup>. Estos tres metabolitos se redujeron durante la sesión de diálisis sin diferencia entre un líquido u otro. Por su parte, el adrenocromo, un producto de oxidación de la adrenalina adquirida por ingestión solo pareció reducirse de forma estadísticamente significativa cuando se utilizó líquido con citrato.

#### 4.11 Limitaciones

---

En términos generales, los trabajos publicados comparten tres limitaciones o potenciales sesgos: que incluyen pacientes con diferentes accesos vasculares, diferentes filtros y diferentes modalidades de HD (HD y HDF); y que no se realizaron análisis del efluente, con lo que no se puede evaluar con certeza el balance, consumo o generación ni de las variables analíticas clásicas ni de los metabolitos, ya que estos se dializan con un coeficiente de cribado de aproximadamente 1 y no podemos definir cuanto impacta su eliminación por diálisis frente al consumo o generación en una vía metabólica concreta <sup>25</sup>; y, por último, se establecieron ciertos tiempos de medición de acuerdo con estudios previos y el rebote teórico de urea, pero un mayor número de mediciones hubiera aportado más información sobre la cinética de las variables medidas.

La principal limitación del estudio focalizado en el perfil inflamatorio y balance cálcico es que no se midieron los niveles de magnesio posdiálisis, ya que, como se comentó en la introducción, la capacidad del citrato como

quelante del magnesio puede inducir hipomagnesemia y aumentar, consecuentemente, la mortalidad de los pacientes. Además, falta información para conocer el balance de calcio exacto, por lo que serán necesarios futuros estudios para evaluar el equilibrio exacto del calcio con uno u otro líquidos y su impacto a largo plazo en los resultados clínicos.

En el trabajo de metabolómica dirigida, el número de metabolitos medidos fue limitado, por lo que es posible que se haya pasado por alto la modulación de otras rutas metabólicas importantes.

En el trabajo de metabolómica no dirigida la principal limitación es que solo se realizó en el modo de ionización por electrospray positivo, lo que puede haber dejado sin identificar metabolitos que solo se hubieran podido medir en modo negativo. Además, nuestros datos solo determinan tendencias o cambios en las intensidades de respuesta, pero no cantidades exactas. Por último, no continuamos con una fase de validación de cada metabolito anotado.



# 5

## Conclusiones



A partir de los resultados de la presente Tesis Doctoral y su discusión se derivan las siguientes conclusiones:

- El uso de ácido cítrico en lugar de acético como ácido débil para evitar la precipitación de sales de bicarbonato constituye un líquido de diálisis más biocompatible que proporciona ventajas en términos de riesgo cardiovascular. Los niveles de calcio iónico medidos reflejan un efecto neutro o negativo en el balance de calcio, lo que conllevaría una menor calcificación vascular en comparación con el líquido con ácido acético.
- Este líquido con ácido cítrico también mejora el perfil inflamatorio de estos pacientes, lo que, de nuevo, puede considerarse una característica que le otorga mayor biocompatibilidad.
- La diálisis, *per se*, induce cambios en el metabolismo intermedio por la alta dializabilidad de los metabolitos, pero también por el metabolismo del acetato o citrato del líquido de diálisis. Los resultados obtenidos, en este sentido, muestran una inhibición de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, un aumento de la cetogénesis, y una menor degradación de aminoácidos que, en conjunto, apuntan hacia una priorización del metabolismo del citrato o el acetato por el ciclo TCA como fuente de combustible celular. En este mismo sentido, el líquido de diálisis con ácido cítrico mostró una reducción de los niveles de dos de los intermediarios de la vía de degradación de la lisina.

- El uso del líquido con ácido cítrico, en comparación con el de acético, resultó en unos niveles posdiálisis mayores de aminoácidos de cadena ramificada.
  
- El líquido de diálisis con ácido acético redujo significativamente los niveles de acilcarnitinas en comparación con el de cítrico, algo que podría considerarse beneficioso dado que su acumulación ha demostrado relacionarse con malos resultados clínicos.
  
- El líquido de diálisis con ácido cítrico, en comparación con el de acético, consigue un mejor aclaramiento de ciertas toxinas urémicas ya conocidas, entre ellas, TMAO.
  
- No pudimos identificar la única variable metabólica cuyos niveles aumentaron durante la sesión de diálisis solo con el líquido con ácido cítrico, lo que refleja que su producción durante la diálisis con este supera su aclaramiento en el dializador.
  
- Estas diferencias necesitan ser estudiadas más a fondo para entender mejor los procesos bioquímicos que la diálisis y, en concreto, los componentes del líquido de diálisis inducen en el metabolismo del paciente, lo que llevaría a prescripciones de tratamiento más personalizadas.







# 6

## Bibliografía



1. Graham T. X. Liquid diffusion applied to analysis. *Philos Trans R Soc Lond.* 1861;151:183-224. doi:10.1098/RSTL.1861.0011
2. Gottschalk CW, Fellner SK. History of the Science of Dialysis. *Am J Nephrol.* 1997;17(3-4):289-298. doi:10.1159/000169116
3. Haas G. Versuche der Blutauswaschung am Lebenden mit Hilfe der Dialyse. *Klinische Wochenschrift.* 1925;4(1):13-14. doi:10.1007/BF01745400
4. Álvarez-Ude F. Hemodiálisis: Evolución histórica y consideraciones generales. *Nefrología.* 1996;16(Suppl. 4):25-36.
5. The History of Dialysis by Fresenius Medical Care. Available at: <https://www.fresenius.com/history-of-dialysis>. Accessed December 18, 2022.
6. Ronco C, Brendolan A, Crepaldi C, Rodighiero M, Scabardi M. Blood and Dialysate Flow Distributions in Hollow-Fiber Hemodialyzers Analyzed by Computerized Helical Scanning Technique. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(Suppl. 1):S53-S61. doi:10.1681/ASN.V13SUPPL\_1S53
7. Maduell F, Moreso F, Pons M, et al. High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(3):487-497. doi:10.1681/ASN.2012080875
8. Maduell F, Broseta JJ. Hemodiafiltration (HDF) versus expanded hemodialysis (HDx). *Semin Dial.* 2022;35(5):436-439. doi:10.1111/SDI.13071
9. Canaud B, Bowry SK. Emerging clinical evidence on online hemodiafiltration: does volume of ultrafiltration matter? *Blood Purif.* 2013;35(1-3):55-62. doi:10.1159/000345175
10. Maduell F. Hemodiafiltration versus conventional hemodialysis: Should “conventional” be redefined? *Semin Dial.* 2018;31(6). doi:10.1111/sdi.12715
11. Basile C, Lomonte C. A neglected issue in dialysis practice: haemodialysate. *Clin Kidney J.* 2015;8(4):393. doi:10.1093/CKJ/SFV038
12. Petitclerc T, Diab R, le Roy F, Mercadal L, Hmida J. Hémodialyse sans acétate: qu'est-ce vraiment? *Nephrol Ther.* 2011;7(2):92-98. doi:10.1016/j.nephro.2010.10.008
13. McGill RL, Weiner DE. Dialysate Composition for Hemodialysis: Changes and Changing Risk. *Semin Dial.* 2017;30(2):112-120. doi:10.1111/sdi.12573
14. Basile C, Rossi L, Lomonte C. Dialysate bicarbonate concentration: Too much of a good thing? *Semin Dial.* 2018;31(6):576-582. doi:10.1111/SDI.12716
15. Pérez-García R, Jaldo MT, Puerta M, et al. La hipomagnesemia en hemodiálisis se asocia a mayor riesgo de mortalidad: su relación con el líquido de diálisis. *Nefrología.* 2020;40(5):552-562. doi:10.1016/J.NEFRO.2020.04.013

16. van der Sande FM, ter Meulen KJA, Kotanko P, et al. Dialysate Calcium Levels: Do They Matter? *Blood Purif.* 2019;47(1-3):1-6. doi:10.1159/000494584
17. Maduell F, Rodríguez N, Arias-Guillén M, et al. Dialysate calcium individualisation: A pending issue. *Nefrología.* 2012;32(5):579-586. doi:10.3265/Nefrología.pre2012.May.11391
18. Maduell F, Broseta JJ, Casals J, et al. Variaciones de la conductividad y cambios en el sodio plasmático durante hemodiálisis relacionado con el cambio de monitor. *Nefrología.* Published online August 2022. doi:10.1016/J.NEFRO.2022.08.001
19. Sargent JA, Marano M, Marano S, Gennari FJ. Changing dialysate composition to optimize acid-base therapy. *Semin Dial.* 2019;32(3). doi:10.1111/sdi.12779
20. Thornley-Brown D, Saha M. Dialysate content and risk of sudden cardiac death. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(6):557-562. doi:10.1097/MNH.000000000000177
21. Kraut JA, Madias NE. Metabolic Acidosis of CKD: An Update. *Am J Kidney Dis.* 2016;67(2):307-317. doi:10.1053/J.AJKD.2015.08.028
22. Hernández-Jaras J. Balance ácido-base en pacientes en hemodiálisis. *Diálisis y Trasplante.* 1998;19(2):10-18.
23. Mion CM, Hegstrom RM, Boen ST, Scribner BH. Substitution of sodium acetate for sodium bicarbonate in the bath fluid for hemodialysis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1964;10:110-115.
24. Amore A, Cirina P, Mitola S, et al. Acetate intolerance is mediated by enhanced synthesis of nitric oxide by endothelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(9):1431-1436. doi:10.1681/ASN.V891431
25. Yamakawa M, Yamamoto T, Kishimoto T, et al. Serum levels of acetate and TCA cycle intermediates during hemodialysis in relation to symptoms. *Nephron.* 1982;32(2):155-161. doi:10.1159/000182836
26. Dao M, Touam M, Joly D, Mercadal L. Nouveaux dialysats: quel acide dans le bain de dialyse? *Nephrol Ther.* 2019;15:S91-S97. doi:10.1016/J.NEPHRO.2019.02.003
27. Tolchin N, Roberts JL, Hayashi J, Lewis EJ. Metabolic consequences of high mass-transfer hemodialysis. *Kidney Int.* 1977;11(5):366-378. doi:10.1038/KI.1977.54
28. Vinay P, Prud'Homme M, Vinet B, et al. Acetate metabolism and bicarbonate generation during hemodialysis: 10 years of observation. *Kidney Int.* 1987;31(5):1194-1204. doi:10.1038/KI.1987.128
29. Uribarri J, Oh MS. Alkali delivery in chronic hemodialysis: Would more acetate be helpful? *Semin Dial.* 2019;32(3):229-231. doi:10.1111/SDI.12791
30. Vinay P, Cardoso M, Tejedor A, et al. Acetate metabolism during hemodialysis: Metabolic considerations. *Am J Nephrol.* 1987;7(5):337-354. doi:10.1159/000167500

31. Lundquist F. Production and utilization of free acetate in man. *Nature*. 1962;193(4815):579-580. doi:10.1038/193579Bo
32. Kishimoto T, Yamamoto T, Yamamoto K, et al. Acetate Kinetics during Hemodialysis and Hemofiltration. *Blood Purif*. 1984;2(2):81-87. doi:10.1159/000169316
33. Hmida J, Balma A, Lebben I, Hichri N, Dhahri M. Evaluation clinique a moyen terme de la technique de biofiltration sans acetate a 84% chez les malades insuffisants renaux chroniques. *Tunis Med*. 2002;80(8):473-484.
34. Sargent JA, Marano M, Marano S, Gennari FJ. Acid-base homeostasis during hemodialysis: New insights into the mystery of bicarbonate disappearance during treatment. *Semin Dial*. 2018;31(5):468-478. doi:10.1111/SDL.12714
35. Cuadrado E, Broseta JJ, Rodríguez-Espinosa D, et al. Tailoring the dialysate bicarbonate eliminates pre-dialysis acidosis and post-dialysis alkalosis. *Clin Kidney J*. 2022;15(10):1946-1951. doi:10.1093/CKJ/SFAC128
36. Montagud-Marrahi E, Broseta J, Rodriguez-Espinosa D, et al. Optimization of dialysate bicarbonate in patients treated with online haemodiafiltration. *Clin Kidney J*. 2021;14(3):1004-1013. doi:10.1093/ckj/sfaa058
37. Sánchez-Canel JJ, Hernández-Jaras J, Pons-Prades R. A Randomized Controlled Study on the Effects of Acetate-Free Biofiltration on Organic Anions and Acid-Base Balance in Hemodialysis Patients. *Ther Apher Dial*. 2015;19(1):63-72. doi:10.1111/1744-9987.12180
38. Hernández-Jaras J, Estrada A, García-Cantón C, Traver J. Equilibrio ácido-base y aniones orgánicos: diferencias en biofiltración con acetato (bf) y hemodiálisis con bicarbonato. *Nefrología*. 1994;14(5):591-597.
39. Cai L, Sutter BM, Li B, Tu BP. Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. *Mol Cell*. 2011;42(4):426-437. doi:10.1016/J.MOLCEL.2011.05.004
40. Devlin TM. *Bioquímica: Libro de Texto Con Aplicaciones Clínicas*. 4<sup>th</sup> ed. Reverté; 2004.
41. Matsuyama K, Tomo T, Kadota JI. Acetate-free blood purification can impact improved nutritional status in hemodialysis patients. *J Artif Organs*. 2011;14(2):112-119. doi:10.1007/s10047-010-0551-7
42. Tomo T, Shinoda T. Biocompatibility of Dialysis Fluid for Online HDF. *Contrib Nephrol*. 2011;168:89-98. doi:10.1159/000321747
43. Pizzarelli F, Cerrai T, Dattolo P, Ferro G. On-line haemodiafiltration with and without acetate. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(6):1648-1651. doi:10.1093/NDT/GFK093
44. Tiranathanagul K, Tangvoraphonkchai K, Srisawat N, et al. Acute intradialytic cardiac function and inflammatory cytokine changes during high-efficiency online hemodiafiltration with

- acetate-free and standard dialysis solutions. *Ther Apher Dial.* 2015;19(3):250–258. doi:10.1111/1744-9987.12271
45. Dalal S, Yu AW, Gupta DK, Kar PM, Ing TS, Daugirdas JT. L-lactate high-efficiency hemodialysis: Hemodynamics, blood gas changes, potassium/phosphorus, and symptoms. *Kidney Int.* 1990;38(5):896–903. doi:10.1038/ki.1990.288
  46. Veech R. The untoward effects of the anions of dialysis fluids. *Kidney Int.* 1988;34(5):587–597. doi:10.1038/ki.1988.223
  47. Tian JH, Ma B, Yang K, Liu Y, Tan J, Liu TX. Bicarbonate- versus lactate-buffered solutions for acute continuous haemodiafiltration or haemofiltration. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(3):CD006819. doi:10.1002/14651858.CD006819.pub2
  48. Tan HK, Uchino S, Bellomo R. The acid-base effects of continuous hemofiltration with lactate or bicarbonate buffered replacement fluids. *Int J Artif Organs.* 2003;26(6):477–483. doi:10.1177/039139880302600605
  49. Cherukuri S, Bajo M, Colussi G, et al. Home hemodialysis treatment and outcomes: Retrospective analysis of the Knowledge to Improve Home Dialysis Network in Europe (KIHDNEy) cohort 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences. *BMC Nephrol.* 2018;19(1):262. doi:10.1186/s12882-018-1059-2
  50. Santoro A, Guarnieri F, Ferramosca E, Grandi F. Acetate-Free Biofiltration. *Contrib Nephrol.* 2007;158:138–152. doi:10.1159/000107244
  51. Apter C, Seigneuric B, Darres A, et al. Acetate-Free Biofiltration Versus Online Acetate-Free Hemodiafiltration in Patients at High Risk of Hemodialysis Intolerance. *Kidney Int Rep.* 2022;7(5):1108–1111. doi:10.1016/j.ekir.2022.01.1056
  52. Amore A, Cirina P, Bonaudo R, Conti G, Chiesa M, Coppe R. Bicarbonate dialysis, unlike acetate-free biofiltration, triggers mediators of inflammation and apoptosis in endothelial and smooth muscle cells. *J Nephrol.* 2006;19(1):57–64.
  53. Verzetti G, Navino C, Bolzani R, Galli G, Panzetta G. Acetate-free biofiltration versus bicarbonate haemodialysis in the treatment of patients with diabetic nephropathy: A cross-over multicentric study. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(4):955–961. doi:10.1093/ndt/13.4.955
  54. Tessitore N, Santoro A, Panzetta GO, et al. Acetate-free biofiltration reduces intradialytic hypotension: a European multicenter randomized controlled trial. *Blood Purif.* 2012;34(3-4):354–363. doi:10.1159/000346293
  55. Movilli E, Camerini C, Zein H, et al. A prospective comparison of bicarbonate dialysis, hemodiafiltration, and acetate-free biofiltration in the elderly. *Am J Kidney Dis.* 1996;27(4):541–547. doi:10.1016/S0272-6386(96)90165-1
  56. Fournier G, Potier J, Thébaud HE, Majdalani G, Ton-That H, Man NK. Substitution of acetic acid for hydrochloric acid in the bicarbonate buffered dialysate. *Artif Organs.* 1998;22(7):608–613. doi:10.1046/J.1525-1594.1998.06205.X



57. Coll E, Pérez García R, Rodríguez-Benítez P, et al. Cambios clínicos y analíticos al sustituir el líquido de diálisis convencional por uno sin acetato. *Nefrología*. 2007;27(6):661-804.
58. Higuchi T, Yamamoto C, Kuno T, et al. A comparison of bicarbonate hemodialysis, hemodiafiltration, and acetate-free biofiltration on cytokine production. *Ther Apher Dial*. 2004;8(6):460-467. doi:10.1111/J.1774-9979.2004.00194.X
59. Todeschini M, Macconi D, Fernández NG, et al. Effect of acetate-free biofiltration and bicarbonate hemodialysis on neutrophil activation. *Am J Kidney Dis*. 2002;40(4):783-793. doi:10.1053/AJKD.2002.35690
60. Bolasco P, Ghezzi PM, Serra A, et al. Effects of acetate-free haemodiafiltration (HDF) with endogenous reinfusion (HFR) on cardiac troponin levels. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(1):258-263. doi:10.1093/ndt/gfq359
61. Pizzarelli F. Paired Hemodiafiltration. *Contrib Nephrol*. 2007;158:131-137. doi:10.1159/000107243
62. Coll E, Pérez-García R, Martín de Francisco AL, et al. PHF on-line sin acetato: Cómo mejorar la hiperacetatemia y la tolerancia hemodinámica. *Nefrología*. 2009;29(2):156-162. doi:10.3265/NEFROLOGIA.2009.29.2.4969.EN.FULL
63. Ahmad S, Callan R, Cole J, Blagg C. Dialysate made from dry chemicals using citric acid increases dialysis dose. *Am J Kidney Dis*. 2000;35(3):493-499. doi:10.1016/S0272-6386(00)70203-4
64. Marcelli D, Basile C. Has time come to replace the residual acetate with citrate in the dialysis fluid? *J Nephrol*. 2022;35(1):87-90. doi:10.1007/S40620-021-00991-6
65. Rocha AD, Padua VC, Oliveira E, Guimaraes MM, Lugon JR, Strogoff de Matos JP. Effects of citrate-enriched bicarbonate based dialysate on anticoagulation and dialyzer reuse in maintenance hemodialysis patients. *Hemodial Int*. 2014;18(2):467-472. doi:10.1111/hdi.12113
66. Schmitz M, Loke O, Fach B, et al. Effects of citrate dialysate in chronic dialysis: A multicentre randomized crossover study. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(8):1327-1334. doi:10.1093/ndt/gfv347
67. Tanaka Y, Shima H, Hatonari R, et al. Effects of on-line hemodiafiltration regimens and dialysate composition on serum concentrations of magnesium and calcium ions. *Ren Replace Ther*. 2021;7(1):1-12. doi:10.1186/s41100-021-00345-9
68. Gotch F, Kotanko P, Handelman G, Levin N. A kinetic model of calcium mass balance during dialysis therapy. *Blood Purif*. 2007;25(1):139-149. doi:10.1159/000096891
69. Gotch F, Levin NW, Kotanko P. Calcium balance in dialysis is best managed by adjusting dialysate calcium guided by kinetic modeling of the interrelationship between calcium intake, dose of vitamin D analogues and the dialysate calcium concentration. *Blood Purif*. 2010;29(2):163-176. doi:10.1159/000245924
70. Azpiazu D, González-Parra E, Ortíz A, Egido J, Villa-Bellosta R. Impact of post-dialysis calcium level on ex vivo rat aortic wall calcification. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183730. doi:10.1371/journal.pone.0183730

71. de Sequera Ortiz P, Albalate Ramón M, Pérez-García R, et al. Efecto agudo del baño con citrato sobre la alcalemia postdiálisis. *Nefrología*. 2015;35(2):164-171. doi:10.1016/j.nefro.2014.10.001
72. Pérez-García R, Albalate M, Sequera P, Ortega M. El balance de calcio es menor con un líquido de diálisis con citrato que con acetato. *Nefrología*. 2017;37(1):109-110. doi:10.1016/J.NEFRO.2016.09.017
73. Aniert J, Chupin L, Cîndea N. Mathematical model of calcium exchange during haemodialysis using a citrate containing dialysate. *Math Med Biol*. 2018;35(Suppl. 1):87-120. doi:10.1093/IMAMMB/DQX013
74. Šafránek R, Moučka P, Vávrová J, Palička V, Pavlíková L, Sulková SD. Changes of serum calcium, magnesium and parathyroid hormone induced by hemodialysis with citrate-enriched dialysis solution. *Kidney Blood Press Res*. 2015;40(1):13-21. doi:10.1159/000368478
75. Sakaguchi Y, Fujii N, Shoji T, Hayashi T, Rakugi H, Isaka Y. Hypomagnesemia is a significant predictor of cardiovascular and non-cardiovascular mortality in patients undergoing hemodialysis. *Kidney Int*. 2014;85(1):174-181. doi:10.1038/KI.2013.327
76. Schmaderer C, Braunisch MC, Suttman Y, et al. Reduced Mortality in Maintenance Haemodialysis Patients on High versus Low Dialysate Magnesium: A Pilot Study. *Nutrients*. 2017;9(9):926. doi:10.3390/NU9090926
77. Vida C, Carracedo J, Sequera P de, et al. A high magnesium concentration in citrate dialysate prevents oxidative stress and damage in human monocytes in vitro. *Clin Kidney J*. 2021;14(5):1403. doi:10.1093/CKJ/SFAA131
78. de Sequera Ortiz P, Pérez García R, Molina Nuñez M, et al. Estudio prospectivo aleatorizado multicéntrico para demostrar los beneficios de la hemodiálisis sin acetato (con citrato): Estudio ABC-treat. Efecto agudo del citrato. *Nefrología*. 2019;39(4):424-433. doi:10.1016/j.nefro.2018.11.002
79. Kuragano T, Furuta M, Yahiro M, et al. Acetate free citrate-containing dialysate increase intact-PTH and BAP levels in the patients with low intact-PTH. *BMC Nephrol*. 2013;14:18. doi:10.1186/1471-2369-14-18
80. Gubensek J, Orsag A, Ponikvar R, Buturovic-Ponikvar J. Calcium Mass Balance during Citrate Hemodialysis: A Randomized Controlled Trial Comparing Normal and Low Ionized Calcium Target Ranges. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168593. doi:10.1371/journal.pone.0168593
81. de Sequera P, Pérez-García R, Molina M, et al. Ventajas del uso de citrato respecto al acetato como estabilizante en el líquido de hemodiálisis: estudio aleatorizado ABC-treat. *Nefrología*. 2022;42:327-337. doi:10.1016/j.nefro.2021.06.006
82. Ficociello LH, Zhou M, Mullon C, Anger MS, Kossman RJ. Effect of Citrate-Acidified Dialysate on Intact Parathyroid Hormone in Prevalent Hemodialysis Patients: A Matched Retrospective Cohort Study. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2021;14:475-486. doi:10.2147/IJNRD.S340028

83. Nilsson A, Sternby J, Grundström G, Alquist M. SP413 Citrate dialysis fluid and calcium mass balance. Extracorporeal dialysis: techniques and adequacy - A. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(Suppl. 1):202-213. doi:10.1093/ndt/gft116
84. Grundström G, Christensson A, Alquist M, Nilsson LG, Segelmark M. Replacement of acetate with citrate in dialysis fluid: A randomized clinical trial of short term safety and fluid biocompatibility. *BMC Nephrol*. 2013;14(1):1-9. doi:10.1186/1471-2369-14-216
85. Trakarnvanich T, Thirathanakul S, Sriphueng N, et al. The effect of citrate on clot formation, dialyzer reuse, and anemia in hemodialysis patients. *Blood Purif*. 2019;47(4):361-368. doi:10.1159/000495025
86. Molina Nuñez M, de Alarcón R, Roca S, et al. Citrate versus acetate-based dialysate in on-line haemodiafiltration. A prospective cross-over study. *Blood Purif*. 2015;39(1-3):181-187. doi:10.1159/000371569
87. Aniot J, Petitclerc T, Créput C. Safe use of citric acid-based dialysate and heparin removal in postdilution online hemodiafiltration. *Blood Purif*. 2012;34(3-4):336-343. doi:10.1159/000345342
88. Gabutti L, Lucchini B, Marone C, Alberio L, Burnier M. Citrate- vs. acetate-based dialysate in bicarbonate haemodialysis: Consequences on haemodynamics, coagulation, acid-base status, and electrolytes. *BMC Nephrol*. 2009;10:7. doi:10.1186/1471-2369-10-7
89. Sarnak MJ, Amann K, Bangalore S, et al. Chronic Kidney Disease and Coronary Artery Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(14):1823-1838. doi:10.1016/j.jacc.2019.08.1017
90. Wanner C, Amann K, Shoji T. The heart and vascular system in dialysis. *Lancet*. 2016;388(10041):276-284. doi:10.1016/S0140-6736(16)30508-6
91. Webster AC, Nagler E v., Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*. 2017;389(10075):1238-1252. doi:10.1016/S0140-6736(16)32064-5
92. Cozzolino M, Mangano M, Stucchi A, Ciceri P, Conte F, Galassi A. Cardiovascular disease in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(Suppl. 3):28-34. doi:10.1093/ndt/gfy174
93. Levin A, Stevens PE, Bilous RW, et al. Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl*. 2013;3:1-150. doi:10.1038/kisup.2012.73
94. Daimon S, Dan K, Kawano M. Comparison of acetate-free citrate hemodialysis and bicarbonate hemodialysis regarding the effect of intra-dialysis hypotension and post-dialysis malaise. *Ther Apher Dial*. 2011;15(5):460-465. doi:10.1111/j.1744-9987.2011.00976.x
95. Kosmadakis G, Correia EDC, Albaret J, Somda F, Aguilera D. Comparison of the hemodynamic tolerance and the biological parameters of four acetate-free hemodialysis methods. *Nephrol Ther*. 2017;13(7):532-536. doi:10.1016/j.nephro.2017.03.002

