

Original breve

Perfil metabólico diferenciador asociado a la condición de normoalbuminuria en la población hipertensa

Aranzazu Santiago-Hernandez^a, Paula J. Martínez^a, Marta Martín-Lorenzo^a, Gema Ruiz-Hurtado^{b,c}, María G Barderas^c, Julian Segura^d, Luis M. Ruilope^{b,d,e} y Gloria Álvarez-Llamas^{a,f,*}

^a Laboratorio de Inmunología y Proteómica, Departamento de Inmunología, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

^b Laboratorio Traslacional Cardiorrenal, Instituto de Investigación I+12 Hospital Universitario 12 de Octubre/CIBER-CV, Madrid

^c Departamento de Fisiopatología Vasculard, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo, España

^d Servicio de Nefrología, Unidad de Hipertensión, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

^e Escuela de Estudios de Doctorado e Investigación, Universidad Europea de Madrid, Madrid, España

^f REDINREN

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 21 de junio de 2019

Aceptado el 24 de octubre de 2019

On-line el 3 de marzo de 2020

Palabras clave:

Albuminuria
Riesgo cardiovascular
Hipertensión
Sistema renina-angiotensina
Metabólica
Biomarcadores
Metabolitos

R E S U M E N

Antecedentes y objetivo: La albuminuria es un indicador de daño orgánico subclínico y un marcador de riesgo cardiovascular y de enfermedad renal. Un porcentaje de pacientes hipertensos desarrollan albuminuria a pesar de estar bajo supresión crónica del sistema renina-angiotensina (SRA). Previamente identificamos metabolitos en orina asociados al desarrollo de albuminuria. En este estudio, investigamos alteraciones metabólicas que reflejen distintos niveles dentro de la condición de normoalbuminuria.

Pacientes, materiales y métodos: Se analizó la orina de 48 pacientes hipertensos con supresión crónica del SRA. Se clasificaron según el cociente albúmina/creatinina (ACR) en 3 grupos: normoalbuminuria (<10 mg/g); normal-alta (10-30 mg/g en varones, o 20-40 mg/g en mujeres) y albuminuria moderadamente elevada (microalbuminuria: 30-200 mg/g o 40-300 mg/g, respectivamente). El metaboloma se analizó mediante espectrometría de masas y se realizó un análisis de correlaciones entre los niveles de los metabolitos alterados y ACR.

Resultados: Oxalacetato, 3-ureidopropionato, guanidoacetato y malato muestran una variación significativa entre los grupos normo y micro. Además, estos metabolitos son capaces de diferenciar entre los pacientes normo y normal-alta. Igualmente se observó correlación significativa entre el nivel de los metabolitos identificados con el nivel de ACR. Las variaciones observadas señalan una alteración del metabolismo energético ya en pacientes con