96. Noris M, Todeschini M, Casiraghi F, et al. Effect of acetate, bicarbonate dialysis, and acetate-free biofiltration on nitric oxide synthesis: Implications for dialysis hypotension. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(1):115-124. doi:10.1053/ajkd.1998.v32.pm9669432
97. ter Meulen KJ, Hermans BJM, van der Sande FM, et al. Effect of citric-acid dialysate on the QTC-interval. *Sci Rep.* 2021;11(1):9909. doi:10.1038/S41598-021-89083-W
98. Lorenz G, Mayer CC, Bachmann Q, et al. Acetate-free, citrate-acidified bicarbonate dialysis improves serum calcification propensity-a preliminary study. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33(11):2043-2051. doi:10.1093/ndt/gfy134
99. Villa-Bellosta R, Hernández-Martínez E, Mérida-Herrero E, González-Parra E. Impact of acetate- or citrate-acidified bicarbonate dialysate on ex vivo aorta wall calcification. *Sci Rep.* 2019;9(1):11374. doi:10.1038/S41598-019-47934-7
100. ter Meulen KJ, Dekker MJE, Pasch A, et al. Citric-acid dialysate improves the calcification propensity of hemodialysis patients: A multicenter prospective randomized cross-over trial. *PLoS One.* 2019;14(12):e0225824. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0225824
101. Miller JE, Kovcsdy CP, Norris KC, et al. Association of cumulatively low or high serum calcium levels with mortality in long-term hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2010;32(5):403-413. doi:10.1159/000319861
102. Pun PH, Horton JR, Middleton JP. Dialysate calcium concentration and the risk of sudden cardiac arrest in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(5):797-803. doi:10.2215/CJN.10000912
103. Fisher R, Lei K, Mitchell MJ, et al. The effect of regional citrate anti-coagulation on the coagulation system in critically ill patients receiving continuous renal replacement therapy for acute kidney injury - An observational cohort study. *BMC Nephrol.* 2017;18(1):1-5. doi:10.1186/S12882-017-0718-Z
104. Sands JJ, Kotanko P, Segal JH, et al. Effects of citrate acid concentrate (Citrasate®) on heparin N requirements and hemodialysis adequacy: A multicenter, prospective noninferiority trial. *Blood Purif.* 2012;33(1-3):199-204. doi:10.1159/000334157
105. Dellepiane S, Medica D, Guarena C, et al. Citrate anion improves chronic dialysis efficacy, reduces systemic inflammation and prevents Chemerin-mediated microvascular injury. *Sci Rep.* 2019;9(1):10622. doi:10.1038/S41598-019-47040-8
106. Kossman RJ, Gonzales A, Callan R, Ahmad S. Increased efficiency of hemodialysis with citrate dialysate: A prospective controlled study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(9):1459-1464. doi:10.2215/CJN.02590409
107. Panichi V, Fiaccadori E, Rosati A, et al. Post-dilution on line haemodiafiltration with citrate dialysate: first clinical experience in chronic dialysis patients. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:703612. doi:10.1155/2013/703612

108. Bauer E, Derfler K, Joukhadar C, Druml W. Citrate kinetics in patients receiving long-term hemodialysis therapy. *Am J Kidney Dis.* 2005;46(5):903-907. doi:10.1053/j.ajkd.2005.07.041
109. Cheng YL, Yu AW, Tsang KY, et al. Anticoagulation during haemodialysis using a citrate-enriched dialysate: a feasibility study. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(2):641-646. doi:10.1093/NDT/GFQ396
110. Dolley-Hitze T, Oger E, Hamel D, Lombart ML, Hermès I. Is Anticoagulation Discontinuation Achievable with Citrate Dialysate during HDF Sessions? *Int J Nephrol.* 2016;2016:9185413. doi:10.1155/2016/9185413
111. Ureña-Torres P, Bieber B, Guebre-Egziabher F, et al. Citric Acid-Containing Dialysate and Survival Rate in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney360.* 2021;2(4):666-673. doi:10.34067/kid.0006182020
112. Poppelaars F, Faria B, da Costa MG, et al. The Complement System in Dialysis: A Forgotten Story? *Front Immunol.* 2018;9:71. doi:10.3389/FIMMU.2018.00071
113. Huang S, Sandholm K, Jonsson N, et al. Low concentrations of citrate reduce complement and granulocyte activation in vitro in human blood. *Clin Kidney J.* 2015;8(1):31-37. doi:10.1093/ckj/sfu127
114. Berrón-Pérez R, Penagos-Paniagua MJ, Zaragoza-Benítez JM, Rodríguez-Álvarez J, Blancas-Galicia L. El sistema del complemento. Vías clásica y de la lectina que se une a la manosa. *Alerg Asma Immunol Pediatr.* 2003;12(2):24-30.
115. Levine L, Cowan KM, Osler AG, Mayer MM. Studies on the Role of Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> in Complement Fixation and Immune Hemolysis. II. The Essential Role of Calcium in Complement Fixation. *J Immunol.* 1953;71(5):367-373. doi:10.4049/JIMMUNOL.71.5.367
116. Mares J, Tuma Z, Moravec J, Pavlina R, Matejovic M. Proteins adsorbed to a polysulfone hemodialysis membrane under heparin and citrate anticoagulation regimens. *Artif Organs.* 2019;43(11):1092-1103. doi:10.1111/AOR.13506
117. Raj DSC, Boivin MA, Dominic EA, et al. Haemodialysis induces mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Eur J Clin Invest.* 2007;37(12):971-977. doi:10.1111/J.1365-2362.2007.01886.X
118. Bryland A, Wieslander A, Carlsson O, Hellmark T, Godaly G. Citrate treatment reduces endothelial death and inflammation under hyperglycaemic conditions. *Diab Vasc Dis Res.* 2012;9(1):42-51. doi:10.1177/1479164111424297
119. Pérez-García R, Ramírez Chamond R, de Sequera Ortiz P, et al. El líquido de diálisis con citrato no induce in vitro estrés oxidativo ni inflamación en comparación con el acetato. *Nefrología.* 2017;37:630-7. doi:10.1016/j.nefro.2017.03.024
120. Pizzarelli F, Cantaluppi V, Panichi V, et al. Citrate high volume on-line hemodiafiltration modulates serum Interleukin-6 and Klotho levels: the multicenter randomized controlled study "Hephaestus." *J Nephrol.* 2021;34(5):1701-1710. doi:10.1007/S40620-020-00943-6

121. Masuda A, Hagiwara S, Tanimoto M, et al. Effects of acetate-free citrate dialysate on glycooxidation and lipid peroxidation products in hemodialysis patients. *Nephron Extra*. 2012;2(1):256-268. doi:10.1159/000342258
122. Jung SW, Kim DR, Cho KS, et al. Effects of Dialysate Acidification With Citrate Versus Acetate on Cell Damage, Uremic Toxin Levels, and Inflammation in Patients Receiving Maintenance Hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 2019;73(3):432-434. doi:10.1053/J.AJKD.2018.09.010
123. Kuragano T, Kida A, Furuta M, et al. Effects of Acetate-Free Citrate-Containing Dialysate on Metabolic Acidosis, Anemia, and Malnutrition in Hemodialysis Patients. *Artif Organs*. 2012;36(3):282-290. doi:10.1111/j.1525-1594.2011.01349.x
124. Williams NC, O'Neill LAJ. A role for the krebs cycle intermediate citrate in metabolic reprogramming in innate immunity and inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:141. doi:10.3389/FIMMU.2018.00141
125. Roca M, Alcoriza MI, Garcia-Cañaveras JC, Lahoz A. Reviewing the metabolome coverage provided by LC-MS: Focus on sample preparation and chromatography-A tutorial. *Anal Chim Acta*. 2021;1147:38-55. doi:10.1016/J.ACA.2020.12.025
126. Veerappa S, McClure J. Intermediary metabolism. *Anaesth Intensive Care*. 2020;21(3):162-167. doi:10.1016/J.MPAIC.2020.01.003
127. Ferreira LMR, Li AM, Serafim TL, Sobral MC, Alpoim MC, Urbano AM. Intermediary metabolism: An intricate network at the crossroads of cell fate and function. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(10):165887. doi:10.1016/J.BBADIS.2020.165887
128. Hocher B, Adamski J. Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(5):269-284. doi:10.1038/NRNEPH.2017.30
129. Sharma K, Karl B, Mathew A v., et al. Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(11):1901-1912. doi:10.1681/ASN.2013020126
130. Durantou F, Lundin U, Gayraud N, et al. Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(1):37-45. doi:10.2215/CJN.06000613
131. Hallan S, Afkarian M, Zelnick LR, et al. Metabolomics and Gene Expression Analysis Reveal Down-regulation of the Citric Acid (TCA) Cycle in Non-diabetic CKD Patients. *EBioMedicine*. 2017;26:68-77. doi:10.1016/J.EBIOM.2017.10.027
132. Oto J, Fernández-Pardo Á, Roca M, et al. Urine metabolomic analysis in clear cell and papillary renal cell carcinoma: A pilot study. *J Proteomics*. 2020;218:103723. doi:10.1016/J.JPROT.2020.103723
133. Zhu S, Zhang F, Shen AW, et al. Metabolomics Evaluation of Patients With Stage 5 Chronic Kidney Disease Before Dialysis, Maintenance Hemodialysis, and Peritoneal Dialysis. *Front Physiol*. 2021;11:630646. doi:10.3389/FPHYS.2020.630646

134. Stegmayr B. Dialysis Procedures Alter Metabolic Conditions. *Nutrients*. 2017;9(6):548. doi:10.3390/NU9060548
135. Kalantari S, Nafar M. An update of urine and blood metabolomics in chronic kidney disease. *Biomark Med*. 2019;13(7):577-597. doi:10.2217/BMM-2019-0008
136. Kurella Tamura M, Chertow G, Depner T, et al. Metabolic Profiling of Impaired Cognitive Function in Patients Receiving Dialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(12):3780-3787. doi:10.1681/ASN.2016010039
137. Hu J, Grams M, Coresh J, et al. Serum Metabolites and Cardiac Death in Patients on Hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019;14(5):747-749. doi:10.2215/CJN.12691018
138. Choi JY, Yoon YJ, Choi HJ, et al. Dialysis modality-dependent changes in serum metabolites: accumulation of inosine and hypoxanthine in patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(4):1304-1313. doi:10.1093/NDT/GFQ554
139. Sato E, Kohno M, Yamamoto M, Fujisawa T, Fujiwara K, Tanaka N. Metabolomic analysis of human plasma from haemodialysis patients. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(3):241-255. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02398.x
140. Kim HJ, Seong EY, Lee W, et al. Comparative analysis of therapeutic effects between medium cut-off and high flux dialyzers using metabolomics and proteomics: exploratory, prospective study in hemodialysis. *Sci Rep*. 2021;11(1):1-12. doi:10.1038/s41598-021-96974-5
141. Séret G, Durand PY, El-Haggan W, et al. Impact of Long-Term Citrate Dialysate Use on Survival in Haemodialysis Patients. *Blood Purif*. 2020;49(6):765-766. doi:10.1159/000502939
142. Neri L, Bellocchio F, Kircelli F, et al. Long-term mortality risk associated with citric acid- and acetic acid-based bicarbonate haemodialysis: a historical cohort propensity score-matched study in a large, multicentre, population-based study. *Nephrol Dial Transplant*. 2020;35(7):1237-1244. doi:10.1093/NDT/GFAA089
143. Apsner R, Buchmayer H, Gruber D, Sunder-Plassmann G. Citrate for long-term hemodialysis: Prospective study of 1,009 consecutive high-flux treatments in 59 patients. *Am J Kidney Dis*. 2005;45(3):557-564. doi:10.1053/j.ajkd.2004.12.002
144. Potier J, Dolley-Hitze T, Hamel D, et al. Long-term effects of citric acid-based bicarbonate haemodialysis on patient outcomes: a survival propensity score-matched study in western France. *Nephrol Dial Transplant*. 2020;35(7):1228-1236. doi:10.1093/NDT/GFZ274
145. Couchoud C, Hannedouche T, Bauwens M, et al. Impact of the dialysate acid component on haemodialysis mortality rates. *Nephrol Dial Transplant*. 2020;35(7):1244-1249. doi:10.1093/NDT/GFAA168
146. Mercadal L, Franck JE, Metzger M, et al. Improved survival associated with acetate-free haemodialysis in elderly: a registry-based study. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(9):1560-1568. doi:10.1093/NDT/GFV248

147. Yamada S, Ueki K, Tokumoto M, et al. Effects of Lowering Dialysate Calcium Concentration on Mineral and Bone Disorders in Chronic Hemodialysis Patients: Conversion from 3.0mEq/L to 2.75mEq/L. *Ther Apher Dial.* 2016;20(1):31-39. doi:10.1111/1744-9987.12329
148. McIntyre CW, Burton JO, Selby NM, et al. Hemodialysis-induced cardiac dysfunction is associated with an acute reduction in global and segmental myocardial blood flow. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(1):19-26. doi:10.2215/CJN.03170707
149. Burton JO, Jefferies HJ, Selby NM, McIntyre CW. Hemodialysis-induced repetitive myocardial injury results in global and segmental reduction in systolic cardiac function. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(12):1925-1931. doi:10.2215/CJN.04470709
150. Burton JO, Jefferies HJ, Selby NM, McIntyre CW. Hemodialysis-induced cardiac injury: determinants and associated outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(5):914-920. doi:10.2215/CJN.03900808
151. Burton JO, Korsheed S, Grundy BJ, McIntyre CW. Hemodialysis-induced left ventricular dysfunction is associated with an increase in ventricular arrhythmias. *Ren Fail.* 2008;30(7):701-709. doi:10.1080/08860220802212908
152. Chen T, Hassan HC, Qian P, Vu M, Makris A. High-sensitivity troponin T and C-reactive protein have different prognostic values in Hemo- and peritoneal dialysis populations: A cohort study. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(5):e007876. doi:10.1161/JAHA.117.007876
153. Khan NA, Hemmelgarn BR, Tonelli M, Thompson CR, Levin A. Prognostic value of troponin T and I among asymptomatic patients with end-stage renal disease: A meta-analysis. *Circulation.* 2005;112(20):3088-3096. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.560128
154. Apple FS, Murakami MMAM, Pearce LA, Herzog CA. Predictive value of cardiac troponin I and T for subsequent death in end-stage renal disease. *Circulation.* 2002;106(23):2941-2945. doi:10.1161/01.CIR.0000041254.30637.34
155. Selby NM, Fluck RJ, Taal MW, McIntyre CW. Effects of acetate-free double-chamber hemodiafiltration and standard dialysis on systemic hemodynamics and troponin T levels. *ASAIO J.* 2006;52(1):62-69. doi:10.1097/01.mat.0000189725.93808.58
156. Caglar K, Peng Y, Pupim LB, et al. Inflammatory signals associated with hemodialysis. *Kidney Int.* 2002;62(4):1408-1416. doi:10.1111/J.1523-1755.2002.KID556.X
157. Murphy SP, Kakkar R, McCarthy CP, Januzzi JL. Inflammation in Heart Failure: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(11):1324-1340. doi:10.1016/j.jacc.2020.01.014
158. Sun J, Axelsson J, Machowska A, et al. Biomarkers of cardiovascular disease and mortality risk in patients with advanced CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(7):1163-1172. doi:10.2215/CJN.10441015
159. Barreto D v., Barreto FC, Liabeuf S, et al. Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2010;77(6):550-556. doi:10.1038/ki.2009.503



160. Rao M, Guo D, Perianayagam MC, et al. Plasma interleukin-6 predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2005;45(2):324-333. doi:10.1053/j.ajkd.2004.09.018
161. Hoffmann GF, Meier-Augenstein W, Stöckler S, Surtees R, Rating D, Nyhan WL. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J Inherit Metab Dis.* 1993;16(4):648-669. doi:10.1007/BF00711898
162. Zordoky BN, Sung MM, Ezekowitz J, et al. Metabolomic fingerprint of heart failure with preserved ejection fraction. *PLoS One.* 2015;10(5):e0124844. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0124844
163. Wu N, Yang M, Gaur U, Xu H, Yao Y, Li D. Alpha-Ketoglutarate: Physiological Functions and Applications. *Biomol Ther (Seoul).* 2016;24(1):1-8. doi:10.4062/BIOMOLTHER.2015.078
164. Psychogios N, Hau DD, Peng J, et al. The human serum metabolome. *PLoS One.* 2011;6(2):e16957. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0016957
165. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun.* 2020;11(1):102. doi:10.1038/s41467-019-13668-3
166. Klysz D, Tai X, Robert PA, et al. Glutamine-dependent  $\alpha$ -ketoglutarate production regulates the balance between T helper 1 cell and regulatory T cell generation. *Sci Signal.* 2015;8(396):ra97. doi:10.1126/SCISIGNAL.AAB2610
167. Longnus SL, Wambolt RB, Barr RL, Lopaschuk GD, Allard MF. Regulation of myocardial fatty acid oxidation by substrate supply. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(4):1561-1567. doi:10.1152/AJPHEART.2001.281.4.H1561
168. Reda E, D'Iddio S, Nicolai R, Benatti P, Calvani M. The carnitine system and body composition. *Acta Diabetol.* 2003;40(Suppl. 1):106-113. doi:10.1007/S00592-003-0040-Z
169. Fouque D, Holt S, Guebre-Egziabher F, et al. Relationship between serum carnitine, acylcarnitines, and renal function in patients with chronic renal disease. *J Ren Nutr.* 2006;16(2):125-131. doi:10.1053/J.JRN.2006.01.004
170. Dambrova M, Makrecka-Kuka M, Kuka J, et al. Acylcarnitines: Nomenclature, Biomarkers, Therapeutic Potential, Drug Targets, and Clinical Trials. *Pharmacol Rev.* 2022;74(3):506-551. doi:10.1124/PHARMREV.121.000408
171. Kalim S, Clish CB, Wenger J, et al. A plasma long-chain acylcarnitine predicts cardiovascular mortality in incident dialysis patients. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(6):e000542. doi:10.1161/JAHA.113.000542
172. Ferrara F, Bertelli A, Falchi M. Evaluation of carnitine, acetylcarnitine and isovalerylcarnitine on immune function and apoptosis. *Drugs Exp Clin Res.* 2005;31(3):109-114.
173. Violante S, Achetib N, van Roermund CWT, et al. Peroxisomes can oxidize medium- and long-chain fatty acids through a pathway involving ABCD3 and HSD17B4. *FASEB J.* 2019;33(3):4355-4364. doi:10.1096/FJ.201801498R

174. Ferdinandusse S, Mulders J, Ijlst L, et al. Molecular cloning and expression of human carnitine octanoyltransferase: evidence for its role in the peroxisomal beta-oxidation of branched-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263(1):213-218. doi:10.1006/BBRC.1999.1340
175. Kang M, Yoo HJ, Kim M, Kim M, Lee JH. Metabolomics identifies increases in the acylcarnitine profiles in the plasma of overweight subjects in response to mild weight loss: a randomized, controlled design study. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):237. doi:10.1186/S12944-018-0887-1
176. Kiykim E, Aktuğlu Zeybek AÇ, Barut K, et al. Screening of Free Carnitine and Acylcarnitine Status in Children With Familial Mediterranean Fever. *Arch Rheumatol.* 2016;31(2):133-138. doi:10.5606/ARCHRHEUMATOL.2016.5696
177. Cao B, Wang D, Pan Z, et al. Metabolic profiling for water-soluble metabolites in patients with schizophrenia and healthy controls in a Chinese population: A case-control study. *World J Biol Psychiatry.* 2020;21(5):357-367. doi:10.1080/15622975.2019.1615639
178. Bellinghieri G, Santoro D, Calvani M, Mallamace A, Savica V. Carnitine and hemodialysis. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(3 Suppl. 1):116-122. doi:10.1053/AJKD.2003.50099
179. Virmani A, Binienda Z. Role of carnitine esters in brain neuropathology. *Mol Aspects Med.* 2004;25(5-6):533-549. doi:10.1016/J.MAM.2004.06.003
180. Blomqvist G, Alvarsson M, Grill V, et al. Effect of acute hyperketonemia on the cerebral uptake of ketone bodies in nondiabetic subjects and IDDM patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283(1):20-28. doi:10.1152/AJPENDO.00294.2001
181. Obokata M, Negishi K, Sunaga H, et al. Association between circulating ketone bodies and worse outcomes in hemodialysis patients. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(10):e006885. doi:10.1161/JAHA.117.006885
182. Borrelli S, Minutolo R, de Nicola L, et al. Intradialytic changes of plasma amino acid levels: effect of hemodiafiltration with endogenous reinfusion versus acetate-free biofiltration. *Blood Purif.* 2010;30(3):166-171. doi:10.1159/000320133
183. Adeva-Andany MM, López-Maside L, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C, Sixto-Leal C. Enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism in humans. *Amino Acids.* 2017;49(6):1005-1028. doi:10.1007/S00726-017-2412-7
184. Rajendram R, Preedy VR, Patel VB. *Branched chain amino acids in clinical nutrition. Volume 1.* 1<sup>st</sup> ed. Springer Science+Business Media; 2014.
185. Stipanuk MH. Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. *Nutr Rev.* 2007;65(3):122-129. doi:10.1111/J.1753-4887.2007.TB00289.X
186. Yang J, Chi Y, Burkhardt BR, Guan Y, Wolf BA. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev.* 2010;68(5):270-279. doi:10.1111/J.1753-4887.2010.00282.X

187. Yang J, Dolinger M, Ritaccio G, et al. Leucine Stimulates Insulin Secretion via Down-regulation of Surface Expression of Adrenergic  $\alpha$ 2A Receptor through the mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) Pathway: implication in new-onset diabetes in renal transplantation. *J Biol Chem.* 2012;287(29):24795. doi:10.1074/JBC.M112.344259
188. Duan Y, Li F, Li Y, et al. The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. *Amino Acids.* 2016;48(1):41-51. doi:10.1007/S00726-015-2067-1
189. Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(12):723-736. doi:10.1038/NREND0.2014.171
190. Bloomgarden Z. Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link? *J Diabetes.* 2018;10(5):350-352. doi:10.1111/1753-0407.12645
191. Newsholme P, Stenson L, Sulvucci M, Sumayao R, Krause M. Amino Acid Metabolism. In: Moo-Young M, ed. *Comprehensive Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> ed. Pergamon; 2011.
192. Khan FA. *Biotechnology Fundamentals*. 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press; 2020.
193. Holeček M. Branched-chain amino acids in health and disease: Metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr Metab (Lond).* 2018;15:33. doi:10.1186/S12986-018-0271-1
194. Kato H, Miura K, Nakano S, Suzuki K, Bannai M, Inoue Y. Leucine-enriched essential amino acids attenuate inflammation in rat muscle and enhance muscle repair after eccentric contraction. *Amino Acids.* 2016;48(9):2145-2155. doi:10.1007/S00726-016-2240-1
195. Xia Z, Cholewa JM, Zhao Y, et al. A potential strategy for counteracting age-related sarcopenia: preliminary evidence of combined exercise training and leucine supplementation. *Food Funct.* 2017;8(12):4528-4538. doi:10.1039/C7FO01181D
196. An YH, Kim J, Kim HJ, Lim K. Effects of leucine-enriched essential amino acid supplementation on muscular fatigue and inflammatory cytokines in wheelchair basketball players. *Phys Act Nutr.* 2020;24(2):38-46. doi:10.20463/PAN.2020.0013
197. Yung-Feng Chang, Charles AK. Uptake and metabolism of delta 1-piperidine-2-carboxylic acid by synaptosomes from rat cerebral cortex. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1238(1):29-33. doi:10.1016/0005-2736(95)00092-H
198. Matthews DE. Review of Lysine Metabolism with a Focus on Humans. *J Nutr.* 2020;150(Suppl. 1):2548-2555. doi:10.1093/JN/NXAA224
199. Singh M, Muralidhara Rao D, Pande S, Battu S, Rajeswar Dutt K, Ramesh M. Medicinal uses of L-lysine: past and future. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2011;2(4):637-642.
200. Trabado S, Al-Salameh A, Croixmarie V, et al. The human plasma-metabolome: Reference values in 800 French healthy volunteers; impact of cholesterol, gender and age. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173615. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0173615

201. Hendriks FK, Smeets JSJ, Broers NJH, et al. End-Stage Renal Disease Patients Lose a Substantial Amount of Amino Acids during Hemodialysis. *J Nutr.* 2020;150(5):1160-1166. doi:10.1093/JN/NXAA010
202. Lim VS, Bier DM, Flanigan MJ, Sum-Ping ST. The effect of hemodialysis on protein metabolism. A leucine kinetic study. *J Clin Invest.* 1993;91(6):2429-2436. doi:10.1172/JCI116477
203. Duranton F, Cohen G, de Smet R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(7):1258-1270. doi:10.1681/ASN.2011121175
204. Brunet P, Dou L, Cerini C, Berland Y. Protein-bound uremic retention solutes. *Adv Ren Replace Ther.* 2003;10(4):310-320. doi:10.1053/J.ARRT.2003.08.002
205. Vanholder R, de Smet R, Lesaffer G. p-cresol: a toxin revealing many neglected but relevant aspects of uraemic toxicity. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14(12):2813-2815. doi:10.1093/NDT/14.12.2813
206. de Lorenzo SB, Patel AG, Hurley RM, Kaufmann SH. The Elephant and the Blind Men: Making Sense of PARP Inhibitors in Homologous Recombination Deficient Tumor Cells. *Front Oncol.* 2013;3:228. doi:10.3389/FONC.2013.00228
207. Rutkowski B, Slominska E, Szolkiewicz M, et al. N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide: a novel uremic toxin? *Kidney Int Suppl.* 2003;63(84):19-21. doi:10.1046/J.1523-1755.63.S84.36.X
208. Creeke PI, Dibari F, Cheung E, van den Briel T, Kyroussis E, Seal AJ. Whole blood NAD and NADP concentrations are not depressed in subjects with clinical pellagra. *J Nutr.* 2007;137(9):2013-2017. doi:10.1093/JN/137.9.2013
209. Brown DG, Rao S, Weir TL, et al. Metabolomics and metabolic pathway networks from human colorectal cancers, adjacent mucosa, and stool. *Cancer Metab.* 2016;4:11. doi:10.1186/S40170-016-0151-Y
210. Hessels J, Kingma AW, Sturkenboom MCJM, Elzinga H, van den Berg GA, Muskiet FAJ. Gas chromatographic determination of N-acetylisoptreanine-gamma-lactam, a unique catabolite of N1-acetylspermidine. *J Chromatogr.* 1991;563(1):1-9. doi:10.1016/0378-4347(91)80272-E
211. van den Berg GA, Kingma AW, Elzinga H, Muskiet FAJ. Determination of N-(3-acetamidopropyl)pyrrolidin-2-one, a metabolite of spermidine, in urine by isotope dilution mass fragmentography. *J Chromatogr.* 1986;383(2):251-258. doi:10.1016/S0378-4347(00)83471-4
212. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2013;368(17):1575-1584. doi:10.1056/NEJMOA1109400
213. Lin TY, Timasheff SN. Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein. *Biochemistry.* 1994;33(42):12695-12701. doi:10.1021/Bloo208A021
214. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013;19(5):576-585. doi:10.1038/NM.3145

215. Mair RD, Sirich TL, Meyer TW. Uremic Toxin Clearance and Cardiovascular Toxicities. *Toxins (Basel)*. 2018;10(6):226. doi:10.3390/TOXINS10060226
216. Mattarucchi E, Baraldi E, Guillou C. Metabolomics applied to urine samples in childhood asthma; differentiation between asthma phenotypes and identification of relevant metabolites. *Biomed Chromatogr*. 2012;26(1):89-94. doi:10.1002/BMC.1631



# 7

## Anexos





# Improvements in Inflammation and Calcium Balance of Citrate versus Acetate as Dialysate Buffer in Maintenance Hemodialysis: A Unicentric, Cross-Over, Prospective Study

José Jesús Broseta<sup>a</sup> Luis Carlos López-Romero<sup>b</sup> Alba Cerveró<sup>c</sup>  
Ramón Devesa-Such<sup>b</sup> Amparo Soldevila<sup>b</sup> Sergio Bea-Granell<sup>d, e</sup>  
Pilar Sánchez-Pérez<sup>b</sup> Julio Hernández-Jaras<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Nephrology and Renal Transplantation, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; <sup>b</sup>Department of Nephrology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain; <sup>c</sup>Department of Cardiology, Consorci Hospital General Universitari de València, Valencia, Spain; <sup>d</sup>Department of Nephrology, Consorci Hospital General Universitari de València, Valencia, Spain; <sup>e</sup>Department of Medicine, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, Valencia, Spain

## Keywords

Citrate dialysate · Acetate-free hemodialysis · Cardiovascular risk · Inflammation · Calcification · Calcium balance

## Abstract

**Introduction:** The composition of the dialysate is a crucial feature in the dialysis treatment. Two of its most debated elements are the optimal calcium concentration and the use of acetate as a buffer. Moreover, among the different alternatives to achieve acetate-free dialysis, the use of citrate is postulated as the most suitable option. The objective of this study is to identify the potential beneficial effects of citrate when compared to acetate dialysate (AD) both in short-term effects (especially regarding intradialytic calcium balance and cardiac damage biomarkers) and in medium-term ones with CKD-mineral and bone disorder (CKD-MBD) and inflammatory biomarkers measured after twelve sessions performed with each dialysate. **Methods:** This is a unicentric, cross-over, prospective study. Each patient underwent 24 dialysis sessions, 12 with each dialysate buffer. Blood samples were taken in 2 different sessions with each acidifier. They include CKD-MBD and inflammatory biomarkers. The calci-

um concentration of both dialysates was 1.5 mmol/L, while all other dialysis parameters and patients' treatment remained unchanged during the study period. **Results:** When comparing AD and citrate dialysate (CD), there were no differences in pre-dialysis ionized calcium (iCa) (1.11 vs. 1.08 mmol/L) in both groups. However, there was a significant increase in iCa with the use of AD in immediate and 30-min post-dialysis blood samples. In contrast, iCa levels remained stable with the use of citrate. Inflammatory biomarkers were also reduced after the use of CD. **Conclusions:** The use of citrate provides interesting advantages when compared to acetate. It maintains iCa levels stable during dialysis sessions with a neutral or negative effect on calcium balance, and it improves the chronic inflammatory condition that comes with long-time hemodialysis treatment. These beneficial effects may lead to an improvement in clinical outcomes.

© 2021 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Hemodialysis' (HD) main physicochemical principle is the exchange of substances between uremic blood and dialysate through a semipermeable membrane, the dia-

lyzer. The dialysate composition is as relevant as the dialyzer, the treatment time, the dialysis modality, or both blood and dialysate flow rates [1–3]. Among the dialysate components, there are 2 on which there are controversies: the optimal calcium concentration and the use of acetate as a buffer.

The concentration of calcium in the dialysate has been a topic of debate since the HD treatment began. In the 1960s, concentrations of 2.5 mEq/L (1.25 mmol/L) began to be used as they were the normal calcium plasma levels. However, with these levels, a negative balance that worsened secondary hyperparathyroidism was observed, so a 3.5 mEq/L concentration was adopted. This change became the standard until calcium-based phosphate binders and active vitamin D analogs came to the scene. Since the introduction of these drugs provides higher calcium oral intake, its dialysate levels were reduced to the current standard of 2.5–3 mEq/L [4]. Calcium transfer during dialysis has been related not only to short-term effects, which are mainly related to ionic calcium levels (hemodynamic tolerance and arrhythmias) but also to long-term effects (cardiovascular calcification and mortality) associated with chronic overload of calcium [2, 5]. Moreover, it is well known that end-stage kidney disease entails an exponentially increased risk of death, which is mostly attributed to cardiovascular disease and closely linked to CKD-mineral and bone disorder (CKD-MBD) and inflammation [6–9], especially in those patients on maintenance HD.

Another key element of the current bicarbonate-based dialysate is its buffer. Acetate, used at doses of 3–7 mEq/L to prevent precipitation of bicarbonate salts by contacting bivalent cations (calcium and magnesium), is widely used [1]. However, it is not free of adverse events for the patient. Acetate-based buffer leads to supraphysiological levels [10], which have been associated with increased inflammation, oxidative stress, and cardiac damage [11–14]. Hence, different alternatives have been sought, including the use of other dialysis modalities that allow a stable mixture without the need of a buffer system (i.e., acetate-free biofiltration, now in disuse due to its lower efficacy), and the use of other weak acidifying agents such as lactic, pyruvic, hydrochloric, or citric acids [1]. Specifically, citrate use has a chelating effect on calcium that raised a concern about its potential role in the occurrence of adverse events (cramps and hypotension). However, there are shortcomings in the literature published so far. On the one hand, there is the difficulty of an accurate evaluation of calcium balance in the organism [4, 5], and on the other, pre- and post-dialysis ionic calcium is usu-

ally measured as a comparison variable in citrate dialysate (CD) studies [15, 16], and nevertheless, there are no published reports that analyze the rebound in blood levels once equilibrium is reached.

This study aims to compare the potential beneficial effects of CD versus AD in 2 different ways: first, on its consequences in the short term, especially regarding intradialytic calcium balance and cardiac damage biomarkers and second, the medium-term effects on CKD-MBD and inflammatory status after 12 sessions performed with each dialysate.

## Materials and Methods

### Study Design and Participants

All prevalent patients over 18 year old on HD program, whether on conventional HD or post-dilution online hemodiafiltration, with at least 3 months of dialysis vintage, in a thrice-weekly and 4-h-session treatment schema, with a stable clinical condition for at least this time, were considered for inclusion. The objective of this unicentric, cross-over, prospective study was to evaluate the potential cardiovascular benefits of citrate compared to acetate as dialysate buffer.

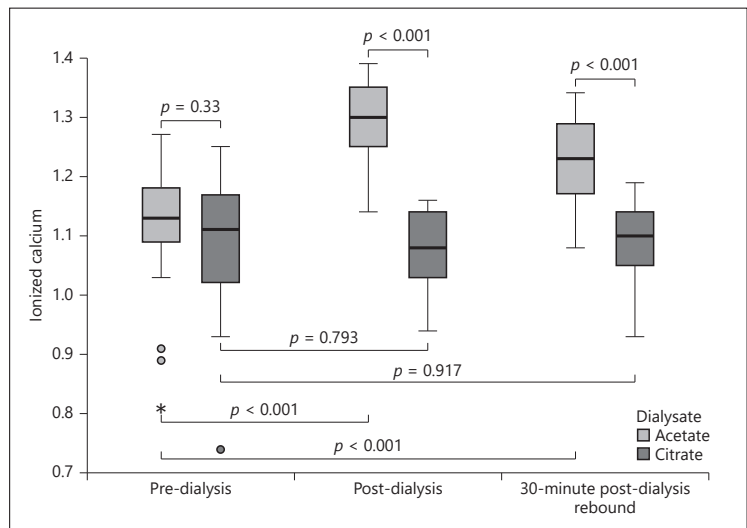
To avoid confounding factors, every parameter of the dialysis session (calcium, sodium, and bicarbonate prescription; blood and dialysate flows; and dialysis time), as well as medical treatment, remained unchanged during the study period except for the dialysate acidifier. Therefore, we excluded patients on a low calcium dialysate (1.25 mmol/L). Dialysate characteristics are detailed in Table 1. Bicarbonate and sodium prescriptions were individualized to ensure the same concentration in both dialysates. This study was conducted with Fresenius® 5008 dialysis monitors and FX CorDiax 100, FX CorDiax 80, FX CorDiax 60 Fresenius®, Evodial 2.2 Baxter®, Solacea Nipro®, and SureFlux Nipro® philters were used.

### Variables

Demographic and medical history data were collected, including age, gender, CKD etiology, HD vintage and modality, vascular access, dry weight, and comorbidities. During this study, each patient underwent 24 dialysis sessions, 12 with each dialysate acidifier. Blood samples were taken in 2 different sessions (the last one made with each acidifier so that each patient acted as its own control) and at 3 different moments per session: pre-dialysis, post-dialysis, and 30-min post-dialysis (rebound).

Ionized calcium (iCa), phosphate, pH, bicarbonate, and base excess were measured in plasma in these 3 different moments. Pre- and post-dialysis high-sensitivity troponin T (hsTnT) was collected. Post-dialysis concentrations were corrected according to the ultrafiltrated volume with the Bergström formula [17]. Albumin-corrected total calcium, parathormone, procalcitonin, high-sensitivity C-reactive protein, interleukin-6, and total carbon dioxide were only determined in pre-dialysis samples. Usual HD parameters, demographic variables, and adverse events were also monitored and collected.

**Fig. 1.** iCa levels comparison between time of measurement and dialysate acidifier. iCa, ionized calcium.



#### Statistical Methods

Quantitative variables are described as mean and standard deviation when normally distributed, and the statistical inference between the variables was performed by Student's paired *T* test. For those variables with a lognormal distribution, a log transformation was performed to use parametric tests. Skewed data are presented by median and interquartile range, and its inference was evaluated by the Wilcoxon's signed-rank test. Qualitative data are reported as absolute frequencies. A two-sided *p* value inferior to 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed with IBM SPSS® Statistics in its 26th version.

#### Ethical Considerations and Disclosures

All patients gave their written informed consent to participate in this study, which was also approved by the institute's committee on human research. It was conducted following the World Medical Association Declaration of Helsinki, national and local laws, and the good clinical practice standards. The authors have no conflicts of interest to declare. This work has neither received public nor private funding for its implementation.

## Results

#### Patients Characteristics

Twenty-one patients (10 men and 11 women), with a mean age of  $62.25 \pm 13.77$  years (range 33.05–82.26 years) on conventional HD (2) or post-dilution online hemodiafiltration (19) were enrolled. Twelve patients were dialyzed through an arteriovenous fistula, and 9 were dialyzed through a tunneled catheter. Underlying renal diseases were diabetic kidney disease (6 patients), autosomal

**Table 1.** Dialysate compositions once the corresponding dilution was carried out

Components	Fresenius ACF 3A5	Fresenius smartbag CA 211.5
Sodium, mmol/L	140	138
Potassium, mmol/L	2	2
Calcium, mmol/L	1.5	1.5
Magnesium, mmol/L	0.5	0.5
Chloride, mmol/L	106	109
Acetate, mmol/L	4	–
Citrate, mmol/L	–	1
Glucose, g/L	1	1
Bicarbonate, mmol/L	35	32

dominant polycystic kidney disease (2 patients), HIV nephropathy (2 patients), nephroangiosclerosis (2 patients), chronic glomerulonephritis (1 patient), chronic pyelonephritis (1 patient), renal cell carcinoma (1 patient), and other cystic diseases (1 patient), and the remaining were of unknown cause (5 patients). Concerning other significant comorbidities worth mentioning, 1 patient had cirrhosis with A Child-Pugh score, 5 patients had liver disease with normal function (1 polycystic hepatorenal disease, 2 HCV, 1 HBV, and 1 HCV-HBV coinfection), and 1 was a liver transplant recipient with normal graft function. Regarding cardiac diseases, 3 patients had valve dis-

**Table 2.** CKD-MBD parameters

Parameters	AD	CD	<i>p</i> value
Pre-dialysis albumin-corrected total calcium, mg/dL, mean ± SD	8.9±0.6	8.31±0.75	0.003
Pre-dialysis parathormone, pg/mL, median (IQR)	169 (88.6–386.5)	267 (92.85–454.5)	<0.001
Phosphate, mg/dL			
Pre-dialysis, mean ± SD	4.36±1.17	4.86±1.82	0.007
Post-dialysis, mean ± SD	1.84±0.43	1.67±0.51	0.065
30-min post-dialysis rebound, mean ± SD	2.35±0.55	2.19±0.64	0.197
Reduction ratio, %, median (IQR)	57.78 (54.23–61.54)	64.71 (59.63–70.24)	0.012

AD, acetate dialysate; CD, citrate dialysate; MBD, mineral and bone disorder.

**Table 3.** Basic-acid equilibrium parameters

Parameters	AD	CD	<i>p</i> value
pH			
Pre-dialysis	7.361±0.049	7.356±0.531	0.422
Post-dialysis	7.449±0.046	7.449±0.051	0.988
30-min post-dialysis rebound	7.445±0.05	7.45±0.05	0.429
Bicarbonate, mmol/L			
Pre-dialysis	23.47±2	23.81±2.07	0.353
Post-dialysis	29.49±1.59	29.2±1.4	0.401
30-min post-dialysis rebound	29±1.54	28.95±1.39	0.873
Base excess			
Pre-dialysis	-1.85±2.25	-1.78±2.25	0.869
Post-dialysis	4.91±2.05	4.65±1.77	0.461
30-min post-dialysis rebound	4.38±2.07	4.5±1.84	0.727
Pre-dialysis total carbon dioxide, mmol/L	22.41±1.98	22.15±2.25	0.217

AD, acetate dialysate; CD, citrate dialysate.

eases, 2 had chronic ischemic cardiopathy, and 1 had hypertensive cardiomyopathy.

#### *CKD-Mineral and Bone Disorder and Basic-Acid Equilibrium Parameters*

There were no differences between AD and CDs' serum pre-dialysis iCa ( $1.11 \pm 0.12$  vs.  $1.08 \pm 0.12$  mmol/L). On the contrary, there was an increase of post-dialysis iCa ( $1.29 \pm 0.07$  mmol/L) that persisted after rebound ( $1.22 \pm 0.07$  mmol/L) with the use of AD. Moreover, with CD, the iCa remained stable from the beginning ( $1.08 \pm 0.12$  mmol/L) to the end of the session ( $1.07 \pm 0.06$  mmol/L), even after the rebound period ( $1.08 \pm 0.11$  mmol/L). Figure 1 shows the graphic representation with the corresponding levels of significance. Other CKD-MBD values are shown in Table 2, showing a significant difference in pre-dialysis albumin-corrected total calcium and parathormone levels. On its part, phosphate levels differ sig-

nificantly in pre-dialysis measurement, but this difference vanished with the dialysis treatment. No significant differences were found in basic-acid equilibrium, as shown in Table 3. There were no cramps nor symptomatic hypotension events reported during the study period.

#### *Inflammatory and Cardiac Damage Biomarkers*

The 3 pre-dialysis-measured inflammatory parameters (hsCRP, PCT, and IL-6) were lower with CD than with AD, as reported in Table 4. There were no statistically significant differences between the pre-dialysis hsTnT values. Interestingly, they decreased with both dialysates after the dialysis session (from 71.99 to 39.65 [ $p < 0.001$ ] with AD and from 78.89 to 33.89 [ $p < 0.001$ ] with CD). The reduction ratio of hsTnT was higher when using CD (48.1 vs. 55.15,  $p = 0.012$ ). More details are shown in Table 4.

**Table 4.** Inflammatory and cardiac damage biomarkers

Parameters	AD	CD	<i>p</i> value
Pre-dialysis hsCRP, mg/L, median (IQR)	4.32 (1.27–12.16)	4.08 (0.98–8.65)	0.031
Pre-dialysis PCT, ng/mL, median (IQR)	0.44 (0.28–0.74)	0.38 (0.29–0.44)	0.037
Pre-dialysis IL-6, pg/mL, median (IQR)	13.7 (7.85–29.03)	11.8 (5–27.13)	0.029
hsTnT, ng/L			
Pre-dialysis, mean ± SD	71.99±36.81	78.89±46.1	0.193
Post-dialysis, mean ± SD	39.64±18.99	33.89±16	0.033
Reduction ratio, %, median (IQR)	48.1 (41.75–54.1)	55.15 (47.45–60.79)	0.012

hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; PCT, procalcitonin; IL-6, interleukin-6; CPK, Cr phosphokinase; hsTnT, high-sensitivity troponin T; AD, acetate dialysate; CD, citrate dialysate.

## Discussion

Citrate is increasingly being used as the weak acidifying element of the dialysate rather than acetate because of all the potential benefits of acetate-free dialysis and the extra advantages in anticoagulation [18, 19]. One of the main concerns about citrate use has been the potential adverse events related to its calcium-binding effects [19, 20]. Therefore, a supplementation of 0.15 mmol of calcium in the dialysate for each mmol of citrate is widely recommended to equal the mass balance of calcium transfer to a non-CD [21]. However, most of the studies have shown that this fear is unfounded, as they have not detected significant differences in the occurrence of adverse events [13, 18, 22, 23]. On the contrary, CD has been associated with a protective effect in other studies [11, 16, 24]. We know that more than 80% of dialysis patients have positive calcium balance even with a 2.5 mEq/L calcium dialysate concentration [25, 26] when using AD. Furthermore, chronic calcium positive balance leads to severe consequences, vascular calcification, and is a strong death predictor [27]. Although clinical outcomes are not better among patients with cumulative lower serum calcium levels, due to cardiovascular events such as cardiomyopathy, congestive heart failure, and arrhythmias [27], and the use of low calcium dialysate may accelerate the progression of coronary artery calcification [28]. Furthermore, sudden cardiac arrest occurs with both low and high calcium gradients between dialysate and blood [29]. Therefore, achieving a zero-net balance of calcium is advisable [30]. Our results showed a lower pre-dialysis albumin-corrected total calcium after 12 CD sessions with no statistical differences between pre-dialysis iCa. These findings were associated with higher serum PTH levels and higher phosphate levels. This can be ex-

plained by the elimination of the inhibiting effect of relative hypercalcemia produced by AD [31].

However, not only long-term calcium balance matters. Azpiazu et al. [32] proved that the recommended dialysate calcium concentrations resulted in an increase of post-dialysis calcium in more than 88% of the samples and that these changes caused *ex vivo* calcification of rat aortic rings. In contrast, unchanged serum calcium resulted in a 5-fold reduction in calcium deposits. Acute iCa changes during dialysis sessions have also been related to changes in arterial stiffness (measured by pulse wave velocity) [33]. In this sense, Lorenz et al. [30] established that CD favorably affected calcification propensity measured by the T<sub>50</sub> test, which predicts mortality in HD patients. Notably, CD has proven to reduce calcification in HD patients without additional cost compared to AD [34]. This study showed that the use of CD allowed iCa levels to remain stable during the entire dialysis session and maintain stability even after the rebound period. On the contrary, there was a positive calcium balance with AD that did not correct 30 min after the dialysis session termination. In that sense, one limitation of this study is the lack of information regarding the exact calcium balance, as we could only interpret it from iCa and pre-dialysis albumin-corrected total calcium. A caveat is that we did not determine the interdialytic calcium absorption and the removed amount during the dialysis sessions. Further studies are needed to assess the exact calcium balance with CD and its long-term impact on clinical outcomes. We did not find a lower incidence of post-dialysis alkalosis as previously published [16].

Our results concerning hsTnT (a sensitive cardiac myocyte necrosis biomarker, and a useful tool to predict mortality and adverse cardiovascular events in dialysis [35, 36]) show that its post-dialysis values were signifi-

cantly lower on CD than on AD. Since the hsTnT levels go down with both buffers compared to other published studies [37, 38], we cannot entirely exclude that this finding is due to a higher clearance. Moreover, hsTnT changes do not necessarily reflect dialysis-induced cardiac damage, as plasma troponin levels may only become elevated after 6–12 h following an ischemic episode and represent a flawed way to investigate dialysis-induced ischemia. More studies are needed to evaluate the potential CD protective effect on intra-dialysis cardiac damage.

This study also suggests that in the medium-term, even after only twelve dialysis sessions, the change from AD to CD leads to a reduction of all the measured inflammation parameters (IL-6, hsCRP, and PCT). This finding is of great importance, as chronic inflammation represents an independent cardiovascular risk factor [9, 39], where not only IL-6 [40, 41] but also hsCRP [35] have been established as strong predictors of cardiovascular mortality among dialysis patients. CD has been previously reported to produce less oxidative stress and pro-inflammatory stimuli [42], to act as a complement inhibitor even at low concentrations [43], and decrease both endothelial and vascular smooth muscular cells dysfunction [12], in comparison with AD. A possible limitation of the study in that sense is that we compared patients with different vascular access (arteriovenous fistula and tunneled catheter), different dialysis modalities (HD and hemodiafiltration), and different dialyzers, some of which may have played a role in inflammation.

In conclusion, the use of citrate instead of acetate seems to confer a more biocompatible dialysate that provides essential advantages in cardiovascular risk terms, maintaining iCa levels stable during all dialysis sessions with a neutral or negative effect on calcium balance, and improving the chronic inflammatory condition of these patients. These conditions may lead to a relevant improvement in clinical outcomes.

## References

- 1 Petitclerc T, Diab R, le Roy F, Mercadal L, Hmida J. Hémodialyse sans acétate : qu'est-ce vraiment ? *Néphrol Théor*. 2011;7(2):92–8.
- 2 Basile C, Lomonte C. A neglected issue in dialysis practice: haemodialysate. *Clin Kidney J*. 2015;8(4):393.
- 3 McGill RL, Weiner DE. Dialysate composition for hemodialysis: changes and changing risk. *Semin Dial*. 2017;30(2):112.
- 4 Maduell F, Rodríguez N, Arias-Guillén M, Jiménez S, Alemany B, Durán C, et al. Dialysate calcium individualisation: a pending issue. *Nefrologia*. 2012;32(5):579.
- 5 van der Sande FM, ter Meulen KJA, Kotanko P, Kooman JP. Dialysate calcium levels: do they matter? *Blood Purif*. 2018 Dec;47(1–3):1–6.
- 6 Sarnak MJ, Amann K, Bangalore S, Cavalcante JL, Charytan DM, Craig JC, et al. Chronic kidney disease and coronary artery disease: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(14):1823–38.
- 7 Wanner C, Amann K, Shoji T. The heart and vascular system in dialysis. *Lancet*. 2016; 388(10041):276–84.
- 8 Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2017; 389(10075):1238–52.
- 9 Cozzolino M, Mangano M, Stucchi A, Ciceri P, Conte F, Galassi A. Cardiovascular disease in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2018.
- 10 Sánchez-Canel JJ, Hernández-Jaras J, Pons-Prades R. A randomized controlled study on the effects of acetate-free biofiltration on organic anions and acid-base balance in hemodialysis patients. *Ther Apher Dial*. 2015;19(1):63.

## Acknowledgements

We would like to publicly give our thanks to all the participating patients, as well as to all the nursing staff of the Dialysis and Investigation Units of the Department of Nephrology of Hospital Universitari i Politècnic La Fe for their selfless and enthusiastic collaboration in this study.

## Statement of Ethics

The Local Clinical Research Ethics Committee has approved this study. Data collection has followed the Regulation (EU) 2016/679 (General Data Protection Regulation), its subordinate national and regional laws, and the Declaration of Helsinki principles. All patients provided their written informed consent for the participation in this study.

## Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Funding Sources

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

## Author Contributions

J.B. and J.H. conceived the study. R.D., S.B., A.S., and P.S. also contributed substantially to its conception. J.B., L.L., and A.C. acquired the data from the electronic health records. J.B. analyzed the data. J.B., L.L., and A.C. made the figures and drafted and revised the manuscript. All authors have revised the drafts and approved the final one.

- 11 Gabutti L, Lucchini B, Marone C, Alberio L, Burnieri M. Citrate- vs. acetate-based dialysate in bicarbonate haemodialysis: consequences on haemodynamics, coagulation, acid-base status, and electrolytes. *BMC Nephrol.* 2009; 10:7.
- 12 Dellepiane S, Medica D, Guarena C, Musso T, Quercia AD, Leonardi G, et al. Citrate anion improves chronic dialysis efficacy, reduces systemic inflammation and prevents chemerin-mediated microvascular injury. *Sci Rep.* 2019;9(1):10622.
- 13 Grundström G, Christensson A, Alquist M, Nilsson LG, Segelmark M. Replacement of acetate with citrate in dialysis fluid: a randomized clinical trial of short term safety and fluid biocompatibility. *BMC Nephrol.* 2013;14:216.
- 14 Pérez-García R, Ramírez Chamond R, de Sequera Ortiz P, Albalade M, Puerta Carretero M, Ortega M, et al. El líquido de diálisis con citrato no induce in vitro estrés oxidativo ni inflamación en comparación con el acetato. *Nefrología.* 2017.
- 15 Šafránek R, Moučka P, Vávrová J, Palička V, Pavlíková L, Sulková ŠD. Changes of serum calcium, magnesium and parathyroid hormone induced by hemodialysis with citrate-enriched dialysis solution. *Kidney Blood Press Res.* 2015;40(1):13–21.
- 16 Sequera Pde, Pérez García R, Molina Nuñez M, Muñoz González RI, Álvarez Fernández G, Mérida E, et al. Prospective randomized multicenter study to demonstrate the benefits of haemodialysis without acetate (with citrate): ABC-treat study. Acute effect of citrate. *Nefrología.* 2019;39(4):424–33.
- 17 Bergström J, Wehle B. No change in corrected beta 2-microglobulin concentration after cuprophane haemodialysis. *Lancet.* 1987; 1(8533):628–9.
- 18 Trakarnvanich T, Thirathanakul S, Sriphuang N, Thumrongthongjaroon P, Kurathong S, Ngamwichchukorn T. The effect of citrate on clot formation, dialyzer reuse, and anemia in hemodialysis patients. *Blood Purif.* 2019; 47(4):361–8.
- 19 Rocha AD, Padua VC, Oliveira E, Guimaraes MM, Lugon JR, Strogoff de Matos JP. Effects of citrate-enriched bicarbonate based dialysate on anticoagulation and dialyzer reuse in maintenance hemodialysis patients. *Hemodial Int.* 2014;18(2):467.
- 20 Schmitz M, Loke O, Fach B, Kalb K, Heering PJ, Meinke D, et al. Effects of citrate dialysate in chronic dialysis: a multicenter randomized crossover study. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(8):1327–34.
- 21 Nilsson A, Sternby J, Grundström G, Alquist M. SP413 citrate dialysis fluid and calcium mass balance. Extracorporeal dialysis: techniques and adequacy – A. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 May;28(Suppl 1):i202–13.
- 22 Molina Nuñez M, de Alarcón R, Roca S, Álvarez G, Ros MS, Jimeno C, et al. Citrate versus acetate-based dialysate in on-line haemodiafiltration. A prospective cross-over study. *Blood Purif.* 2015;39(1–3):181.
- 23 Aniori J, Petitclerc T, Créput C. Safe use of citric acid-based dialysate and heparin removal in postdilution online hemodiafiltration. *Blood Purif.* 2013.
- 24 de Sequera P, Ramón MA, Pérez-García R, Prats EC, Cobo PA, Arroyo RA, et al. Acute effect of citrate bath on postdialysis alkalemia. *Nefrología.* 2015;35(2):164–71.
- 25 Gotch F, Kotanko P, Handelman G, Levin N. A kinetic model of calcium mass balance during dialysis therapy. *Blood Purif.* 2006.
- 26 Gotch F, Levin NW, Kotanko P. Calcium balance in dialysis is best managed by adjusting dialysate calcium guided by kinetic modeling of the interrelationship between calcium intake, dose of vitamin D analogues and the dialysate calcium concentration. *Blood Purif.* 2010;29(2):163.
- 27 Miller JE, Kovesty CP, Norris KC, Mehrotra R, Nissenson AR, Kopple JD, et al. Association of cumulatively low or high serum calcium levels with mortality in long-term hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2010;32(5):403.
- 28 Kim SJ, Lee YK, Oh J, Cho A, Noh JW. Effects of low calcium dialysate on the progression of coronary artery calcification in hemodialysis patients: an open-label 12-month randomized clinical trial. *Int J Cardiol.* 2017;243:431.
- 29 Pun PH, Horton JR, Middleton JP. Dialysate calcium concentration and the risk of sudden cardiac arrest in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(5):797.
- 30 Lorenz G, Mayer CC, Bachmann Q, Stryeck S, Braunisch MC, Haller B, et al. Acetate-free, citrate-acidified bicarbonate dialysis improves serum calcification propensity—a preliminary study. *Nephrol Dial Transplant.* 2018 May;33(11):2043–51.
- 31 Yamada S, Ueki K, Tokumoto M, Suehiro T, Kimura H, Taniguchi M, et al. Effects of lowering dialysate calcium concentration on mineral and bone disorders in chronic hemodialysis patients: conversion from 3.0 mEq/L to 2.75 mEq/L. *Ther Apher Dial.* 2016;20(1):31–9.
- 32 Azpiazu D, González-Parra E, Ortiz A, Egido J, Villa-Bellosta R. Impact of post-dialysis calcium level on ex vivo rat aortic wall calcification. *PLoS One.* 2017 Aug;12(8):e0183730.
- 33 Moor MB, Kruse A, Uehlinger DE, Eisenberger U. Arterial stiffness depends on serum ionized calcium levels during dialysis with regional citrate anticoagulation. *Artif Organs.* 2013;37(5):467.
- 34 Villa-Bellosta R, Hernández-Martínez E, Mérida-Herrero E, González-Parra E. Impact of acetate- or citrate-acidified bicarbonate dialysate on ex vivo aorta wall calcification. *Sci Rep.* 2019.
- 35 Chen T, Hassan HC, Qian P, Vu M, Makris A. High-sensitivity troponin T and C-reactive protein have different prognostic values in hemo- and peritoneal dialysis populations: a cohort study. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(5):e007876.
- 36 Khan NA, Hemmelgarn BR, Tonelli M, Thompson CR, Levin A. Prognostic value of troponin T and I among asymptomatic patients with end-stage renal disease: a meta-analysis. *Circulation.* 2005;112(20):3088.
- 37 Selby NM, Fluck RJ, Taal MW, McIntyre CW. Effects of acetate-free double-chamber hemodiafiltration and standard dialysis on systemic hemodynamics and troponin T levels. *ASAIO J.* 2006;52(1):62–9.
- 38 Bolasco P, Ghezzi PM, Serra A, Corazza L, Fundoni GF, Pistis R, et al. Effects of acetate-free haemodiafiltration (HDF) with endogenous reinfusion (HFR) on cardiac troponin levels. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(1):258–63.
- 39 Murphy SP, Kakkar R, McCarthy CP, Januzzi JL. Inflammation in heart failure: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol.* 2020.
- 40 Sun J, Axelsson J, Machowska A, Heimbürger O, Bárány P, Lindholm B, et al. Biomarkers of cardiovascular disease and mortality risk in patients with advanced CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(7):1163.
- 41 Barreto DV, Barreto FC, Liabeuf S, Temmar M, Lemke HD, Tribouilloy C, et al. Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2010;77(6):550.
- 42 Pérez-García R, Ramírez Chamond R, de Sequera Ortiz P, Albalade M, Puerta Carretero M, Ortega M, et al. Citrate dialysate does not induce oxidative stress or inflammation in vitro as compared to acetate dialysate. *Nefrología.* 2017.
- 43 Huang S, Sandholm K, Jonsson N, Nilsson A, Wieslander A, Grundström G, et al. Low concentrations of citrate reduce complement and granulocyte activation in vitro in human blood. *Clin Kidney J.* 2015;8(1):31–7.







Article

# Impact of Acetate versus Citrate Dialysates on Intermediary Metabolism—A Targeted Metabolomics Approach

José Jesús Broseta <sup>1,\*</sup>, Marta Roca <sup>2</sup>, Diana Rodríguez-Espinosa <sup>1</sup>, Luis Carlos López-Romero <sup>3</sup>, Aina Gómez-Bori <sup>3</sup>, Elena Cuadrado-Payán <sup>1</sup>, Ramón Devesa-Such <sup>3</sup>, Amparo Soldevila <sup>3</sup>, Sergio Bea-Granell <sup>4</sup>, Pilar Sánchez-Pérez <sup>3</sup> and Julio Hernández-Jaras <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Nephrology and Renal Transplantation, Hospital Clinic of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Analytical Unit Platform, Medical Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), 46026 Valencia, Spain

<sup>3</sup> Department of Nephrology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, 46026 Valencia, Spain

<sup>4</sup> Department of Nephrology, Consorci Hospital General Universitari de València, 46014 Valencia, Spain

\* Correspondence: jbroseta@clinic.cat; Tel.: +34-932275498



**Citation:** Broseta, J.J.; Roca, M.; Rodríguez-Espinosa, D.; López-Romero, L.C.; Gómez-Bori, A.; Cuadrado-Payán, E.; Devesa-Such, R.; Soldevila, A.; Bea-Granell, S.; Sánchez-Pérez, P.; et al. Impact of Acetate versus Citrate Dialysates on Intermediary Metabolism—A Targeted Metabolomics Approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11693. <https://doi.org/10.3390/ijms231911693>

Academic Editor: Manoocher Soleimani

Received: 30 August 2022

Accepted: 30 September 2022

Published: 2 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Acetate is widely used as a dialysate buffer to avoid the precipitation of bicarbonate salts. However, even at low concentrations that wouldn't surpass the metabolic capacity of the Krebs tricarboxylic acid (TCA) cycle, other metabolic routes are activated, leading to undesirable clinical consequences by poorly understood mechanisms. This study aims to add information that could biologically explain the clinical improvements found in patients using citrate dialysate. A unicentric, cross-over, prospective targeted metabolomics study was designed to analyze the differences between two dialysates, one containing 4 mmol/L of acetate (AD) and the other 1 mmol/L of citrate (CD). Fifteen metabolites were studied to investigate changes induced in the TCA cycle, glycolysis, anaerobic metabolism, ketone bodies, and triglyceride and aminoacidic metabolism. Twenty-one patients completed the study. Citrate increased during the dialysis sessions when CD was used, without surpassing normal values. Other differences found in the next TCA cycle steps showed an increased substrate accumulation when using AD. While lactate decreased, pyruvate remained stable, and ketogenesis was boosted during dialysis. Acetylcarnitine and myo-inositol were reduced during dialysis, while glycerol remained constant. Lastly, glutamate and glutarate decreased due to the inhibition of amino acid degradation. This study raises new hypotheses that need further investigation to understand better the biochemical processes that dialysis and the different dialysate buffers induce in the patient's metabolism.

**Keywords:** hemodialysis; targeted metabolomics; dialysate; citrate; acetate; acetate-free

## 1. Introduction

Chronic kidney disease (CKD) leads to the dysfunction of various metabolic systems and the accumulation of the so-called uremic toxins [1]. In dialysis-dependent CKD (DD-CKD) patients, several metabolites have been correlated with cardiovascular disease, inflammatory parameters, disease progression, nutritional status, cognitive function, hypoxia and oxidative stress, body mass wasting, and even sleep cycle disturbance [2–6]. Dialysis by itself may worsen several metabolic functions [1].

One of the most challenging aspects of dialysate production is allowing the coexistence of a solution of divalent cations and bicarbonate without precipitation [7]. Acetate is widely used as a weak acid acting as a dialysate buffer, thus avoiding this precipitation. Even at the low concentrations (3–4 mmol/L) used, it reaches blood levels higher than physiological [8], leading to undesirable outcomes by poorly understood mechanisms.

Among the several compounds proposed as alternatives to acetate, citrate is important [7], as it has been associated with improved hemodynamic tolerance and inflammatory biomarkers in DD-CKD patients [9–13]. Even though the concentration in the dialysate is

five times lower than that needed for anticoagulation, citrate also allows patients to receive a reduced heparin dose without increasing the risk of filter coagulation [14–17]. Using acetate and citrate as dialysate buffers seems logical, since they would be later mainly transformed into bicarbonate through the TCA cycle. While citrate would enter directly, acetate would rapidly enter the cell, bind to coenzyme A to form acetyl-CoA, and then be oxidized in the TCA cycle, acting both as potentially safe and cheap bicarbonate precursors [18].

In this paper, we analyzed the inter-dialysis and intra-dialysis changes in the metabolomic profile of hemodialysis patients after being exposed to either citrate or acetate dialysates using a targeted metabolomics approach. Thus, we aim to add information that could help biologically explain the clinical improvements found in patients using citrate dialysate [11,19–21].

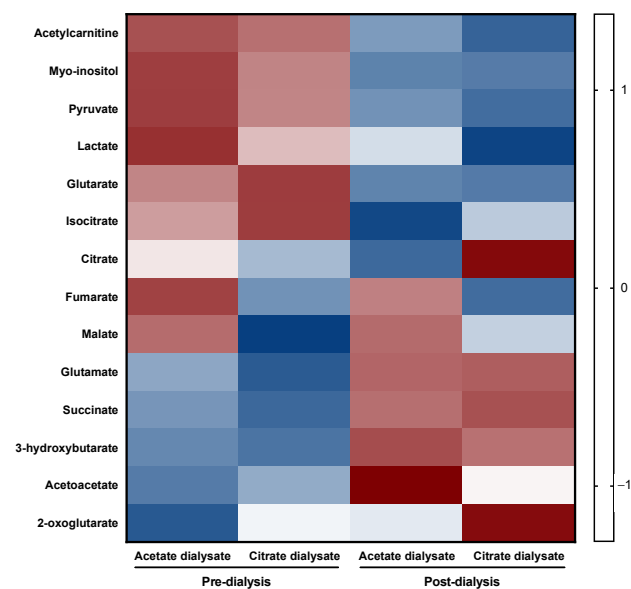
## 2. Results

### 2.1. Participants

Twenty-one patients with a mean age of  $62.25 \pm 13.77$  years were included. Ten (48%) were male. Two (9.5%) were on high-flux hemodialysis and nineteen (90.5%) on post-dilution online hemodiafiltration. Twelve (57.1%) were dialyzed through an arteriovenous fistula and nine (42.9%) through a tunneled catheter.

### 2.2. Metabolomic Analysis

The concentrations of each metabolite in the four measured times are represented in Table 1. Normalized data by Z-scoring are also illustrated in a heat map (Figure 1).



**Figure 1.** Heat map representing the normalized data by Z-scoring of each metabolite in the four measurement times. It is clear that dialysis per se has a catabolic effect and that most of the differences are produced by the treatment; however, it is visible that, in some cases, the metabolite concentrations are very disparate between dialysates.

**Table 1.** Differences in measured metabolites concentrations expressed in  $\mu\text{g/L}$  as mean  $\pm$  standard deviation or median (interquartile range).

Metabolite ( $\mu\text{g/L}$ )	Acetate Dialysate		Citrate Dialysate	
	Pre-Dialysis	Post-Dialysis	Pre-Dialysis	Post-Dialysis
Acetylcarnitine	2292.83 (1698.3–3835.64)	565.12 (75–814.56)	2108.21 (1138.39–3206.01)	164.52 (75–643.1)
Fumarate	1275.33 (940.83–1597.34)	1215.87 (1050.27–1617.92)	968.72 (682.95–1169.75)	924.19 (790.46–1109.45)
Citrate	23,930.01 $\pm$ 6243.63	13,151.82 $\pm$ 3245.25	18,312.77 $\pm$ 5534.11	35,351.74 $\pm$ 6126.8
Isocitrate	13,181.79 (11,407.72–15,441.07)	6717.97 (6051.02–7927.15)	15,438.28 (14,109.91–16,918.49)	10,463.95 (9330.3–12,195.79)
Myo-inositol	186,825.86 (115,033.27–325,459.59)	34,635.77 (4328.17–69,297.23)	156,509.77 (123,131.02–315,150.31)	31,586.57 (3125–55,889.43)
Glutamate	164.33 (112.36–260.19)	242.62 (166.44–318.71)	160.35 (102.76–204.39)	239.09 (150.69–342.67)
Pyruvate	5075.38 (3526.28–6168.7)	3509.35 (2905.18–3952.23)	4253.1 (3135.06–5031.68)	3322.45 (2664.53–5529.55)
Malate	1418.21 (1015.39–1760.36)	1418.82 (1138.72–1869.07)	1080.15 (860.11–1416.11)	1238.32 (879.48–1496.05)
Glycerol	48.5 (48.5–48.5)	48.5 (48.5–48.5)	48.5 (48.5–129.6)	48.5 (48.5–48.5)
Lactate	347,331.76 $\pm$ 91,933.58	263,698.08 $\pm$ 49,573.01	299,899.63 $\pm$ 57,695.8	200,315.81 $\pm$ 68,510.44
2-oxoglutarate	3755.05 (3476.57–4032.21)	3968.36 (3587–4421.18)	3984.51 (3393.35–4323.3)	4290.49 (3868.34–5168.94)
Acetoacetate	2473.04 (1277.63–4600.98)	18,926.55 (7189.31–30,038.77)	4166.43 (2374.53–7277.45)	9580.02 (6992.68–30,978.53)
Succinate	722.6 (588.57–1221.9)	1725.48 (1325.02–2012.26)	515.06 (297.41–1150.89)	1838.29 (1344.81–2370.32)
3-hydroxybutyrate	14,338.64 (3125–53,089.27)	162,982.81 (48,176.41–401,805.24)	3125 (3125–23,132.58)	146,012.84 (46,441.35–303,043.91)
Glutarate	636.45 (548.76–906.39)	530.86 (480.5–618.66)	664.43 (528.85–922.1)	526.83 (479.83–668.31)

### 2.2.1. Acetylcarnitine

There was a statistically significant difference in acetylcarnitine concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 49.96$ ,  $p < 0.0001$  (Figure 2). A decrease appeared between pre- and post-dialysis levels using AD ( $Z = -4.015$ ,  $p < 0.0001$ ) and CD ( $Z = -3.98$ ,  $p < 0.0001$ ); however, there was no significant difference between AD and CD either in pre- ( $Z = -1.303$ ,  $p = 0.192$ ) or post-dialysis ( $Z = -2.461$ ,  $p = 0.014$ ).

### 2.2.2. Fumarate

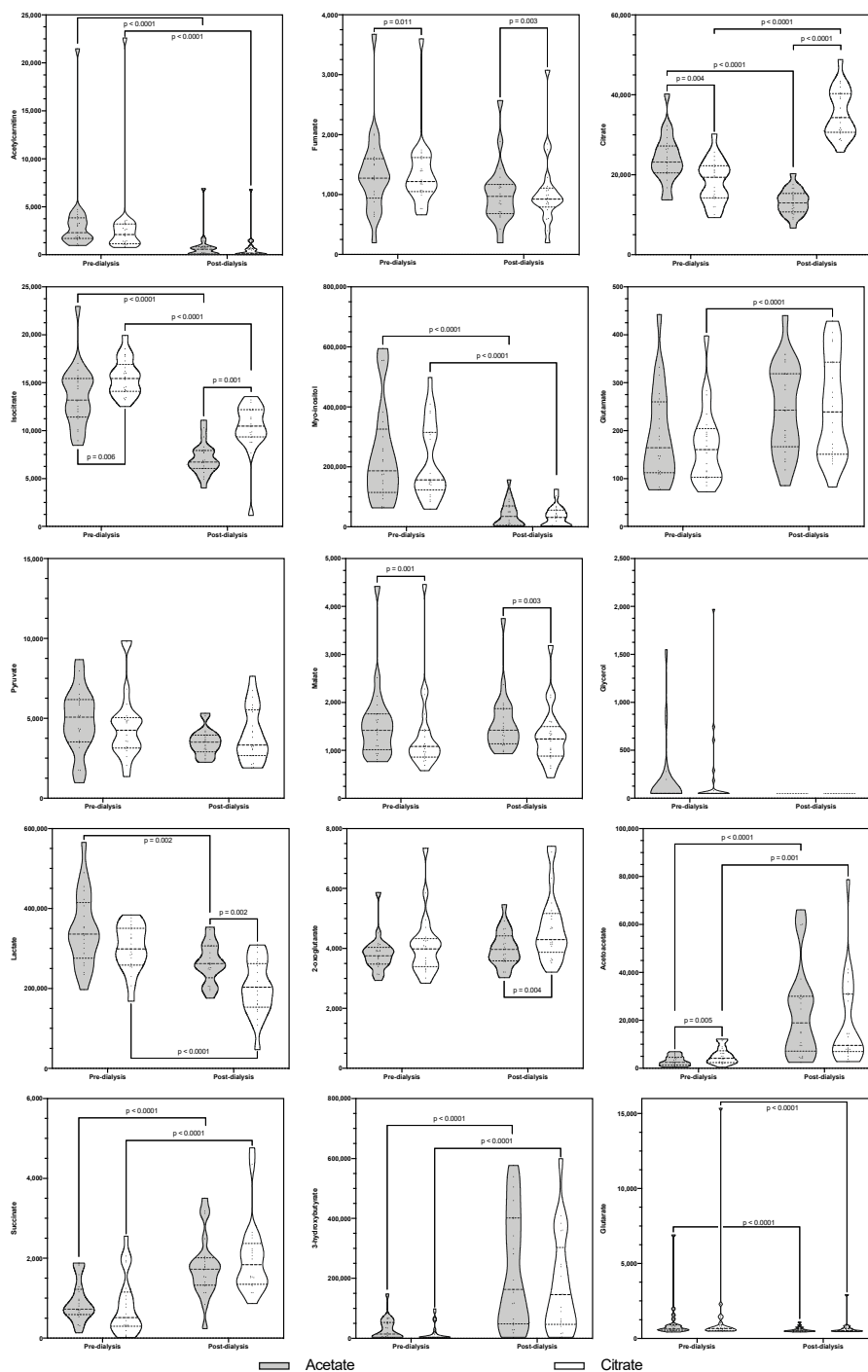
There was a statistically significant difference in fumarate concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 12.714$ ,  $p = 0.005$  (Figure 2). Its levels remained stable during the dialysis session with both AD ( $Z = -0.434$ ,  $p = 0.664$ ) and CD ( $Z = -0.017$ ,  $p = 0.986$ ). Pre- ( $Z = -2.555$ ,  $p = 0.011$ ) and post-dialysis ( $Z = -3.007$ ,  $p = 0.003$ ) levels were significantly different.

### 2.2.3. Citrate

Mean citrate concentrations significantly differed between the four measurements [ $F(2.816, 56.326) = 119.533$ ,  $p < 0.0001$ ] and consistently in the pairwise comparisons (Figure 2). During the sessions, citrate decreased [10,778.19 (95% CI, 7147.642–14,408.738),  $p < 0.0001$ ] with AD and increased with CD [−17,038.96 (95% CI, −20,739.052–−13,338.871),  $p < 0.0001$ ]. Pre- [5617.231 (95% CI, 1538.828–9695.635),  $p = 0.004$ ] and post-dialysis [−22,199.92 (95% CI, −25,691.342–−18,708.499),  $p < 0.0001$ ] levels significantly differed, being higher in the pre-dialysis AD measurement but higher in the post-dialysis treatment after one session using CD.

### 2.2.4. Isocitrate

There was a statistically significant difference in isocitrate concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 52.029$ ,  $p < 0.0001$ . Its levels were significantly reduced during dialysis with both AD ( $Z = -4.015$ ,  $p < 0.0001$ ) and CD ( $Z = -4.015$ ,  $p < 0.0001$ ). Moreover, the pre- ( $Z = -2.763$ ,  $p = 0.006$ ) and post-dialysis ( $Z = -3.285$ ,  $p = 0.001$ ) significantly differed.



**Figure 2.** Violin plot representing the pre- and post-dialysis measured concentrations of the fifteen studied metabolites with each dialysate. Statistically significant differences are marked.

### 2.2.5. Myo-Inositol

There was a statistically significant difference in myo-inositol concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 51.641$ ,  $p < 0.0001$ . Its levels were significantly reduced during dialysis with both AD ( $Z = -4.015$ ,  $p < 0.0001$ ) and CD ( $Z = -4.015$ ,  $p < 0.0001$ ). However, there were no pre- ( $Z = -1.13$ ,  $p = 0.259$ ) or post-dialysis ( $Z = -1.207$ ,  $p = 0.027$ ) significant differences.

### 2.2.6. Glutamate

There was a statistically significant difference in glutamate concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 14.257$ ,  $p = 0.003$ . During the sessions, its levels increased. These differences were statistically significant when using CD ( $Z = -3.493$ ,  $p < 0.0001$ ) but not when using AD ( $Z = -2.068$ ,  $p = 0.039$ ). Neither, pre- ( $Z = -1.199$ ,  $p = 0.23$ ), nor post-dialysis ( $Z = -0.643$ ,  $p = 0.52$ ) results significantly differed (Figure 2).

### 2.2.7. Pyruvate

There were no statistically significant differences in pyruvate concentrations among measurements,  $\chi^2(3) = 4.429$ ,  $p = 0.219$  (Figure 2).

### 2.2.8. Malate

There was a statistically significant difference in malate concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 17.857$ ,  $p < 0.0001$  (Figure 2). Its levels did not change because of the dialysis session with AD ( $Z = -0.713$ ,  $p = 0.476$ ) or CD ( $Z = -0.713$ ,  $p = 0.476$ ). Pre- ( $Z = -3.285$ ,  $p = 0.001$ ) and post-dialysis ( $Z = -3.007$ ,  $p = 0.003$ ) levels were significantly higher with AD.

### 2.2.9. Glycerol

There was a statistically significant difference in glycerol concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 11.842$ ,  $p = 0.008$  (Figure 2); however, in pairwise comparison, there was neither a significant change during dialysis with AD ( $Z = -1.826$ ,  $p = 0.068$ ) or CD ( $Z = -2.201$ ,  $p = 0.028$ ), nor between pre- ( $Z = -0.77$ ,  $p = 0.441$ ) or post-dialysis ( $Z = 0$ ,  $p = 1$ ) results.

### 2.2.10. Lactate

Mean lactate concentrations differed between the four measurements ( $F(2.478, 49.568) = 22.063$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figure 2). Lactate levels decreased after dialysis both with AD (83633.688 (95% CI, 26,068.803–141,198.572),  $p = 0.002$ ) and CD (99,583.827 (95% CI, 51,404.704–147,762.949),  $p < 0.0001$ ). Pre-dialysis levels did not differ (47,432.131 (95% CI, -17,205.387–112,069.648),  $p = 0.265$ ) but post-dialysis levels did (63,382.270 (95% CI, 20,177.688–106,586.852),  $p = 0.002$ ), with lower levels after a dialysis with CD.

### 2.2.11. 2-Oxoglutarate

There was a statistically significant difference in 2-oxoglutarate concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 16.371$ ,  $p = 0.001$  (Figure 2). Its levels did not significantly change during the dialysis session with AD ( $Z = -1.79$ ,  $p = 0.073$ ) or CD ( $Z = -2.242$ ,  $p = 0.025$ ). No differences occurred between pre-dialysis levels ( $Z = -1.721$ ,  $p = 0.085$ ), but post-dialysis ( $Z = -2.902$ ,  $p = 0.004$ ) values were found to be higher after a session with CD.

### 2.2.12. Acetoacetate

There was a statistically significant difference in acetoacetate concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 37.057$ ,  $p < 0.0001$  (Figure 2). During the sessions, both AD ( $Z = -3.91$ ,  $p < 0.0001$ ) and CD ( $Z = -3.18$ ,  $p = 0.001$ ) induced significant increases. Pre- ( $Z = -2.833$ ,  $p = 0.005$ ), but not post-dialysis ( $Z = -1.581$ ,  $p = 0.114$ ) levels differed between dialysates, being higher in the CD measurement.

### 2.2.13. Succinate

There was a statistically significant difference in succinate concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 34.314$ ,  $p < 0.0001$  (Figure 2). During the dialysis sessions, succinate levels increased both with AD ( $Z = -3.771$ ,  $p < 0.0001$ ) and CD ( $Z = 3.806$ ,  $p < 0.0001$ ), but there were no pre- ( $Z = -1.06$ ,  $p = 0.289$ ) or post-dialysis ( $Z = -1.581$ ,  $p = 0.114$ ) differences.

### 2.2.14. 3-hydroxybutyrate

There was a statistically significant difference in 3-hydroxybutyrate concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 33.089$ ,  $p < 0.0001$  (Figure 2). Its levels significantly increased during the sessions with AD ( $Z = -3.509$ ,  $p < 0.0001$ ) and CD ( $Z = -3.733$ ,  $p < 0.0001$ ), but there were no differences between pre- ( $Z = -1.761$ ,  $p = 0.078$ ) or post-dialysis ( $Z = -1.408$ ,  $p = 0.159$ ) levels.

### 2.2.15. Glutarate

There was a statistically significant difference in glutarate concentrations among the four measurements,  $\chi^2(3) = 33.857$ ,  $p < 0.0001$  (Figure 2). During the session, glutarate levels were reduced with both AD ( $Z = -3.91$ ,  $p < 0.0001$ ) and CD ( $Z = -3.632$ ,  $p < 0.0001$ ), but no significant differences were found between pre- ( $Z = -0.122$ ,  $p = 0.903$ ) and post-dialysis ( $Z = -1.025$ ,  $p = 0.305$ ) levels.

## 3. Discussion

Metabolomics opens the door to studying human metabolism in response to dialysis-induced changes in intermediary metabolism. This study, performed by a targeted metabolomic approach, found noteworthy differences between dialysates that raise new hypotheses that should be further investigated to explain the deleterious acetate effects on dialysis patients [9–13]. Acetyl-CoA levels exceeded by 20–70 times the physiological level despite the apparently small concentrations of acetate in the AD [8,22–24]. Although they do not seem to surpass the TCA cycle maximum acetyl-CoA rate of metabolism (diminished from 300 mmol/h in healthy adults to 150 mmol/h in DD-CKD patients [23,25]), acetyl-CoA enters other metabolic routes triggering metabolism disturbances [7,24].

### 3.1. First Carbon Oxidation Pathway of the TCA Cycle-Related Metabolites

It is noteworthy that after twelve sessions under AD but not under CD, patients had elevated pre-dialysis citrate levels linked to chronic accumulation of acetyl-CoA. This difference reverted during dialysis since citrate rose in blood when CD was used, whereas it decreased when AD was used. Nonetheless, this is inconsistent with other published papers in which it remained stable [8,18,24]. Citrate physiological levels are reasonably similar to our four measurements [26,27], and even after one dialysis with CD did not surpass the upper limit of the proposed normal range. Hence, a supraphysiological accumulation of citrate would not occur due to an improved balance between citrate generation and loss by the dialyzer than with acetate [22,24], in contrast to the 20 to 70 times higher acetate levels observed with AD.

Citrate is isomerized to isocitrate, whose levels decreased more intensely during the sessions with AD. Moreover, pre-dialysis levels differed, so this difference was maintained in the long term. The results observed in all study conditions were considerably lower than physiological [26].

The next step was measurement of 2-oxoglutarate, a rate-determining intermediate in the TCA cycle [28]. 2-oxoglutarate levels were 3–4 times supraphysiological in all study situations [26], with a non-significant increase during dialysis sessions, though post-dialysis levels became significantly higher with CD. This finding, not found in previous reports [18], would have short-term impact.

### 3.2. Second Carbon Oxidation Pathway of the TCA-Cycle Related Metabolites

Succinate levels rise during the dialysis sessions, which was due to the treatment itself, as no differences between dialysates were found; however, they were lower than physiological levels in all study situations. Fumarate, a metabolite that also takes part in several other pathways, was not modified during the dialysis sessions but had higher pre- and post-dialysis levels when patients were under AD, reaching levels 10 times higher than those seen in healthy adults. Consistent with previously published data, malate remained stable during the dialysis sessions and close to physiological levels [18,26,29].

These changes in the TCA cycle metabolites should not be considered trivial. Acetyl-CoA, succinate, and fumarate can alter immune system responses [28]. Succinate, malate, and fumarate promote tumorigenesis due to their ability to inhibit prolyl hydroxylase-containing enzymes [30]. Lymphangiogenesis and the maintenance of stem cells pluripotency have been associated with acetyl-CoA and 2-oxoglutarate, respectively. The latter is also related to decreased protein catabolism, increased protein synthesis, and increased circulating plasma levels of hormones such as insulin, growth hormone, and IGF-1 [28]. Furthermore, it plays a role in CD4+ T-cell differentiation [31].

### 3.3. Glycolysis and Anaerobic Metabolism-Related Metabolites

Glycolysis has three irreversible steps mediated by phosphofruktokinase, hexokinase, and pyruvate kinase enzymes. Citrate inhibits phosphofruktokinase and hexokinase, while the pyruvate kinase is hampered both by citrate and acetyl-CoA. Therefore, both dialysates may play a role in glycolysis inhibition. We found no differences in pyruvate levels during the dialysis session nor between dialysates, as previously reported [8,18]. Pyruvate represents the sole metabolic pathway of lactate, with a bidirectional conversion between the two anions activated by lactate dehydrogenase. During dialysis, acetate displaces pyruvate as a precursor of acetyl-CoA, which, coupled with its generation by glycolysis and the degradation of oxalacetate by the action of pyruvate carboxylase into pyruvate (accumulated by increased acetyl-CoA metabolism in the TCA cycle), may increase its levels [24]. Lactate is the predominant organic acid produced during dialysis, resulting in inefficient use of metabolic substrates for energy production and an irreversible loss of alkali, contributing to the increase of  $p\text{CO}_2$  [32]. Moreover, the carbonization and decarboxylation of an acetyl-CoA molecule in the TCA cycle is favorable to oxidation and displaces the oxide-reductant pairs increasing pyruvate levels at the expense of lactate [24]. Even with this overproduction, its levels were reduced during dialysis, particularly when using CD, but were higher than the physiological range in all study situations. Therefore, comparing the lactate/pyruvate ratio is interesting. It was higher in AD pre-dialysis measurements and increased with AD while decreasing with CD during the session. These results are consistent with prior reports [8,24]. Myo-inositol levels decreased during dialysis, but as a uremic toxin dialyzed by the membranes, the absence of differences does not provide information of interest.

### 3.4. Lipidic Metabolism-Related Metabolites

The decline of Acetylcarnitine levels during dialysis may not be due to activation of  $\beta$ -oxidation of fatty acids but losses through membranes. The lack of acetylcarnitine in DD-CKD patients has been related to cardiac complications, impaired functional capacities, symptomatic intradialytic hypotension, and erythropoietin-resistant anemia [33]. Its role in various neurodegenerative processes has also been hypothesized [34]. However, pre-dialysis levels in this study were higher than that of healthy adults [29]. Glycerol levels did not change, so no fatty acid release seemed to occur; however, some measurements were under the LQ, representing a potential bias for interpretation. Glycerol levels were far below physiological levels, despite enormous heterogeneity [29,35].

High levels of acetyl-CoA can combine into acetoacetyl-CoA, essential for synthesizing cholesterol and ketone bodies. 3-hydroxybutyrate levels increased during the dialysis treatment irrespective of the dialysate, indicating dialysis-induced lipolysis [32] and consistent

with previous reports stating that it is the second predominant organic acid produced during dialysis [8,24,32]. AD pre-dialysis measurements were higher, but CD levels were lower than physiological values [36]. Pre-dialysis CD acetoacetate levels were higher, but AD resulted in higher post-dialysis levels, as previously reported [8]. Acetoacetate levels were supraphysiological in all measurements [26]. This increase in ketone bodies is meaningful, as it was related to cardiovascular events and all-cause death in a Japanese population study [37].

### 3.5. Aminoacidic Metabolism-Related Metabolites

Glutarate and glutamate decreased during dialysis, although only glutamate reduction when using CD was statistically significant. Pre-dialysis levels of glutarate were higher than physiological levels [26], but glutamate levels were lower [38], reflecting inhibition of the metabolism of amino acids in addition to their high losses seen during sessions [39,40]. Glutamate can also be converted to 2-oxoglutarate by glutamate dehydrogenase, which increased during sessions.

### 3.6. Limitations

One limitation of this study is that we did not measure the effluent metabolome, which could have offered a more accurate approach to the real balance of metabolites as they are cleared with a sieving coefficient of approximately 1 [18]. In addition, we included patients with different vascular access, dialysis modalities, and comorbidities, that together with the non-identical electrolytes of both dialysates, may have biased the analysis. The number of metabolites measured was limited; thus, we may have missed other changes in important metabolic pathways. Finally, the study lacked a wash-out period, as patients had to continue their treatments.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Study Design and Participants

A unicentric, cross-over, prospective study was conducted at the hemodialysis unit of Hospital Universitari i Politècnic La Fe of Valencia, Spain, to analyze the inter-individual pre- and post-dialysis metabolic profile differences between the use of two dialysate acidifiers: Fresenius® ACF 3A5 acting as the acetate dialysate (AD), that contains 4 mmol/L of acetate, and Fresenius® SmartBag CA 211.5 as the citrate one (CD), with 1 mmol/L of citrate (Table 2).

**Table 2.** Dialysate characteristics and compounds.

	Fresenius ACF 3A5	Fresenius Smartbag CA 211.5
Sodium (mmol/L)	140	138
Potassium (mmol/L)	2	2
Calcium (mmol/mL)	1.5	1.5
Magnesium (mmol/mL)	0.5	0.5
Chloride (mmol/mL)	106	109
Acetate (mmol/L)	4	-
Citrate (mmol/L)	-	1
Glucose (g/L)	1	1
Bicarbonate (mmol/L)	35	32
In-use dilution	1 + 44	1 + 44

Each DD-CKD patient over 18 years old, prevalent (i.e., for at least three months), with a treatment scheme of four-hour sessions three times per week, was considered for inclusion. Patients were excluded if they had been admitted to the hospital within the previous month, refused to give written informed consent, or were on treatment with a low calcium dialysate (i.e., 1.25 mmol/L).



Every included patient received twelve dialysis sessions with each dialysate. We could not perform a wash-out period, given that dialysis is a life-sustaining treatment. Four blood samples were taken, pre- and post-dialysis on a midweek session after being exposed to each dialysate acidifier for four weeks. Dialysis parameters, medical treatment, and dialysate components, other than the acidifier, remained unchanged during the study to avoid potential confounders. In that sense, and to make the treatment parameters as similar as possible, bicarbonate and sodium concentration in both dialysates were adjusted in the monitor to 32 and 138 mmol/L, respectively. More details on the parameters of the dialysis treatments have been published previously [9].

#### 4.2. Variables

Quantitative data from a group of fifteen predetermined intermediate metabolites were collected (Table 2): 3-hydroxybutyrate and acetoacetate to evaluate ketogenesis; citrate, isocitrate, and 2-oxoglutarate to evaluate the first carbon oxidation pathway of the TCA cycle, and succinate, fumarate, and malate to evaluate the second pathway; pyruvate to evaluate glycolysis; lactate to evaluate anaerobic metabolism; acetylcarnitine to evaluate oxidation of fatty acids; glycerol, to evaluate triglyceride metabolism; myo-inositol to evaluate inositol phosphate metabolism; and glutamate and glutarate to evaluate aminoacidic metabolism (Table 3). Demographics and past medical history data were collected from electronic health records.

**Table 3.** Analyzed metabolites and their biochemical characteristics.

Metabolite	Chemical Formula	Molecular Mass (g/mol)	Biochemical Class	Main Metabolic Pathways
Acetylcarnitine	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	203.236	Fatty acid esters	Oxidation of fatty acids
Fumarate	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	116.072	Dicarboxylic acids and derivatives	TCA cycle (2nd carbon oxidation), electron transport chain
Citrate	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	189.1	Tricarboxylic acids and derivatives	TCA cycle (1st carbon oxidation), transfer of acetyl groups into mitochondria
Isocitrate	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	189.1	Tricarboxylic acids and derivatives	TCA cycle (1st carbon oxidation)
Myo-inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180.16	Alcohols and polyols	Inositol phosphate metabolism, secondary messenger in signal transduction pathways
Glutamate	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147.13	Amino acids, peptides, and analogues	Aminoacidic metabolism
Pyruvate	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	88.06	Alpha-keto acids and derivatives	Glycolysis, gluconeogenesis, lipogenesis
Malate	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	134.08	Beta hydroxy acids and derivatives	TCA cycle (2nd carbon oxidation), gluconeogenesis, pyruvate metabolism
Glycerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	92.09	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Triglyceride metabolism
Lactate	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	90.08	Alpha hydroxy acids and derivatives	Gluconeogenesis, pyruvate metabolism
2-oxoglutarate	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	146.11	Gamma-keto acids and derivatives	TCA cycle (1st carbon oxidation), aminoacidic metabolism
Acetoacetate	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	101.08	Short-chain keto acids and derivatives	Ketone body metabolism, fatty acid biosynthesis
Succinate	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	118.09	Dicarboxylic acids and derivatives	TCA cycle (2nd carbon oxidation), electron transport chain
3-hydroxybutyrate	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	103.1	Beta hydroxy acids and derivatives	Ketone body metabolism, fatty acid biosynthesis
Glutarate	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	147.13	Dicarboxylic acids and derivatives	Aminoacidic metabolism

TCA: Krebs tricarboxylic acid.

#### 4.3. Sample Preparation and Metabolomic Analysis

Metabolomic analysis of the processed samples was carried out in the Analytical Unit of the Medical Research Institute Hospital La Fe. Blood samples were drawn in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes, which were processed within 30 min of

collection to avoid platelet activation and protein production, as well as the decomposition of thermolabile compounds. Subsequently, they were centrifuged at 1500 g for 10 min at a temperature of 4 °C to separate the cellular fraction from the plasma. The upper phase, corresponding to the latter, was recovered and centrifuged again at 2500 g for another 15 min at 4 °C to eliminate platelets. The upper phase was recovered and aliquoted into cryo-freezing vials in volumes of 100–200 µL for freezing at –80 °C.

For analysis, 50 µL of the plasma samples were extracted, 150 µL of cold methanol was added, and the mixture was allowed to stand for 20 min at 20 °C to facilitate protein precipitation. The samples were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C, and the supernatant was recovered in Eppendorf tubes for evaporation in a SpeedVac. The dried sediment was reconstituted in water: methanol (98:2) 0.2% formic acid solution, to which phenylalanine-d5 was added as an internal calibrator.

An Agilent® 6460 triple-quadrupole mass spectrometer, using a liquid chromatography-mass spectrometry-based multiple reactions monitoring metabolomics platform optimized for detecting TCA cycle metabolites, was used to analyze the processed samples. A calibration curve was prepared, and the concentrations (ppb or µg/L) were calculated with internal calibration using the internal standard phe-d5. All reagents and chemicals were purchased from Sigma Aldrich.

#### 4.4. Statistical Analysis

Quantitative variables are reported with mean and standard deviation when normally distributed, or median and interquartile range when non-normally distributed, according to the Shapiro-Wilk test, while qualitative data are reported as absolute and relative frequencies. Results below the limit of quantification (LQ), only occurring within glycerol, were replaced by LQ/2. Data with no signal, or whose value was zero, were set as non-detected. A repeated-measures ANOVA was conducted to compare the normally distributed studied metabolites. A Greenhouse-Geisser correction was selected if data failed to meet Mauchly's test of sphericity. Post-hoc analysis with a Bonferroni adjustment was performed to make pairwise comparisons. If data had significant outliers or marked deviations from normality, the Friedman test was chosen as the non-parametric alternative. Post hoc analyses with Wilcoxon signed-rank tests were conducted with a Bonferroni correction applied to make the pairwise comparisons. A 2-sided  $p < 0.05$  was considered statistically significant; thus, after the Bonferroni adjustment, the new significance level was stated as 0.0125. Analyses were performed with IBM SPSS® Statistics 26th version and graphics with GraphPad Prism® 8th.

## 5. Conclusions

In conclusion, dialysis has a catabolic effect, and both dialysates modify the major pathways of intermediary metabolism. Still, this study provides some striking data comparing CD against AD that need further study to better understand the biochemical processes that dialysis and the different dialysate options induce in the patient's metabolism, leading to more personalized treatment prescriptions.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.J.B., M.R. and J.H.-J.; data curation, J.J.B., L.C.L.-R. and A.G.-B.; formal analysis, J.J.B. and M.R.; funding acquisition, J.H.-J.; investigation, J.J.B., D.R.-E. and E.C.-P.; methodology, J.J.B., M.R., R.D.-S., A.S., S.B.-G., P.S.-P. and J.H.-J.; project administration, J.J.B. and J.H.-J.; resources, J.H.-J.; supervision, M.R. and J.H.-J.; validation, M.R. and J.H.-J.; writing—original draft, J.J.B., D.R.-E. and E.C.-P.; writing—review & editing, J.J.B., M.R., D.R.-E., L.C.L.-R., A.G.-B., E.C.-P., R.D.-S., A.S., S.B.-G., P.S.-P. and J.H.-J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The authors received no financial support for this article.

**Institutional Review Board Statement:** The Clinical Research Ethics Committee of Hospital Universitari i Politècnic La Fe reviewed and approved this study protocol. All study subjects gave their written informed consent. Data collection followed Regulation (EU) 2016/679 (General Data

Protection Regulation), its subordinate national and regional laws, and the Declaration of Helsinki principles.

**Informed Consent Statement:** Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

**Data Availability Statement:** The data supporting the findings of this study are available on GitHub (<https://github.com/Broseta/Citrate-dialysate.git>, (accessed 29 July 2022)).

**Acknowledgments:** We would like to publicly thank all participating patients and the nursing staff of the Dialysis and Investigation Units of the Department of Nephrology of Hospital Universitari i Politècnic La Fe for their selfless and enthusiastic collaboration in this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Stegmayr, B. Dialysis Procedures Alter Metabolic Conditions. *Nutrients* **2017**, *9*, 548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hocher, B.; Adamski, J. Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2017**, *13*, 269–284. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28262773/> (accessed on 7 August 2021). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zhu, S.; Zhang, F.; Shen, A.-W.; Sun, B.; Xia, T.-Y.; Chen, W.-S.; Tao, X.; Yu, S.-Q. Metabolomics Evaluation of Patients with Stage 5 Chronic Kidney Disease before Dialysis, Maintenance Hemodialysis, and Peritoneal Dialysis. *Front. Physiol.* **2021**, *11*, 630646. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33551851/> (accessed on 7 August 2021). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kalantari, S.; Nafar, M. An update of urine and blood metabolomics in chronic kidney disease. *Biomark. Med.* **2019**, *13*, 577–597. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31140832/> (accessed on 7 August 2021). [[CrossRef](#)]
5. Tamura, M.K.; Chertow, G.M.; Depner, T.A.; Nissenson, A.R.; Schiller, B.; Mehta, R.L.; Liu, S.; Sirich, T.L. Metabolic Profiling of Impaired Cognitive Function in Patients Receiving Dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *27*, 3780–3787. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27444566/> (accessed on 7 August 2021). [[CrossRef](#)]
6. Hu, J.-R.; Grams, M.E.; Coresh, J.; Hwang, S.; Kovesdy, C.P.; Guallar, E.; Rhee, E.P.; Shafi, T. Serum Metabolites and Cardiac Death in Patients on Hemodialysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2019**, *14*, 747–749. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30962187/> (accessed on 7 August 2021). [[CrossRef](#)]
7. Petitclerc, T.; Diab, R.; le Roy, F.; Mercadal, L.; Hmida, J. Hémodialyse sans acétate: Qu'est-ce vraiment? *Néphrologie Thérapeutique* **2011**, *7*, 92–98. [[CrossRef](#)]
8. Sánchez-Canel, J.J.; Hernández-Jaras, J.; Pons-Prades, R. A Randomized Controlled Study on the Effects of Acetate-Free Biofiltration on Organic Anions and Acid-Base Balance in Hemodialysis Patients. *Ther. Apher. Dial.* **2015**, *19*, 63–72. [[CrossRef](#)]
9. Broseta, J.J.; López-Romero, L.C.; Cerveró, A.; Devesa-Such, R.; Soldevila, A.; Bea-Granell, S.; Sánchez-Pérez, P.; Hernández-Jaras, J. Improvements in Inflammation and Calcium Balance of Citrate versus Acetate as Dialysate Buffer in Maintenance Hemodialysis: A Unicentric, Cross-Over, Prospective Study. *Blood Purif.* **2021**, *50*, 914–920. [[CrossRef](#)]
10. Dellepiane, S.; Medica, D.; Guarena, C.; Musso, T.; Quercia, A.D.; Leonardi, G.; Marengo, M.; Migliori, M.; Panichi, V.; Biancone, L.; et al. Citrate anion improves chronic dialysis efficacy, reduces systemic inflammation and prevents Chemerin-mediated microvascular injury. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10622. [[CrossRef](#)]
11. Gabutti, L.; Lucchini, B.; Marone, C.; Alberio, L.; Burnier, M. Citrate- vs. acetate-based dialysate in bicarbonate haemodialysis: Consequences on haemodynamics, coagulation, acid-base status, and electrolytes. *BMC Nephrol.* **2009**, *10*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Pérez-García, R.; Chamond, R.R.; Ortiz, P.D.S.; Albalade, M.; Carretero, M.P.; Ortega, M.; Caro, M.C.R.; Arroyo, R.A. Citrate dialysate does not induce oxidative stress or inflammation in vitro as compared to acetate dialysate. *Nefrologia* **2017**, *37*, 630–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Grundström, G.; Christensson, A.; Alquist, M.; Nilsson, L.G.; Segelmark, M. Replacement of acetate with citrate in dialysis fluid: A randomized clinical trial of short term safety and fluid biocompatibility. *BMC Nephrol.* **2013**, *14*, 216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sands, J.J.; Kotanko, P.; Segal, J.H.; Ho, C.-H.; Usvat, L.; Young, A.; Carter, M.; Sergejeva, O.; Korth, L.; Maunsell, E.; et al. Effects of citrate acid concentrate (Citrasate®) on heparin N requirements and hemodialysis adequacy: A multicenter, prospective noninferiority trial. *Blood Purif.* **2012**, *33*, 199–204. [[CrossRef](#)]
15. Trakarnvanich, T.; Thirathanakul, S.; Sriphueng, N.; Thumrongthongjaroon, P.; Kurathong, S.; Ngamvichchukorn, T. The effect of citrate on clot formation, dialyzer reuse, and anemia in hemodialysis patients. *Blood Purif.* **2019**, *47*, 361–368. [[CrossRef](#)]
16. Rocha, A.D.; Padua, V.C.; Oliveira, E.; Guimaraes, M.M.; Lugon, J.R.; Strogoff de Matos, J.P. Effects of citrate-enriched bicarbonate based dialysate on anticoagulation and dialyzer reuse in maintenance hemodialysis patients. *Hemodial. Int.* **2014**, *18*, 467–472. [[CrossRef](#)]
17. Zarbock, A.; Küllmar, M.; Kindgen-Milles, D.; Wempe, C.; Gersch, J.; Brandenburger, T.; Dimski, T.; Tyczynski, B.; Jahn, M.; Mülling, N.; et al. Effect of Regional Citrate Anticoagulation vs Systemic Heparin Anticoagulation during Continuous Kidney Replacement Therapy on Dialysis Filter Life Span and Mortality among Critically Ill Patients with Acute Kidney Injury: A Randomized Clinical Trial. *JAMA—J. Am. Med. Assoc.* **2020**, *324*, 1629–1639. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33095849/> (accessed on 7 August 2021). [[CrossRef](#)]

18. Yamakawa, M.; Yamamoto, T.; Kishimoto, T.; Mizutani, Y.; Yatsuboshi, M.; Nishitani, H.; Hirata, S.; Horiuchi, N.; Maekawa, M. Serum levels of acetate and TCA cycle intermediates during hemodialysis in relation to symptoms. *Nephron* **1982**, *32*, 155–161. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7177293/> (accessed on 29 December 2021). [CrossRef]
19. Kuragano, T.; Kida, A.; Furuta, M.; Yahiro, M.; Kitamura, R.; Otaki, Y.; Nonoguchi, H.; Matsumoto, A.; Nakanishi, T. Effects of Acetate-Free Citrate-Containing Dialysate on Metabolic Acidosis, Anemia, and Malnutrition in Hemodialysis Patients. *Artif. Organs* **2012**, *36*, 282–290. [CrossRef]
20. Lorenz, G.; Mayer, C.C.; Bachmann, Q.; Stryeck, S.; Braunisch, M.C.; Haller, B.; Carbajo-Lozoya, J.; Schmidt, A.; Witthauer, S.; Abuzahu, J.; et al. Acetate-free, citrate-acidified bicarbonate dialysis improves serum calcification propensity—A preliminary study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2018**, *33*, 2043–2051. Available online: <https://academic.oup.com/ndt/advance-article/doi/10.1093/ndt/gfy134/5025720> (accessed on 20 June 2018). [CrossRef]
21. Bryland, A.; Wieslander, A.; Carlsson, O.; Hellmark, T.; Godaly, G. Citrate treatment reduces endothelial death and inflammation under hyperglycaemic conditions. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2012**, *9*, 42–51. [CrossRef] [PubMed]
22. Fournier, G.; Potier, J.; Thébaud, H.E.; Majdalani, G.; Ton-That, H.; Man, N.K. Substitution of acetic acid for hydrochloric acid in the bicarbonate buffered dialysate. *Artif. Organs* **1998**, *22*, 608–613. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9684700/> (accessed on 7 July 2022). [CrossRef] [PubMed]
23. Kishimoto, T.; Yamamoto, T.; Yamamoto, K.; Yamagami, S.; Nishitani, H.; Mizutani, Y.; Yamakawa, M.; Maekawa, M. Acetate Kinetics during Hemodialysis and Hemofiltration. *Blood Purif.* **1984**, *2*, 81–87. Available online: <https://www.karger.com/Article/FullText/169316> (accessed on 7 July 2022). [CrossRef]
24. Hernández-Jaras, J.; Estrada, A.; García-Cantón, C.; Traver, J. Equilibrio ácido-base y aniones orgánicos: Diferencias en biofiltración con acetato (bf) y hemodialísis con bicarbonato. *Nefrología* **1994**, *14*, 591–597. Available online: <https://www.revistanefrologia.com/es-equilibrio-acido-base-aniones-organicos-diferencias-articulo-X0211699594006762> (accessed on 11 July 2022).
25. Lundquist, F. Production and utilization of free acetate in man. *Nature* **1962**, *193*, 579–580. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14467396/> (accessed on 29 December 2021). [CrossRef]
26. Hoffmann, G.F.; Meier-Augenstein, W.; Stöckler, S.; Surtees, R.; Rating, D.; Nyhan, W.L. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J. Inher. Metab. Dis.* **1993**, *16*, 648–669. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8412012/> (accessed on 6 July 2022). [CrossRef]
27. Zordoky, B.; Sung, M.M.; Ezekowitz, J.; Mandal, R.; Han, B.; Bjorndahl, T.C.; Bouatra, S.; Anderson, T.; Oudit, G.Y.; Wishart, D.S.; et al. Metabolomic fingerprint of heart failure with preserved ejection fraction. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0124844. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26010610/> (accessed on 6 July 2022).
28. Wu, N.; Yang, M.; Gaur, U.; Xu, H.; Yao, Y.; Li, D. Alpha-Ketoglutarate: Physiological Functions and Applications. *Biomol Ther* **2016**, *24*, 1–8. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26759695/> (accessed on 6 July 2022). [CrossRef]
29. Psychogios, N.; Hau, D.D.; Peng, J.; Guo, A.C.; Mandal, R.; Bouatra, S.; Sinelnikov, I.; Krishnamurthy, R.; Eisner, R.; Gautam, B.; et al. The human serum metabolome. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e16957. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21359215/> (accessed on 6 July 2022). [CrossRef]
30. Martínez-Reyes, I.; Chandel, N.S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 102. Available online: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-13668-3> (accessed on 6 July 2022). [CrossRef]
31. Klysz, D.; Tai, X.; Robert, P.A.; Craveiro, M.; Cretenet, G.; Oburoglu, L.; Mongellaz, C.; Floess, S.; Fritz, V.; Matias, M.I.; et al. Glutamine-dependent  $\alpha$ -ketoglutarate production regulates the balance between T helper 1 cell and regulatory T cell generation. *Sci. Signal.* **2015**, *8*, ra97. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26420908/> (accessed on 6 July 2022). [CrossRef] [PubMed]
32. Sargent, J.A.; Marano, M.; Marano, S.; Gennari, F.J. Acid-base homeostasis during hemodialysis: New insights into the mystery of bicarbonate disappearance during treatment. *Semin. Dial.* **2018**, *31*, 468–478. [CrossRef] [PubMed]
33. Bellinghieri, G.; Santoro, D.; Calvani, M.; Mallamace, A.; Savica, V. Carnitine and hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* **2003**, *41*, S116–S122. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12612967/> (accessed on 6 July 2022). [CrossRef] [PubMed]
34. Virmani, A.; Binienda, Z. Role of carnitine esters in brain neuropathology. *Mol. Aspects Med.* **2004**, *25*, 533–549. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15363640/> (accessed on 6 July 2022). [CrossRef]
35. Blomqvist, G.; Alvarsson, M.; Grill, V.; Von Heijne, G.; Ingvar, M.; Thorell, J.O.; Stone-Elander, S.; Widén, L.; Ekberg, K. Effect of acute hyperketonemia on the cerebral uptake of ketone bodies in nondiabetic subjects and IDDM patients. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2002**, *283*, E20–E28. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12067838/> (accessed on 6 July 2022). [CrossRef]
36. Burns, S.F.; Broom, D.R.; Miyashita, M.; Ueda, C.; Stensel, D.J. Increased postprandial triacylglycerol concentrations following resistance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2006**, *38*, 527–533. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16540841/> (accessed on 6 July 2022). [CrossRef]
37. Obokata, M.; Negishi, K.; Sunaga, H.; Ishida, H.; Ito, K.; Ogawa, T.; Iso, T.; Ando, Y.; Kurabayashi, M. Association between circulating ketone bodies and worse outcomes in hemodialysis patients. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*, e006885. [CrossRef]

38. Trabado, S.; Al-Salameh, A.; Croixmarie, V.; Masson, P.; Corruble, E.; Fève, B.; Colle, R.; Ripoll, L.; Walther, B.; Boursier-Neyret, C.; et al. The human plasma-metabolome: Reference values in 800 French healthy volunteers; impact of cholesterol, gender and age. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173615. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28278231/> (accessed on 6 July 2022). [[CrossRef](#)]
39. Hendriks, F.K.; Smeets, J.S.J.; Broers, N.J.H.; van Kranenburg, J.M.X.; van der Sande, F.M.; Kooman, J.P.; van Loon, L.J.C. End-Stage Renal Disease Patients Lose a Substantial Amount of Amino Acids during Hemodialysis. *J. Nutr.* **2020**, *150*, 1160–1166. Available online: <https://academic.oup.com/jn/article/150/5/1160/5719508> (accessed on 8 July 2022). [[CrossRef](#)]
40. Lim, V.S.; Bier, D.M.; Flanigan, M.J.; Sum-Ping, S.T. The effect of hemodialysis on protein metabolism. A leucine kinetic study. *J. Clin. Investig.* **1993**, *91*, 2429–2436. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8514855/> (accessed on 8 July 2022). [[CrossRef](#)]





## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Visith Thongboonkerd,  
Mahidol University, Thailand

## REVIEWED BY

Andréa Emilia Marques Stinghen,  
Federal University of Paraná, Brazil  
Dorin Ionescu,  
Carol Davila University of Medicine and  
Pharmacy, Romania

## \*CORRESPONDENCE

José Jesús Broseta,  
jibroseta@clinic.cat

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to Renal  
Physiology and Pathophysiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

RECEIVED 06 August 2022

ACCEPTED 27 October 2022

PUBLISHED 16 November 2022

## CITATION

Broseta JJ, Roca M,  
Rodríguez-Espinosa D,  
López-Romero LC, Gómez-Bori A,  
Cuadrado-Payán E, Bea-Granell S,  
Devesa-Such R, Soldevila A,  
Sánchez-Pérez P and  
Hernández-Jaras J (2022), The  
metabolomic differential plasma profile  
between dialysates. Pursuing to  
understand the mechanisms of citrate  
dialysate clinical benefits.  
*Front. Physiol.* 13:1013335.  
doi: 10.3389/fphys.2022.1013335

## COPYRIGHT

© 2022 Broseta, Roca, Rodríguez-  
Espinosa, López-Romero, Gómez-Bori,  
Cuadrado-Payán, Bea-Granell, Devesa-  
Such, Soldevila, Sánchez-Pérez and  
Hernández-Jaras. This is an open-  
access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution  
or reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# The metabolomic differential plasma profile between dialysates. Pursuing to understand the mechanisms of citrate dialysate clinical benefits

José Jesús Broseta<sup>1\*</sup>, Marta Roca<sup>2</sup>, Diana Rodríguez-Espinosa<sup>1</sup>,  
Luis Carlos López-Romero<sup>3</sup>, Aina Gómez-Bori<sup>3</sup>,  
Elena Cuadrado-Payán<sup>1</sup>, Sergio Bea-Granell<sup>4</sup>,  
Ramón Devesa-Such<sup>3</sup>, Amparo Soldevila<sup>3</sup>, Pilar Sánchez-Pérez<sup>3</sup>  
Julio Hernández-Jaras<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology and Renal Transplantation, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain,

<sup>2</sup>Analytical Unit Platform, Medical Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain,

<sup>3</sup>Department of Nephrology, Hospital Universitari I Politècnic La Fe, Valencia, Spain, <sup>4</sup>Department of Nephrology, Consorci Hospital General Universitari de València, Valencia, Spain

**Background:** Currently, bicarbonate-based dialysate needs a buffer to prevent precipitation of bicarbonate salts with the bivalent cations, and acetate at 3–4 mmol/L is the most used. However, citrate is being postulated as a preferred option because of its association with better clinical results by poorly understood mechanisms. In that sense, this hypothesis-generating study aims to identify potential metabolites that could biologically explain these improvements found in patients using citrate dialysate.

**Methods:** A unicentric, cross-over, prospective untargeted metabolomics study was designed to analyze the differences between two dialysates only differing in their buffer, one containing 4 mmol/L of acetate (AD) and the other 1 mmol/L of citrate (CD). Blood samples were collected in four moments (i.e., pre-, mid-, post-, and 30-min-post-dialysis) and analyzed in an untargeted metabolomics approach based on UPLC-Q-ToF mass spectrometry.

**Results:** The 31 most discriminant metabolomic variables from the plasma samples of the 21 participants screened by their potential clinical implications show that, after dialysis with CD, some uremic toxins appear to be better cleared, the lysine degradation pathway is affected, and branched-chain amino acids post-dialysis levels are 9–10 times higher than with AD; and, on its part, dialysis with AD affects acylcarnitine clearance.

**Conclusion:** Although most metabolic changes seen in this study could be attributable to the dialysis treatment itself, this study successfully identifies some metabolic variables that differ between CD and AD, which raise new hypotheses that may unveil the mechanisms involved in the clinical improvements observed with citrate in future research.

## KEYWORDS

hemodialysis, untargeted metabolomics, citrate, acetate-free, acetate, dialysate

## 1 Introduction

Metabolomics is the comprehensive study of endogenous small mass molecules (i.e., less than 1.5 kDa) referred to as metabolites, such as lipids, amino acids, vitamins, steroids, sugars, nucleotides, fatty acids, and organic acids. Unlike genomics, metabolites are dynamic, as extrinsic factors constantly modify them. Their study potentially provides a deeper insight into the human body's response to various situations and delivers the information necessary to analyze their pathophysiological relevance (Roca et al., 2021). In the field of chronic kidney disease (CKD), it has been used to discover new uremic toxins, biomarkers that improve the stratification of the disease, and its interaction with other diseases such as diabetes, inflammatory conditions, stress, energy metabolism, kidney disease progression, or renal cancer, among others (Sharma et al., 2013; Duranton et al., 2014; Hallan et al., 2017; Hocher and Adamski, 2017; Oto et al., 2020; Zhu et al., 2021).

Moreover, with these methods and specifically in dialysis-dependent CKD (DD-CKD) patients, several metabolites have been correlated with cardiovascular disease and death, inflammatory parameters, nutritional status, cognitive function, hypoxia and oxidative stress, body mass wasting, uremic pruritus, and sleep cycle disturbance (Kurella Tamura et al., 2016; Hu et al., 2019; Kalantari and Nafar, 2019; Bolanos et al., 2021). It has also been used to compare dialysis techniques, but no study on dialysate effects has been performed (Sato et al., 2011). In fact, the dialysate composition is a relevant element of the treatment that has been understudied (Basile and Lomonte, 2015).

Currently, bicarbonate-based dialysate needs a buffer to prevent precipitation of bicarbonate salts with the bivalent cations, and acetate, at doses of 3–4 mmol/L, is the most used (Petitclerc et al., 2011). However, its use is associated with hemodynamic instability, increased oxidative stress, and an inflammatory cardiac profile (Gabutti et al., 2009; Grundström et al., 2013; Pérez-García et al., 2017; Dellepiane et al., 2019; Broseta et al., 2021). Therefore, several compounds have been tested to serve as alternatives to acetate. From them, citrate is being postulated as the preferred option because of its association with an improved hemodynamic tolerance, a reduction in cardiac inflammatory biomarkers, a better acid-base status, a reduction in vascular calcification, and the dose of anticoagulants needed, in most cases by unclear mechanisms (Gabutti et al., 2009; Kossmann et al., 2009; Daimon et al., 2011; Bryland et al., 2012; Kuragano et al., 2012; Rocha et al., 2014; de Sequera et al., 2015; Pérez-García et al., 2017; Lorenz et al., 2018; Dellepiane et al., 2019;

Sequera et al., 2019; Trakarnvanich et al., 2019; Villa-Bellosta et al., 2019; Broseta et al., 2021). Unfortunately, all these mentioned metabolomic studies were performed in patients using acetate as dialysate buffer, while there is no data on the metabolic profile in patients using citrate or comparing both.

In this paper, we analyze the metabolic profile in plasma from DD-CKD patients treated with either citrate or acetate dialysates to investigate the metabolic variations induced by the hemodialysis treatment itself and the differences between both dialysates aiming not to demonstrate causal relations but to contribute to this lack of information by raising hypotheses on these unknown biochemical mechanisms.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Study design and participants

DD-CKD patients in chronic hemodialysis at Hospital Universitari i Politècnic La Fe in Valencia, Spain, were considered for inclusion in this unicentric, cross-over, prospective study. Inclusion criteria were being over 18 years old, prevalent (i.e., for at least 3 months), with a treatment scheme of 4-h sessions three times per week; while exclusion ones were having been hospital admitted or discharged within the previous month, being on treatment with a low calcium dialysate (1.25 mmol/L) or declining to give written informed consent.

Patients were followed-up for twenty-four dialysis sessions, twelve with each dialysate (i.e., Fresenius® ACF 3A5 acting as the acetate dialysate (AD), that contains 4 mmol/L of acetate, and Fresenius® SmartBag CA 211.5 as the citrate one (CD), with 1 mmol/L of citrate (Table 1)). Dialysis parameters (blood and dialysate flows and treatment time), medical treatment received, and dialysates' components, other than the acidifier, remained unchanged during the study to avoid potential confounders. More details on the characteristics of the parameters of the dialysis treatments can be found in a previously published work (Broseta et al., 2021).

### 2.2 Blood samples collection and preparation

In the twelfth session, which was always a midweek one, patients' blood samples were taken at four different moments: pre-dialysis; 60 min after the start of the session (mid-



TABLE 1 Dialysate characteristics and compounds.

	Fresenius ACF 3A5	Fresenius Smartbag CA 211.5
Sodium (mmol/L)	140	138
Potassium (mmol/L)	2	2
Calcium (mmol/mL)	1.5	1.5
Magnesium (mmol/mL)	0.5	0.5
Chloride (mmol/mL)	106	109
Acetate (mmol/L)	4	-
Citrate (mmol/L)	-	1
Glucose (g/L)	1	1
Bicarbonate (mmol/L)	35	32
In-use dilution	1 + 44	1 + 44

Adapted from (Broseta et al., 2021)

dialysis), the time at which metabolism would be saturated, as based on previous studies [Hernández-Jaras et al., 1994](#); post-dialysis; and 30-min post-dialysis (rebound) by analogy to the urea rebound. They were drawn in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes and processed within 30 min of collection to avoid platelet activation, protein production, and the decomposition of thermolabile compounds.

Subsequently, a protein precipitation step is made by adding to the 50  $\mu$ L of plasma samples a cold solvent of 150  $\mu$ L of acetonitrile (ACN) with 0.1% formic acid (FA) and vortexed for 30 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Afterward, it was centrifuged at 13,000 g for 10 min at a temperature of  $4^{\circ}\text{C}$  to separate the cellular fraction from the plasma. The upper phase, corresponding to the latter, was recovered and aliquoted into Eppendorf's tubes for subsequent freezing and storing at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

20  $\mu$ L of this extract were transferred to a 96 well-plate for LC-MS analysis. Plasma was then diluted by adding 70  $\mu$ L of  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1% v/v FA and 10  $\mu$ L of an internal standard solution containing phenylalanine-d5, caffeine-d9, leukine enkephaline, and reserpine in  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1, 0.1% v/v  $\text{HCOOH}$ ) at 20  $\mu\text{M}$ . Once the plate was ready, 10  $\mu$ L of each sample were collected and prepared for quality control (QC). On its part, blank samples were prepared by replacing plasma with ultrapure  $\text{H}_2\text{O}$  in the same extraction tube and following the same sample preparation process as the real plasma ones.

To avoid intra-batch variability and enhance quality and reproducibility, the scheme analysis of samples was performed by random injection order, and at least 5 QC were analyzed at the beginning of the sequence to condition the column and equipment, and at every 5–7 plasma samples to monitor and correct changes in the instrument response as well for filtration and identification purposes. Blank analysis was performed at the end of the sequence and used to identify artifacts from sampling.

### 2.3 Untargeted Metabolomics Based on UPLC-Q-ToF Mass Spectrometry.

The metabolomic analysis of the processed samples was carried out in the Analytical Unit of the Medical Research Institute Hospital La Fe by an Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) system coupled to an iFunnel Q-ToF Agilent 6,550 mass spectrometer (Agilent Technologies, CA, United States). Reversed-phase chromatographic separation was performed using a UPLC BEH C18 column (100  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , Waters, Wexford, Ireland). Autosampler and column temperatures were set to 4 and  $40^{\circ}\text{C}$ , respectively, and the injection volume was 5  $\mu\text{L}$ . Mobile phase A and Mobile phase B consisted of  $\text{H}_2\text{O}$  and ACN, both containing 0.1% of FA. The gradient elution was 14 min at a flow rate of 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . The mobile phase A ( $\text{H}_2\text{O}$  0.1% v/v  $\text{HCOOH}$ ) was maintained at 98% for 1 min then decreased to 75% in 2 min, 50% in 3 min, and 5% in 3 more min. 95% of mobile phase B ( $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0.1% v/v  $\text{HCOOH}$ ) was held for 3 min, and then a 0.55 min gradient was used to return to the initial conditions, which were held for 2.5 min for a total column recovery. Full scan MS data from 100 to 1,700 Da were collected in positive (ESI +) electrospray ionization mode. All reagents and chemicals were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, United States). An in-depth review of the sample preparation methodology used by our group has already been published ([Roca et al., 2021](#)).

### 2.4 Data pre-processing

Data processing was done using an in-house R (v.3.6.1) processing script with XCMS and CAMERA packages for peak detection, noise filtering, alignment and normalization. Parameters selected were: CentWave method (noise = 1,000;

ppm = 50; k = 5; I = 300; snthresh = 10; min = 6; max = 25; integrate = 2; nS = 4); matching peaks across samples (grouping): Density method (mzwid = 0.05; bw = 1; mF = 0.5; mS = 1); retention time correction (m = 0; e = 0); integration of samples: FillPeaks method; median fold change normalisation: medFC technique; and CAMERA isotopes: FindIsotopes.

The data matrix finally obtained was composed of molecular features consisting of two values: accurate mass (m/z) and retention time (min). To avoid bias, all the samples were processed simultaneously and analyzed in the same batch; therefore, no inter-batch correction was needed. Samples were randomly analyzed to avoid possible intra-batch variance, and internal standards were used to calculate possible variations or drifts during the analysis. Also, a locally estimated scatterplot smoothing (LOESS) normalization with QC samples was performed to normalize our data. The data were filtered according to the quality assurance criteria of coefficient of variation <30% in QC samples and if the percentage of 0 was greater than 60%.

## 2.5 Metabolomics statistical analysis

Firstly, a pre-selection of significant molecular features between groups was selected by a Volcano Plot carried out using an in-house script in the R platform, combining a Fold Change (FC) method with the significance of a paired Student's t-test for normally distributed variables or Wilcoxon signed-rank test for skewed data after performing Shapiro-Wilks test for normality. From this, molecular features with a stronger combination of FC ( $|\log_2 FC| > 1$ ) and statistical significance ( $p$ -value < 0.05) in each comparison were selected after a false discovery rate adjustment by a Benjamini–Hochberg procedure.

A multivariate analysis was then carried out with the significant features selected in this previous analysis, by using the OMICS skin of the SIMCA software (Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, France). Firstly, an exploratory unsupervised principal component analysis (PCA) was performed to extract as much information as possible and to try to recognize patterns of behavior, simplifying the variability of the data by looking for how they were distributed according to their similarities or differences and grouping them into principal components. In a second step, a supervised orthogonal projection to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) was used to determine the main discriminant variables responsible for the differences between groups. The validity and robustness of the models were evaluated by  $R^2(Y)$  (goodness-of-fit) together with  $Q^2(Y)$  (goodness-of-prediction), considering a  $Q^2(Y)$  prediction ability higher than 0,5 as the acceptability threshold, a  $p$ -value of the analysis of variance testing of cross-validated predictive residuals (CV-ANOVA) analysis inferior to 0,05 as significant, and a 1,000-iterations permutation test with the new diagnoses  $R^2$  and  $Q^2$  significantly lower than the real ones.

The selected variables were obtained from the first thirty variables ordered by the variance in importance in projection values (VIP) with a score greater than 1, a jack-knife confidence interval that did not include zero, and a FC greater than 1.2. Each feature was also verified by extracting each ion chromatogram (m/z) in some QC raw data and checking for peak shape and retention time. For each comparison, the PCA score plot, OPLS-DA score plot, and the list of molecular features finally selected are presented.

## 2.6 Potential metabolites annotation

Once the discriminant variables were selected, tentative annotation of the metabolites was made using the METLIN database (<https://metlin.scripps.edu/>) and Human Metabolome Database (HMDB) (<http://www.hmdb.ca/>) by querying their m/z within a range of  $\pm 10$  ppm. The following adducts were included: M + H and M + Na and M + H-H<sub>2</sub>O. A verification of the fragmentation spectra in MS/MS mode of the metabolites annotated in the previous step was performed by comparing each experimentally MS/MS spectra obtained from both data dependent (DDA) and data independent analysis (DIA) carried out in some QC, by comparing their MS/MS spectra with those presented in databases. Annotation of metabolites has been made according to the Chemical Analysis Working Group of the Metabolomics Standards Initiative (Sumner et al., 2007). Where identified metabolites (level 1) are those confirmed based on the agreement of their accurate mass (m/z), retention time, and MS/MS spectral with commercially available chemical standards. If unavailable, metabolites are putatively annotated (level 2) when their m/z and MS/MS spectra match with HMDB and Metlin databases or putatively characterized (level 3) if only their m/z coincide with those databases. Molecular features not annotated (level 4) represent less reliable annotation classifications.

## 3 Results

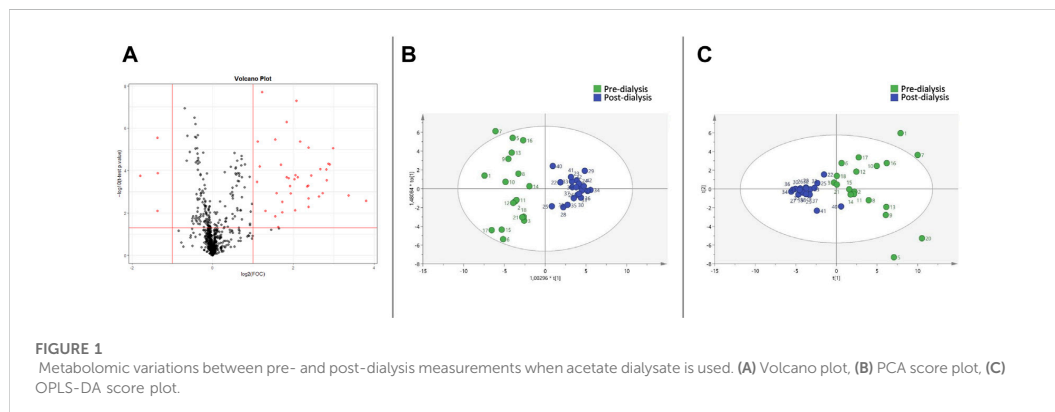
### 3.1 Participants

Twenty-one included patients with a mean age of  $62.25 \pm 13.77$  years (range 33.05–82.26) years, a body mass index of  $25.19 \pm 5.52$  kg/m<sup>2</sup>, of which eleven (52%) were females, were included. Two (9.5%) were on high-flux hemodialysis, and nineteen (90.5%) were on post-dilution online hemodiafiltration, with a mean dialysis vintage of  $151.48 \pm 308.43$  months. Twelve (57.1%) patients were dialyzed through an arteriovenous fistula and nine (42.9%) through a tunneled catheter. There were no statistically significant differences between dialysate groups in terms of Kt/V ( $2.06 \pm 0.42$  with AD vs.  $2.15 \pm 0.35$  with CD), dialyzed blood volume ( $84.25 \pm$

TABLE 2 Clinical characteristics and dialysis parameters of the included patients.

Patient	Sex	Age (years)	Coexisting disorders	CKD etiology	Dialysis vintage (months)	Vascular access	BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	KT/V		Dialyzed blood volume (L/session)		Substitution volume (L/session)	
								AD	CD	AD	CD	AD	CD
1	M	73	HT, DLP, active smoker, COPD	ADPKD	103	AVF	25.15	1.69	1.54	106.4	104.2	28	27.6
2	F	82	HT, DLP, HVD, COPD	NAE	50	CVC	17.85	2.16	2.25	64	66.1	16.3	16.6
3	F	58	Bilateral adrenalectomy, asthma	Nephrectomy	23	AVF	20.6	2.62	2.48	80.7	83	25.9	22.4
4	M	50	T2D, HT, DLP, liver cirrhosis, PH	DKD	61	AVF	34.4	1.63	1.83	100.6	100.2	24.5	24.8
5	M	74	HT, DLP, T2D, CAD, HVD, PAD former smoker	DKD	76	AVF	20.26	2.63	2.49	98	82.5	27.5	25
6	F	53	HT, HVB and HVC chronic hepatitis, HIV, Stroke, TB, HT, PAD	Unknown	96	AVF	20.34	2.25	2.29	95.9	100	24.7	22.5
7	F	52	HT, DLP, HVC, HIV, TB	KSD	23	AVF	19.29	2.52	2.33	93.5	91.2	24.8	27.5
8	M	45	HT, DLP, HCV, HIV	Unknown	87	AVF	25.95	1.81	1.67	92.7	92.7	27	25.6
9	M	77	HT, DLP, T2D, AFib, HVD, COPD, bladder tumor	DKD	15	CVC	23.03	2	1.9	93.3	92.4	24.4	22
10	M	39	HT, HCV, HBV, seizure disorder	Bilateral renal dysplasia	381	AVF	25.78	2.41	2.64	80.5	79.2	26.2	25.2
11	F	66	T2D, HT, DLP, OSAS, HfpEF, CAD, poliomyelitis	DKD	9	CVC	31.69	2.07	2.05	71	71.3	0	0
12	F	47	HT, active smoker	Chronic GN	162	CVC	20.57	2.15	2.34	86.2	92	21.6	13.9
13	F	70	HT, CAD, AFib, HVD, HfpEF	Chronic pyelonephritis	235	CVC	32.26	2.45	2.36	90.4	81.5	26.4	25.1
14	M	33	DLP, seizure disorder, Angelman syndrome, short bowel syndrome	Secondary hyperoxaluria	38	CVC	21.62	1.48	1.72	65.4	70	13.2	19.1
15	F	80	HT, DLP	Unknown	16	CVC	18.89	1.99	2.45	51.6	88.6	18.5	20.4
16	M	59	T2D, HT, DLP, HCV	DKD	101	AVF	28.01	1.21	1.68	78.6	82.1	20.4	23.5
17	F	63	HT, DLP, active smoker, hypothyroidism, nephrectomy	FSGS	31	AVF	28.98	1.87	1.94	78.4	79.8	24.6	24.4
18	M	67	T2D, HT, DLP, bipolar disorder	Unknown	18	AVF	33.84	1.75	1.92	91.1	90.2	24.8	25.2
19	F	59	T2D, DLP, active smoker, COPD, stroke, PAD	ADPKD	10	CVC	33.09	1.5	2.05	69.8	85.7	0	0
20	M	72	HCV, liver transplant recipient	Unknown	211	CVC	19.81	2.49	2.67	92.2	90.3	21.3	22.9
21	F	80	T2D, HT, DLP, HCV	DKD	1,435	AVF	27.62	2.63	2.53	89	91.6	23.4	25.1

AD, acetate dialysate; ADPKD, autosomal dominant polycystic kidney disease; AFib, atrial fibrillation; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; CD, citrate dialysate; CKD, chronic kidney disease; COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease; CVC, central venous catheter; DKD, diabetic kidney disease; DLP, dyslipidemia; F, female; FSGS, focal and segmentary glomerulosclerosis; GN, glomerulonephritis; HfpEF, heart failure with preserved ejection fraction; HIV, human immunodeficiency virus; HT, hypertension; HVB, hepatitis B virus; HVC, hepatitis C virus; HVD, heart valve disease; KSD, kidney stone disease; M, male; NAE, nephroangioecteros; OSAS, Obstructive Sleep Apnea Syndrome; PAD, peripheral arterial disease; PH; pulmonary hypertension; T2D, Type 2 diabetes, TB, tuberculosis



13.79 L with AD vs.  $86.41 \pm 9.89$  L with CD), or substitution volume ( $21.12 \pm 7.95$  L with AD vs.  $20.9 \pm 7.71$  with CD). Individual measured values and clinical characteristics of each patient can be seen in [Table 2](#).

### 3.2 Variations between measurement times

In a preliminary analysis, the pre-dialysis samples were found to be statistically significantly different compared to the mid-dialysis, post-dialysis, and rebound ones; however, there were no differences in the pairwise comparison of the mid-dialysis, post-dialysis, and rebound samples. This finding happened both when using AD and CD and reflects that 60 min after the beginning of the session, the metabolism has achieved its saturation and remains stable during the dialysis session, as well as that these changes in the metabolism are kept for 30 min after its termination, not arriving to the equilibrium. Thus, we only further analyzed the pre- and post-dialysis measurements considering that these would be more reliable than those of mid-dialysis or the rebound.

The Volcano Plot showed 43 significantly different variables between patients' pre- and post-dialysis blood samples after dialysis performed with the AD ([Figure 1A](#)). With these 43 variables, PCA ([Figure 1B](#)) and OPLS-DA score plots ([Figure 1C](#)) were constructed, showing that the model discriminates between pre- and post-dialysis times. The model diagnostics were adequate, and the model was successfully validated. As we can observe in [Figure 1C](#), the pre-dialysis samples showed quite a lot of variability between them, while at post-dialysis time, the variability decreased and behaved similarly. From this model, the most important discriminant variables were selected according to their VIP score ( $>1$ ), a jack-knife confidence interval that did not include zero, and a FC greater than 1.2. A search in the databases was performed for

annotation of those features as potential metabolites. The annotated variables are shown in [Table 3](#) if they were found in the comparisons between times with either dialysate or in [Table 4](#) if they were only found with AD or CD.

Similarly, the Volcano Plot ([Figure 2A](#)) comparing the pre- and post-dialysis blood samples using CD showed 42 significantly different variables. PCA ([Figure 2B](#)) and OPLS-DA ([Figure 2C](#)) score plots were also elaborated, and the model was validated. The pre-dialysis samples also had increased variability compared to those of the post-dialysis time. The most important discriminant variables were selected according to the previous procedure, and those annotated metabolites are described in [Tables 3, 4](#), as previously mentioned.

### 3.3 Variations between dialysates

No metabolomic differences were found between pre-dialysis samples with AD vs. CD. On its part, when comparing post-dialysis and rebound measurements, only one variable was selected in the Volcano Plot ([Figure 3](#)), being the same in both timings; thus, a multivariate analysis was not performed. This variable and its identification are shown in [Table 5](#). According to their potential clinical relevance discussed below, the relative intensities of the selected metabolic variables have been represented as violin plots ([Figure 4](#)).

## 4 Discussion

CKD has an important impact on metabolism. Thus, metabolomics has been instrumental in identifying new biomarkers that can enhance our understanding of the mechanisms and pathways that underlie renal diseases and improve diagnosis and prognosis estimations ([Hocher and Adamski, 2017](#)). In that sense, hemodialysis, the most used

TABLE 3 Identification of the most discriminant metabolomic variables between pre- and post-dialysis with both dialysates.

Accurate mass (m/z)	Retention time (min)	Adduct ion	Formula	Identification of variables		Compound class	Fold change (Post- vs pre-dialysis)	
				Metabolite annotation	Confidence level		Acetate dialysate	Citrate dialysate
136.0485	0.621	M + Na	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	Creatinine	3	Alpha amino acids and derivatives	0.46	0.46
98.98454	0.682	M + H	H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	Hydrogen phosphate	3	Non-metal phosphates	0.31	0.25
160.1335	0.715	M + H	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	Pregabalin	3	Gamma amino acids and derivatives	0.24	0.23
229.1549	0.723	M + H M + Na	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	DL-2-Aminooctanoic acid	1	Alpha amino acids	0.13	0.13
				Methacholine		Tetraalkylammonium salts		
				Propionylcholine		Acyl cholines		
				L-isoleucyl-L-proline		Dipeptides		
				2-Benzylheptanol		Benzyl alcohols		
				4-(1.1.3.3-Tetramethylbutyl)-phenol		Phenylpropanes		
151.0617	0.725	M + H	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> S <sub>2</sub>	Etaspirene	3	Dihydrofurans	0.14	0.12
				Neocaspiene		Monoterpenoids		
				α-Irone, (Z)-α-Irone, Methyl-δ-ionone, Methyl-ionone, δ-Methylionone, β-Methylionone, α-Isomethylionone		Sesquiterpenoids		
				1-Methylhypoxanthine, 7-Methylhypoxanthine		Hypoxanthines		
				xi-1-(Propylthio)-1-propanethiol		Hemiacetals		
				1,6-Hexanedithiol		Alkylthiols		
153.0666	0.726	M + H	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>2</sub> C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Diisopropyl disulfide, Methyl pentyl disulfide, Dipropyl disulfide, Methyl isopentyl disulfide, Butyl ethyl disulfide	1	Dialkyldisulfides	0.34	0.33
				Aminochrome o-semiquinone		Indolines		
				2-Amino-4-nitrotoluene, 4-Amino-4-nitrotoluene		Nitrobenzenes		
				N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide, N-methyl-4-pyridone-3-carboxamide		Nicotinamides		
207.1111	2.982	M + Na	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3-Pyrimidin-2-yl-Propionic Acid, 2-Pyrimidin-2-yl-Propionic Acid	2	Propanoic acids and derivatives	0.19	0.19
				2-benzoxazolol		Benzoxazolones		
				N-(3-acetamidopropyl)pyrrolidin-2-one		N-alkylpyrrolidines		
307.0875	3.963	M + H M + Na M + H-H <sub>2</sub> O	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> ClO C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub> S	3-[(3-methylbutyl) (nitroso) amino]but-3-en-2-one	3	α-branched α,β-unsaturated ketones	0.06	0.06
				3-[(3-methylbut-3-en-1-yl) (nitroso)amino]butan-2-one		Organic N-nitroso compounds		
				4-(2-chloro-1,2-diphenylethenyl)phenol		Stilbenes		
				arabinofuranosylguanine		Purine nucleosides		
				3,4,5-trihydroxy-6-[[[(1-hydroxy-2-methylidene-pentan-3-yl)sulfanyl]oxy]oxane-2-				

(Continued on following page)

TABLE 3 (Continued) Identification of the most discriminant metabolomic variables between pre- and post-dialysis with both dialysates.

Accurate mass (m/z)	Retention time (min)	Adduct ion	Formula	Identification of variables		Compound class	Fold change (Post- vs pre-dialysis)	
				Metabolite annotation	Confidence level		Acetate dialysate	Citrate dialysate
84.04482	3.963	M + H-H <sub>2</sub> O	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	carboxylic acid, 3,4,5-trihydroxy-6-((5-hydroxy-4-methylpent-1-en-3-yl)sulfanyl)oxane-2-carboxylic acid 1-Aminocyclopropanecarboxylic acid, (S)-2-Azetidinecarboxylic acid L-3-Aminodihydro-2(3H)-furanone 2,3-Dihydroxy-2-methylpropanenitrile	3	Alpha amino acids  Alpha amino acid esters Alcohols and polyols	0.19	0.22
91.05471	3.963	M + H-H <sub>2</sub> O	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	p-Cresol, m-Cresol, o-Cresol  Benzyl alcohol Anisole	3	Cresols  Benzyl alcohols Anisoles	0.16	0.16
185.0239	3.963	M + H  M + Na  M + H-H <sub>2</sub> O	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P  C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> S  C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Ifosforamide aziridinium  1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene 1-(Methylsulfanyl)-1-oxopropan-2-yl acetate Bergaptol	3	Organic phosphoric acid diamides  α-branched α,β-unsaturated ketones Thioesters  Bergaptols	0.11	0.12
335.0825	3.963	M + H-H <sub>2</sub> O	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Xanthotoxol N-(Carboxyoxacetyl)-4-chloro-L-tryptophan	3	8-hydroxypsoralens N-acyl-alpha amino acids	0.12	0.11
364.0358	3.963	M + Na	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>4</sub>	7-Chloro-6-demethylcepharadione B	1	Oligosaccharides	0.11	0.09
265.1192	3.963	M + H/M + Na  M + Na	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>  C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	Acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine  N(2)-phenylacetyl-L-glutamate 4,4'-(2-methylpropylidene)bisphenol, 4,4'-(Butane-1,1-diyl)disphenol, Bisphenol B 4,4a,5,6,7,8-hexahydro-6-(p-hydroxyphenyl)-2(3H)-naphthalenone	1	Alkyl-phenylketones  Glutamine and derivatives Bisphenols Cyclohexylphenols	0.09	0.09
287.1013	3.964	M + H	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	3',4'-Dihydrodiol S-1-1'Bi-2-naphthol	1 2	Phenylhydantoins Naphthols and derivatives	0.06	0.06
153.0665	0.990			Unknown	4		0.34	0.33

Confidence level: 1: identified metabolites, 2: putatively annotated, 3: putatively characterized; 4: unknown

kidney replacement therapy though it does not replace all healthy kidney functions, is associated with perturbations in plasma metabolic profiles and would add to the alterations already found in non-dialysis-dependent chronic kidney disease patients in comparison to healthy controls.

This hypothesis-generating untargeted metabolomics study contributed to the identification of different metabolites whose measured plasma concentrations were affected by the diffusive clearance observed from the hemodialysis sessions *per se* but also successfully identified some others whose concentrations

TABLE 4 Identification of the most discriminant metabolomic variables between pre- and post-dialysis with differences between dialysates.

Accurate mass (m/z)	Retention time (min)	Adduct ion	Formula	Identification of variables		Compound class	Fold change (Post-vs. pre-dialysis)
				Metabolite annotation	Confidence level		
Citrate dialysate							
151.1442	0.623	M + Na	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>	2,3,4-Trimethylhexane 4-methyloctane 2,4-dimethylheptane 2,3-dimethylheptane 3,4-dimethylheptane Nonane	3	Branched alkanes	0.12
76.07599	0.627	M + H	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> NO	Trimethylamine N-oxide (TMAO) 1-Amino-propan-2-ol	3	Trialkyl amine oxides 1,2-aminoalcohols	0.20
110.0605	0.683	M + H	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO	1-Methyl-2-pyrrolicarboxaldehyde 2-Acetylpyrrole N-Phenylhydroxylamine	3	Aryl-aldehydes Aryl alkyl ketones Benzene and substituted derivatives	0.21
		M + H- H <sub>2</sub> O	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	4-Aminophenol 2,3,4,5-Tetrahydro-2-pyridinecarboxylic acid 4-Methylenepoline 1-Piperidine-2-carboxylic acid	3	Aniline and substituted anilines Alpha amino acids and derivatives Proline and derivatives Tetrahydropyridines	
77.03899	3.847	M + H-H <sub>2</sub> O	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	Phenol Vinylfuran	3	1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids Furans	0.21
105.0341	3.847	M + H-H <sub>2</sub> O	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	4-Hydroxybenzaldehyde 3-Hydroxybenzaldehyde 2-Hydroxybenzaldehyde 3-(2-Furanyl)-2-propenal Benzoic acid	3	Hydroxybenzaldehydes Heteroaromatic compounds Benzoic acids	0.22
250.0295	3.847	M + H-H <sub>2</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	Nitrososulfamethoxazole	3	Benzenesulfonamides and derivatives	0.23
180.0657	3.847	M + H/ M + Na	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	Hippuric acid Adrenochrome 3-Succinoylpyridine 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitroethylene Methyl n-formylanthranilate [hydroxy(2-methylphenyl)methylidene]carbamic acid	3	Hippuric acids Indoles and derivatives Gamma-keto acids and derivatives Anisoles Acylaminobenzoic acid and derivatives Carbamic acids	0.16

(Continued on following page)

TABLE 4 (Continued) Identification of the most discriminant metabolomic variables between pre- and post-dialysis with differences between dialysates.

Accurate mass (m/z)	Retention time (min)	Adduct ion	Formula	Identification of variables		Compound class	Fold change (Post-vs. pre-dialysis)
				Metabolite annotation	Confidence level		
539.9853	0.733			Unknown	4		2.87
206.0394	3.847			Unknown	4		0.22
218,0129	3.847			Unknown	4		0.25
202.0476	3.848			Unknown	4		0.14
Acetate dialysate							
314.2335	6.3387	M + H	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>	3-hydroxydecanoyl carnitine	3	Acyl carnitines	0.23
		M + H-H <sub>2</sub> O	C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>5</sub>	9-Decenoylcarnitine	3	Acyl carnitines	
204.1244	0.7264			Unknown	4		0.34
133.0520	3.7396			Unknown	4		0.44

Confidence level: 1: identified metabolites, 2: putatively annotated, 3: putatively characterized; 4: unknown

were affected by the dialysate used. Concretely, 31 metabolic variables were identified, grouped by class, and interpreted within a potentially clinical real-life context with the aim to deepen the beneficial mechanistic effects shown by citrate *versus* acetate in clinical or phenotypical terms. But its results can also be further studied to identify novel uremic toxins, alternatives to improve the urea kinetics model to approach dialysis dosing, and the role of CKD in the high cardiovascular mortality, infectious diseases, and impaired cognitive function, among others.

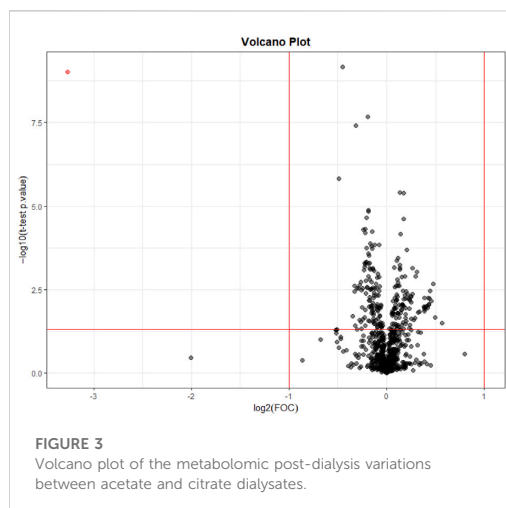
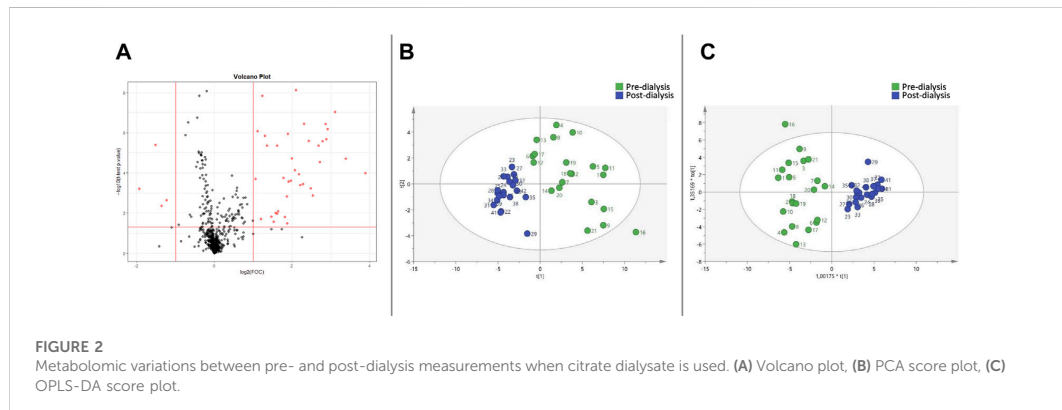
Notably, only one metabolic variable was found to be significantly different between dialysates at post-dialysis and rebound moments, being 8 to 10 times higher when CD was used as dialysate instead of AD. These metabolic variables were putatively characterized as branched-chain amino acids (BCAAs) (i.e., D-leucine, L-leucine, L-alloisoleucine, L-isoleucine); compounds that are proteinogenic amino acids and have different metabolic routes, with leucine being ketogenic and isoleucine being both a glucogenic and ketogenic amino acid. BCAAs also play a key role in stress states, energy, and muscle metabolism; in fact, isoleucine deficiency is characterized by muscle tremors (Wilkinson et al., 2013; Duan et al., 2016; Plotkin et al., 2021). But its accumulation in blood and other body fluids can exert neurotoxic effects (Yudkoff et al., 2005; Murin and Hamprecht, 2008).

Isoleucine is synthesized from pyruvate and  $\alpha$ -ketobutyrate, compounds concentrations that may be affected by the gain of

acetate and citrate during dialysis (Hernández-Jaras et al., 1994), and catabolized to  $\alpha$ -ketoglutarate which is oxidized and split into propionyl-CoA, which is converted into succinyl-CoA, a tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediate which can be converted into oxaloacetate for gluconeogenesis (hence glucogenic); and acetyl-CoA, which can be fed into the TCA cycle or used in the synthesis of ketone bodies or fatty acids (Adeva-Andany et al., 2017; Rajendram et al., 2018).

On its part, leucine particularly stimulates protein synthesis, increases the reutilization of amino acids in many organs, and reduces protein breakdown; this is promoted because leucine also induces insulin release (Stipanuk, 2007; Yang et al., 2010; Yang et al., 2012; Duan et al., 2016). However, like other BCAAs, this effect is associated with insulin resistance in the long term (Yang et al., 2010; Lynch and Adams, 2014; Bloomgarden, 2018). Furthermore, given its ketogenic properties, leucine is an important source of calories and could be considered an even more important energy source than glucose (Newsholme et al., 2011). Moreover, leucine is also a major component of the subunits in ferritin and other 'buffer' proteins (Khan, 2018), and it is required in stress states such as surgery, trauma, cirrhosis, infections, or fever (Holeček, 2018), not only as a great energy source but also given its potential capacity to attenuate inflammatory responses (Kato et al., 2016; Xia et al., 2017; An et al., 2020). CKD and hemodialysis could also be considered stress states, although leucine's role in these specific scenarios is yet to be studied.





The dialysis process affected the relative intensity of 17 metabolic variables, as significant reductions were identified when both dialysates were used. Among them, some uremic toxins were identified according to the European Uremic Toxin Working Group (Duranton et al., 2012). Phenols were putatively characterized, from which p-cresol, a metabolite of aromatic amino acid metabolism produced by intestinal microbiota (mainly enterobacteria), seems to be the more plausible isomer form. At concentrations encountered during uremia, p-cresol inhibits phagocyte function and decreases leukocyte adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells (Brunet et al., 2003). It also has been reported to have several toxic effects (e.g., diminishing the oxygen uptake of rat cerebral cortex slices; increasing the free active drug concentration of warfarin and diazepam; being related to

growth retardation in the weanling pig; altering cell membrane permeability, at least in bacteria; to induce LDH leakage from rat liver slices; inducing susceptibility to auditive epileptic crises; blocking cell K<sup>+</sup> channels; inhibiting the release of platelet-activating factor in rat peritoneal macrophages; and altering the hepatocyte growth and increase aspartate aminotransferase release (Vanholder et al., 1999)). Although measured as relative intensity reduction, the FC of 0.16 in our results would represent 84% removal which differs from the 30% previously described in high-flux hemodialysis (Vanholder et al., 1999).

Other detected metabolic variables that are also uremic toxins were (Duranton et al., 2012): N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide, which is a product of nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD) degradation that produces inhibition of PARP-1, which in turn leads to failure of DNA repair (Rutkowski et al., 2003; de Lorenzo et al., 2013), and has also been related to colorectal cancers and pellagra (Creeke et al., 2007; Brown et al., 2016); and N-(3-acetamidopropyl)pyrrolidin-2-one, whose levels are increased in non-Hodgkin's lymphoma (Hessels et al., 1991; van den Berg et al., 1986) and is a catabolic product of spermidine which has been identified as a biomarker of glomerular filtration rate decline. Moreover, creatinine and hydrogen phosphate were also significantly removed during dialysis.

Apart from these molecules, differences between measurements were found with one but not the other dialysate. AD affected plasma levels of three of the measured metabolites and CD, eleven. Two acylcarnitines, 3-Hydroxydecanoyl and 9-Decenoylcarnitine, were putatively characterized as a metabolic variable whose intensities significantly reduced after an AD dialysis. The general role of acylcarnitines is to transport acyl groups (organic acids and fatty acids) from the cytoplasm into the mitochondria so they can be broken down to produce energy. This process is known as beta-oxidation (Dambrowa et al., 2022). Regarding their relation to CKD, serum acylcarnitines increase in CKD and DD-CKD patients due to their impaired renal excretion (Fouque et al., 2006) and have been

TABLE 5 Identification of the most discriminant metabolomic variables between AD and CD in post-dialysis and rebound measurements.

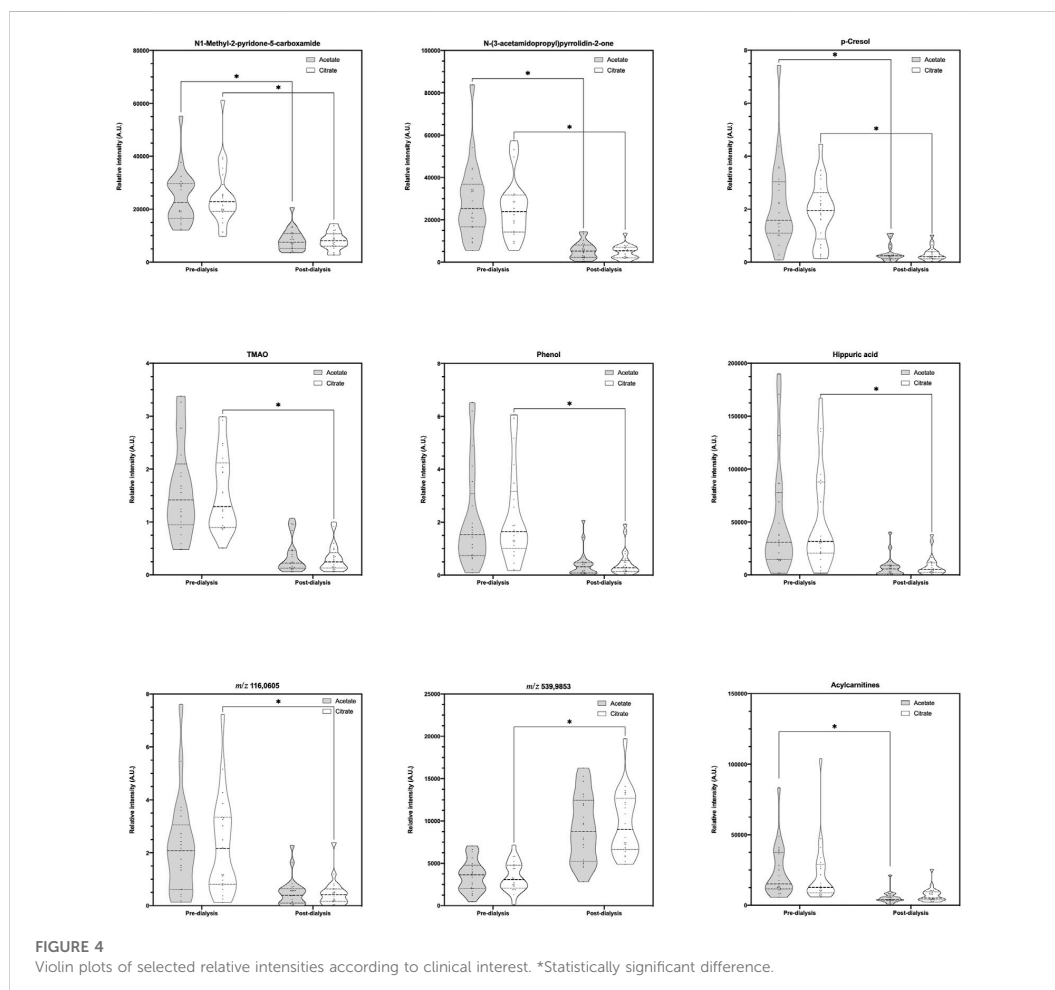
Accurate mass (m/z)	Retention time (min)	Adduct ion	Formula	Identification of variables		Compound class	Fold change (Citrate vs. Acetate)	
				Metabolite annotation	Confidence level			
114.0919	3.3666	M + H	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO	2,5-Dihydro-2,4,5-trimethyloxazole	1	Oxazolines	Post-dialysis: 9.27	
		M + H-H <sub>2</sub> O		C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	2-Acetylpyrrolidine	3		Pyrrolidines
					Epsilon-caprolactam			Caprolactams
M + H-H <sub>2</sub> O	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub>	1-Nitrohexane	1-Piperidinecarboxaldehyde	3	Piperidines			
			Aminocaproic acid 6-Deoxyfagomine N-(2-Hydroxyethyl)-morpholine N-(2-hydroxy-2-methylpropyl)acetamide 2-hydroxy-3-(propylamino)propanal N-(3-hydroxy-2-methylpropyl)acetamide, N-(2-Methylpropyl)glycolamide N,N-diethyl-2-oxoethanamine oxide, 2-[Ethyl(2-hydroxyethyl)amino]acetaldehyde2-(ethyl(1-hydroxyethyl)amino)acetaldehyde, 2-(diethylamino)-2-hydroxyacetaldehyde L-Isoleucine, L-Leucine, β-Leucine, D-Leucine, L-Norleucine, L-Alloisoleucine, 3-Aminocaproic acid, N-methylvaline, 4-(dimethylamino)Butanoic acid, N,N-Diethylglycine		Fatty acids and conjugates			
		M + H-H <sub>2</sub> O				Piperidines Morpholines Alcohols and polyols Pyrazoles Carboxylic acid derivatives Amines Amino acids, peptides, and analogues Organic nitro compounds		

Confidence level: 1: identified metabolites, 2: putatively annotated, 3: putatively characterized; 4: unknown

associated with IgA nephropathy and diabetic nephropathy as potential biomarkers (Xia et al., 2019; Mu et al., 2022). In fact, its elevation could indicate mitochondrial dysfunction and seems associated with cardiovascular mortality in incident dialysis (Kalim et al., 2013). Moreover, some of them are also pro-apoptotic (Ferrara et al., 2005). According to a recent review, both 3-Hydroxydecanoyl and 9-Decenoylcarnitine would be classified as medium-chain acylcarnitines, which are somewhat less abundant than short-chain acylcarnitines (Dambrova et al., 2022). They are formed either through esterification with L-carnitine or through the peroxisomal metabolism of longer chain acylcarnitines (Ferdinandusse et al., 1999; Violante et al., 2019), and have been related to inherited disorders of fatty acid metabolism (Dambrova et al., 2022). Particularly, 9-decenoylcarnitine is elevated in the plasma of overweighted subjects (Kang et al., 2018) and decreased in patients with

schizophrenia or familial Mediterranean fever (Kiykim et al., 2016; Cao et al., 2020). The study of acylcarnitines is an active area of research, and many novel roles in health and disease will likely be uncovered (Dambrova et al., 2022).

Among the eleven metabolic variables' intensities that significantly differ when using CD, three uremic toxins were identified (i.e., Trimethylamine N-oxide, Phenol, and Hippuric acid) (Duranton et al., 2012). Trimethylamine N-oxide (TMAO) is an oxidation product of trimethylamine derived from the conversion of dietary intake of lecithin or carnitine by the intestinal microbiota (Tang et al., 2013). It is used by the body as an osmolyte to counteract the effects of increased concentrations of urea (Lin and Timasheff, 1994). Increased TMAO levels are associated with an increase in cholesterol deposition (Koeth et al., 2013) and risk of incident major adverse cardiovascular events (Tang et al., 2013); thus, the



higher the clearance, the most beneficial the cardiovascular effect achieved (Mair et al., 2018).

Apart from these uremic toxins, when CD was used, a relative intensity significant decrease of two more metabolites (i.e., 2,3,4,5-Tetrahydro-2-pyridinecarboxylic acid and D-1-Piperidine-2-carboxylic acid) playing a key role in the lysine degradation (Chang and Charles, 1995; Matthews, 2020), which is an essential amino acid that is a necessary building block for proteins, plays a major role in calcium absorption, building muscle protein, recovering from stress conditions, and the production of hormones, enzymes, and antibodies (Singh et al., 2011).

Among the 31 metabolic variables, seven of them could not be annotated and remain unknown. One of them, specifically m/z 539.9853, results of great interest as it is the unique one that has a

FC > 1 (2.87), reflecting that its production during dialysis with CD surpasses its clearance in the dialysate.

Moreover, some metabolic variables annotated have not been further discussed since we wanted to focus on those with a potential clinical implication or prognosis in CKD, the dialysis treatment, or the effects of acetate or citrate. Those are compounds that act as dietary components (i.e., piperidines, 2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylloxazole, 2-Acetylpyrrolidine, Branched alkanes, 1-Amino-propan-2-ol, 1-Methyl-2-pyrrolicarboxaldehyde, 2-Acetylpyrrole, 4-Aminophenol, Hydroxybenzaldehydes, 3-(2-Furanyl)-2-propenal, Propionylcholine, Sesquiterpenoids, xi-1-(Propylthio)-1-propanethiol, Dialkyldisulfides, XanthotoxolHypoxanthines, Aminochrome o-semiquinone, 2-benzoxazolol, L-3-

Aminodihydro-2(3H)-furanone, 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene, 1-(Methylsulfanyl)-1-oxopropan-2-yl acetate, Bergapton, N-(Carboxyoxacetyl)-4-chloro-L-tryptophan, 7-Chloro-6-demethylcepharadione B, N(2)-phenylacetyl-L-glutamine); found in food of plants origin (i.e. 4-Methylenepoline), or food additives (i.e., Benzoic acid, Epsilon-caprolactam, 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitroethylene, Methyl n-formylanthranilate, 4-(1.1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenol, Etaspiene, 1,6-Hexanedithiol); some drug compounds or their metabolites (i.e., morpholines, aminocaproic acid, Pregabalin, methacholine, arabinofuranosylguanine, 3',4'-Dihydrodiol); and even other chemicals that represent environmental exposures or exposome (i.e., Benzyl alcohol, S-1-1'Bi-2-naphthol). Of particular interest among these groups are DL-2-Aminooctanoic acid, an amino acid that has been related to colorectal cancer (Brown et al., 2016); Neocapsiprene, which is a monoterpene, lipidic constituent of the cellular membrane, but also a food additive; and L-isoleucyl-L-proline, which is an incomplete breakdown product of protein digestion or protein catabolism and has been related to asthma (Mattarucchi et al., 2012). These three metabolites were reduced in the dialysis session with either dialysate. On its part, adrenochrome, an oxidation product of adrenaline acquired by ingestion, only seemed statistically significantly different when CD was used.

This study has some limitations. Firstly, the analysis was only made in the positive electrospray ionization mode, which may have led to the non-identification of some metabolites that could have been measured in the negative mode. Secondly, the metabolomic analysis of the effluent was not performed; hence, this study failed to discriminate whether reduced metabolite blood relative intensities were due to their dialysis clearance or consumption in a particular metabolic pathway. In that sense, comparing relative intensity means is less meaningful than differential tendencies between times for each dialysate. Thirdly, our data only determines trends or changes in response intensities but not exact concentrations. Fourthly, if we had identified every annotated metabolite, we would have been able to continue to a validation phase that is missing. And finally, the chosen times for sample extraction were helpful to verify that 60 min after the start of the session, the metabolism had reached saturation and that 30 min after the dialysis session, it still did not attain the baseline status, and therefore, the dialysis effects last longer on the metabolomic profile than the usual urea rebound; but fail to provide data of greater interest, so more measurements would have given more information on the kinetics of these metabolites.

In conclusion, this hypothesis-generating untargeted metabolomic study provides essential data on the metabolic profile of DD-CKD patients, the effect of the dialysis technique on the metabolome, and some potential pathways that differ when CD or AD are used. There are five pillars on which further research may bring light. Firstly, we identified different already known uremic toxins; some of them cleared better when CD was used. Secondly, the CD also has a role in the

lysine degradation pathway that was not found with AD. Thirdly, and on the contrary, AD showed an effect on acylcarnitines clearance not shown with CD. Fourthly, BCAAs increased intensities in CD post-dialysis measurement compared to AD ones. And lastly, the identification of a metabolic variable that we could not annotate was the only one whose intensity increased during the dialysis session and only when CD was used.

## Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: and <https://github.com/Broseta/Citrate-dialysate,Broseta/Citrate-dialysate>.

## Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Hospital ClÀ-nic of Barcelona Clinical Research Ethics Committee. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

JB, MR, and JH-J. conceived the study. RD, SB-G, AS, and PS-P, also contributed substantially to its conception. JB, LL, and AG-B acquired the data from the electronic health records and collected the blood samples. MR. performed the metabolomic analysis. JB. made the statistical analysis. JB, EC, and DR-E. made the figures and drafted and revised the paper. All authors have revised the drafts and approved the final one.

## Acknowledgments

We would like to publicly thank all participating patients and the nursing staff of the Dialysis and Investigation Units of the Department of Nephrology of Hospital Universitari i Politècnic La Fe for their selfless and enthusiastic collaboration in this study. Part of the equipment used in this work was co-funded by the Generalitat Valenciana and European Regional Development Fund (FEDER) funds (PO FEDER of Comunitat Valenciana 2014 - 2020)

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## References

- Adeva-Andany, M. M., López-Masade, L., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., and Sixto-Leal, C. (2017). Enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism in humans. *Amino Acids* 49 (6), 1005–1028. doi:10.1007/S00726-017-2412-7
- An, Y. H., Kim, J., Kim, H. J., and Lim, K. (2020). Effects of leucine-enriched essential amino acid supplementation on muscular fatigue and inflammatory cytokines in wheelchair basketball players. *Phys. Act. Nutr.* 24 (2), 38–46. doi:10.20463/PAN.2020.0013
- Basile, C., and Lomonte, C. (2015). A neglected issue in dialysis practice: Haemodialysate. *Clin. Kidney J.* 8 (4), 393–399. doi:10.1093/CKJ/SFV038
- Bloomgarden, Z. (2018). Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link? *J. Diabetes* 10 (5), 350–352. doi:10.1111/1753-0407.12645
- Bolanos, C. G., Pham, N. M., Mair, R. D., Meyer, T. W., and Sirich, T. L. (2021). Metabolomic analysis of uremic pruritus in patients on hemodialysis. *PLoS One* 16 (2), e0246765. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0246765
- Broseta, J. J., López-Romero, L. C., Cerveró, A., Devesa-Such, R., Soldevila, A., Bea-Granell, S., et al. (2021). Improvements in inflammation and calcium balance of citrate versus acetate as dialysate buffer in maintenance hemodialysis: A unicentric, cross-over, prospective study. *Blood Purif.* 50 (6), 914–920. doi:10.1159/000513419
- Brown, D. G., Rao, S., Weir, T. L., O'Malia, J., Bazan, M., Brown, R. J., et al. (2016). Metabolomics and metabolic pathway networks from human colorectal cancers, adjacent mucosa, and stool. *Cancer Metab.* 4 (1), 11. doi:10.1186/s40170-016-0151-Y
- Brunet, P., Dou, L., Cerini, C., and Berland, Y. (2003). Protein-bound uremic retention solutes. *Adv. Ren. Replac. Ther.* 10 (4), 310–320. doi:10.1053/J.ARRT.2003.08.002
- Bryland, A., Wieslander, A., Carlsson, O., Hellmark, T., and Godaly, G. (2012). Citrate treatment reduces endothelial death and inflammation under hyperglycaemic conditions. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 9 (1), 42–51. doi:10.1177/1479164111424297
- Cao, B., Wang, D., Pan, Z., McIntyre, R. S., Brietzke, E., Subramanipillai, M., et al. (2020). Metabolic profiling for water-soluble metabolites in patients with schizophrenia and healthy controls in a Chinese population: A case-control study. *World J. Biol. Psychiatry* 21 (5), 357–367. doi:10.1080/15622975.2019.1615639
- Chang, Yung-Feng, and Charles, A. K. (1995). Uptake and metabolism of delta 1-piperidine-2-carboxylic acid by synaptosomes from rat cerebral cortex. *Biochim. Biophys. Acta* 1238 (1), 29–33. doi:10.1016/0005-2736(95)00092-H
- Creeke, P. I., Dibari, F., Cheung, E., van den Briel, T., Kyroussis, E., and Seal, A. J. (2007). Whole blood NAD and NADP concentrations are not depressed in subjects with clinical pellagra. *J. Nutr.* 137 (9), 2013–2017. doi:10.1093/JN/137.9.2013
- Daimon, S., Dan, K., and Kawano, M. (2011). Comparison of acetate-free citrate hemodialysis and bicarbonate hemodialysis regarding the effect of intra-dialysis hypotension and post-dialysis malaise. *Ther. Apher. Dial.* 15 (5), 460–465. doi:10.1111/j.1744-9987.2011.00976.x
- Dambrova, M., Makrečka-Kuka, M., Kuka, J., Vilskersts, R., Nordberg, D., Attwood, M. M., et al. (2022). Acylcarnitines: Nomenclature, biomarkers, therapeutic potential, drug targets, and clinical trials. *Pharmacol. Rev.* 74 (3), 506–551. doi:10.1124/PHARMREV.121.000408
- de Lorenzo, S. B., Patel, A. G., Hurley, R. M., and Kaufmann, S. H. (2013). The elephant and the blind men: Making sense of PARP inhibitors in homologous recombination deficient tumor cells. *Front. Oncol.* 3, 228. doi:10.3389/FONC.2013.00228
- de Sequera, P., Ramón, M. A., Pérez-García, R., Prats, E. C., Cobo, P. A., Arroyo, R. A., et al. (2015). Acute effect of citrate bath on postdialysis alkalaemia. *Nefrología* 35 (2), 164–171. doi:10.1016/j.nefro.2014.10.001
- Dellepiane, S., Medica, D., Guarena, C., Musso, T., Quercia, A. D., Leonardi, G., et al. (2019). Citrate anion improves chronic dialysis efficacy, reduces systemic inflammation and prevents Chemerin-mediated microvascular injury. *Sci. Rep.* 9, 10622. Published online. doi:10.1038/s41598-019-47040-8
- Duan, Y., Li, F., Li, Y., Tang, Y., Kong, X., Feng, Z., et al. (2016). The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. *Amino Acids* 48 (1), 41–51. doi:10.1007/S00726-015-2067-1
- Duranton, F., Cohen, G., de Smet, R., Rodriguez, M., Jankowski, J., Vanholder, R., et al. (2012). Normal and pathological concentrations of uremic toxins. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23 (7), 1258–1270. doi:10.1681/ASN.2011121175
- Duranton, F., Lundin, U., Gayraud, N., Mischak, H., Aparicio, M., Mourad, G., et al. (2014). Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 9 (1), 37–45. doi:10.2215/CJN.06000613
- Ferdinandusse, S., Mulders, J., Ijst, L., Deni, S., Dacremont, G., Waterham, H. R., et al. (1999). Molecular cloning and expression of human carnitine octanoyltransferase: Evidence for its role in the peroxisomal beta-oxidation of branched-chain fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263 (1), 213–218. doi:10.1006/BBRC.1999.1340
- Ferrara, F., Bertelli, A., and Falchi, M. (2005). Evaluation of carnitine, acetylcarnitine and isovalerylcarnitine on immune function and apoptosis. *Drugs Exp. Clin. Res.* 31 (3), 109–114. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16033249/> (Accessed July 28, 2022).
- Fouque, D., Holt, S., Guebre-Egziabher, F., Nakamura, K., Vianey-Saban, C., Hadj-Aïssa, A., et al. (2006). Relationship between serum carnitine, acylcarnitines, and renal function in patients with chronic renal disease. *J. Ren. Nutr.* 16 (2), 125–131. doi:10.1053/J.JRN.2006.01.004
- Gabutti, L., Lucchini, B., Marone, C., Alberio, L., and Burnier, M. (2009). Citrate- vs. acetate-based dialysate in bicarbonate haemodialysis: Consequences on haemodynamics, coagulation, acid-base status, and electrolytes. *BMC Nephrol.* 10, 7. doi:10.1186/1471-2369-10-7
- Grundström, G., Christensson, A., Alquist, M., Nilsson, L. G., and Segelmark, M. (2013). Replacement of acetate with citrate in dialysis fluid: A randomized clinical trial of short term safety and fluid biocompatibility. *BMC Nephrol.* 14, 216. Published online. doi:10.1186/1471-2369-14-216
- Hallan, S., Afkarian, M., Zelnick, L. R., Kestenbaum, B., Sharma, S., Saito, R., et al. (2017). Metabolomics and gene expression analysis reveal down-regulation of the citric acid (TCA) cycle in non-diabetic CKD patients. *EBioMedicine* 26, 68–77. doi:10.1016/J.EBIO.2017.10.027
- Hernández-Jaras, J., Estrada, A., García-Cantón, C., and Traver, J. (1994). Equilibrio ácido-base y aniones orgánicos: Diferencias en biofiltración con acetato (bf) y hemodilisis con bicarbonato. *Nefrología* 14 (5), 591–597. <https://www.revistanefrologia.com/es-equilibrio-acido-base-aniones-organicos-diferencias-articulo-X021169959400672>.
- Hessels, J., Kingma, A. W., Sturkenboom, M. C. J. M., Elzinga, H., van den Berg, G. A., and Muskiet, F. A. J. (1991). Gas chromatographic determination of N-acetylputrescine-gamma-lactam, a unique catabolite of N1-acetylspermidine. *J. Chromatogr.* 563 (1), 1–9. doi:10.1016/0378-4347(91)80272-E
- Hoher, B., and Adamski, J. (2017). Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 13 (5), 269–284. doi:10.1038/NRNEPH.2017.30
- Holeček, M. (2018). Branched-chain amino acids in health and disease: Metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr. Metab.* 15 (1), 33–12. doi:10.1186/s12986-018-0271-1
- Hu, J., Grams, M., Coresh, J., Hwang, S., Kovesdy, C. P., Guallar, E., et al. (2019). Serum metabolites and cardiac death in patients on hemodialysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (5), 747–749. doi:10.2215/CJN.12691018
- Kalantari, S., and Nafar, M. (2019). An update of urine and blood metabolomics in chronic kidney disease. *Biomark. Med.* 13 (7), 577–597. doi:10.2217/BMM-2019-0008
- Kalim, S., Clish, C. B., Wenger, J., Elmariah, S., Yeh, R. W., Deferio, J. J., et al. (2013). A plasma long-chain acylcarnitine predicts cardiovascular mortality in incident dialysis patients. *J. Am. Heart Assoc.* 2 (6), e000542. doi:10.1161/JAHA.113.000542
- Kang, M., Yoo, H. J., Kim, M., Kim, M., and Lee, J. H. (2018). Metabolomics identifies increases in the acylcarnitine profiles in the plasma of overweight subjects in response to mild weight loss: A randomized, controlled design study. *Lipids Health Dis.* 17 (1), 237. doi:10.1186/S12944-018-0887-1
- Kato, H., Miura, K., Nakano, S., Suzuki, K., Bannai, M., and Inoue, Y. (2016). Leucine-enriched essential amino acids attenuate inflammation in rat muscle and enhance muscle repair after eccentric contraction. *Amino Acids* 48 (9), 2145–2155. doi:10.1007/S00726-016-2240-1
- Khan, F. A. (2018). *Biotechnology fundamentals*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. doi:10.1201/9781315370767

- Kiykim, E., Aktuğlu Zeybek, A. Ç., Barut, K., Zubarioglu, T., Cansever, M. S., Alsancaç, S., et al. (2016). Screening of free carnitine and acylcarnitine status in children with familial mediterranean fever. *Arch. Rheumatol.* 31 (2), 133–138. doi:10.5606/ARCHRHEUMATOL.2016.6596
- Koeth, R. A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J. A., Org, E., Sheehy, B. T., et al. (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat. Med.* 19 (5), 576–585. doi:10.1038/NM.3145
- Kossmann, R. J., Gonzales, A., Callan, R., and Ahmad, S. (2009). Increased efficiency of hemodialysis with citrate dialysate: A prospective controlled study. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 4 (9), 1459–1464. doi:10.2215/CJN.02590409
- Kuragano, T., Kida, A., Furuta, M., Yahiro, M., Kitamura, R., Otaki, Y., et al. (2012). Effects of acetate-free citrate-containing dialysate on metabolic acidosis, anemia, and malnutrition in hemodialysis patients. *Artif. Organs* 36 (3), 282–290. doi:10.1111/j.1525-1594.2011.01349.x
- Kurella Tamura, M., Chertow, G., Depner, T., Nissenson, A. R., Schiller, B., Mehta, R. L., et al. (2016). Metabolic profiling of impaired cognitive function in patients receiving dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (12), 3780–3787. doi:10.1681/ASN.2016100109
- Lin, T. Y., and Timasheff, S. N. (1994). Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein. *Biochemistry* 33 (42), 12695–12701. doi:10.1021/B100208A021
- Lorenz, G., Mayer, C. C., Bachmann, G., Strycek, S., Braunisch, M. C., Haller, B., et al. (2018). Acetate-free, citrate-acidified bicarbonate dialysis improves serum calcification propensity—a preliminary study. *Nephrol. Dial. Transpl.* 30, 2043–2051. doi:10.1093/ndt/gyf134
- Lynch, C. J., and Adams, S. H. (2014). Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10 (12), 723–736. doi:10.1038/NREND0.2014.171
- Mair, R. D., Sirich, T. L., and Meyer, T. W. (2018). Uremic toxin clearance and cardiovascular toxicities. *Toxins* 10 (6), E226. doi:10.3390/TOXINS10060226
- Mattarucchi, E., Baraldi, E., and Guillou, C. (2012). Metabolomics applied to urine samples in childhood asthma; differentiation between asthma phenotypes and identification of relevant metabolites. *Biomed. Chromatogr.* 26 (1), 89–94. doi:10.1002/BMC.1631
- Matthews, D. E. (2020). Review of lysine metabolism with a focus on humans. *J. Nutr.* 150 (1), 2548S–2555S. doi:10.1093/JN/NXAA224
- Mu, X., Yang, M., Ling, P., Wu, A., Zhou, H., and Acylcarnitines, Jiang J. (2022). Can they be Biomarkers of diabetic nephropathy? *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 15, 247–256. doi:10.2147/DMSO.S350233
- Murin, R., and Hamprecht, B. (2008). Metabolic and regulatory roles of leucine in neural cells. *Neurochem. Res.* 33 (2), 279–284. doi:10.1007/S11064-007-9444-4
- Newsholme, P., Stenson, L., Sulvucci, M., Sumayao, R., and Krause, M. Amino acid metabolism. In: *Compr. Biotechnol.*, Second Edition. Vol 1. 2nd ed. Academic Press; 2011:3–14. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00002-7
- Oto, J., Fernández-Pardo, Á., Roca, M., Plana, E., Solmoirago, M. J., Sanchez-Gonzalez, J. V., et al. (2020). Urine metabolomic analysis in clear cell and papillary renal cell carcinoma: A pilot study. *J. Proteomics* 218, 103723. doi:10.1016/J.JPROT.2020.103723
- Pérez-García, R., Ramírez Chamond, R., de Sequera Ortiz, P., Albalade, M., Puerta Carretero, M., Ortega, M., et al. (2017). Citrate dialysate does not induce oxidative stress or inflammation *in vitro* as compared to acetate dialysate. *Nefrologia* 37, 630–637. doi:10.1016/j.nefro.2017.03.024
- Petitclerc, T., Diab, R., le Roy, F., Mercadal, L., and Hmida, J. (2011). Hémodialyse sans acetate : qu'est-ce vraiment. *Nephrol. Ther.* 7 (2), 92–98. doi:10.1016/j.nephro.2010.10.008
- Plotkin, D. L., Delcastillo, K., van Every, D. W., Tipton, K. D., Aragon, A. A., and Schoenfeld, B. J. (2021). Isolated leucine and branched-chain amino acid supplementation for enhancing muscular strength and hypertrophy: A narrative review. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 31 (3), 292–301. doi:10.1123/IJSNEM.2020-0356
- Rajendram, R., Preedy, V. R., and Patel, V. B. *Branched chain amino acids in clinical nutrition*, 2018, 1, 287. doi:10.3390/ijms19040954
- Roca, M., Alcoriza, M. I., Garcia-Cañaveras, J. C., and Lahoz, A. (2021). Reviewing the metabolome coverage provided by LC-MS: Focus on sample preparation and chromatography-A tutorial. *Anal. Chim. Acta* 1147, 38–55. doi:10.1016/j.ACA.2020.12.025
- Rocha, A. D., Padua, V. C., Oliveira, E., Guimaraes, M. M., Lugon, J. R., and Strogoff de Matos, J. P. (2014). Effects of citrate-enriched bicarbonate based dialysate on anticoagulation and dialyzer reuse in maintenance hemodialysis patients. *Hemodial. Int.* 18, 467–472. doi:10.1111/hdi.12113
- Rutkowski, B., Slominska, E., Szolkiewicz, M., Smolenski, R. T., Striley, C., Rutkowski, P., et al. (2003). N-methyl-2-pyrindone-5-carboxamide: A novel uremic toxin? *Kidney Int.* 63 (84), S19–S21. doi:10.1046/j.1523-1755.63.S84.36.X
- Sato, E., Kohno, M., Yamamoto, M., Fujisawa, T., Fujiwara, K., and Tanaka, N. (2011). Metabolomic analysis of human plasma from haemodialysis patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 41 (3), 241–255. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02398.X
- Sequera, P., Pérez García, R., Molina Nuñez, M., Muñoz Gonzalez, R., Álvarez Fernández, G., Mérida, E., et al. (2019). Prospective randomized multicenter study to demonstrate the benefits of haemodialysis without acetate (with citrate): ABC-treat study. *Nephrol. Publ. online, Acute effect of citrate.* 39(4), 424–433. doi:10.1016/j.nefree.2019.02.006
- Sharma, K., Karl, B., Mathew, A. v., Gangoiti, J. A., Wassel, C. L., Saito, R., et al. (2013). Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24 (11), 1901–1912. doi:10.1681/ASN.2013020126
- Singh, M., Muralidhara Rao, D., Pande, S., Battu, S., Rajeswar Dutt, K., and Ramesh, M. (2011). Medicinal uses of L-lysine: Past and future. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2 (4), 637–642. <http://scopeindex.org/handle/sci/223> (Accessed July 28, 2022).
- Stipanuk, M. H. (2007). Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. *Nutr. Rev.* 65 (3), 122–129. doi:10.1111/j.1753-4887.2007.TB00289.X
- Sumner, L. W., Alexander, A. E., Ae, A., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., et al. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis chemical analysis working group (CAWG) metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics* 3 (3), 211–221. doi:10.1007/S11306-007-0082-2
- Tang, W. H. W., Wang, Z., Levison, B. S., Koeth, R. A., Britt, E. B., Fu, X., et al. (2013). Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 368 (17), 1575–1584. doi:10.1056/NEJM0A1109400
- Trakarnvanich, T., Thirathanakul, S., Sriphuang, N., Thumrongthongjaroon, P., Kurathong, S., Ngamvichchukorn, T., et al. (2019). The effect of citrate on clot formation, dialyzer reuse, and anemia in hemodialysis patients. *Blood Purif.* 47, 361–368. Published online. doi:10.1159/000490525
- van den Berg, G. A., Kingma, A. W., Elzinga, H., and Muskiet, F. A. J. (1986). Determination of N-(3-acetamidopropyl)pyrrolidin-2-one, a metabolite of spermidine, in urine by isotope dilution mass fragmentography. *J. Chromatogr.* 383 (2), 251–258. doi:10.1016/S0378-4347(00)83471-4
- Vanholder, R., de Smet, R., and Lesaffre, G. (1999). p-cresol: a toxin revealing many neglected but relevant aspects of uremic toxicity. *Nephrol. Dial. Transpl.* 14 (12), 2813–2815. doi:10.1093/NDT/14.12.2813
- Villa-Bellosta, R., Hernández-Martínez, E., Mérida-Herrero, E., and González-Parra, E. (2019). Impact of acetate- or citrate-acidified bicarbonate dialysate on *ex vivo* aorta wall calcification. *Sci. Rep.* 9, 11374. Published online. doi:10.1038/s41598-019-47934-7
- Violante, S., Achetib, N., van Roermund, C. W. T., Hagen, J., Dodatko, T., Vaz, F. M., et al. (2019). Peroxisomes can oxidize medium- and long-chain fatty acids through a pathway involving ABCD3 and HSD17B4. *FASEB J.* 33 (3), 4355–4364. doi:10.1096/faj.201801498R
- Wilkinson, D. J., Hossain, T., Hill, D. S., Phillips, B. E., Crossland, H., Williams, J., et al. (2013). Effects of leucine and its metabolite β-hydroxy-β-methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. *J. Physiol.* 591 (11), 2911–2923. doi:10.1113/PPHYSIOL.2013.253203
- Xia, F. Y., Zhu, L., Xu, C., Wu, Q. Q., Chen, W. J., Zeng, R., et al. (2019). Plasma acylcarnitines could predict prognosis and evaluate treatment of IgA nephropathy. *Nutr. Metab.* 16 (1), 2. doi:10.1186/S12986-018-0328-1
- Xia, Z., Cholewa, J., Zhao, Y., Yang, Y., Shang, H., Jiang, H., et al. (2017). A potential strategy for counteracting age-related sarcopenia: Preliminary evidence of combined exercise training and leucine supplementation. *Food Funct.* 8 (1UN), 4528–4538. doi:10.1039/c7fo01181d
- Yang, J., Chi, Y., Burkhardt, B. R., Guan, Y., and Wolf, B. A. (2010). Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr. Rev.* 68 (5), 270–279. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00282.X
- Yang, J., Dolinger, M., Ritaccio, G., Mazurkiewicz, J., Conti, D., Zhu, X., et al. (2012). Leucine stimulates insulin secretion via down-regulation of surface expression of adrenergic α2A receptor through the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway: Implication in new-onset diabetes in renal transplantation. *J. Biol. Chem.* 287 (29), 24795–24806. doi:10.1074/JBC.M112.344259
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Horyn, O., Lubovyy, B., Lubovyy, B., et al. (2005). Brain amino acid requirements and toxicity: The example of leucine. *J. Nutr.* 135 (6), 1531S–8S. doi:10.1093/NJ/135.6.1531S
- Zhu, S., Zhang, F., Shen, A., Sun, B., Xia, T. Y., Chen, W. S., et al. (2021). Metabolomics evaluation of patients with stage 5 chronic kidney disease before dialysis, maintenance hemodialysis, and peritoneal dialysis. *Front. Physiol.* 11, 630646. doi:10.3389/FPHYS.2020.630646



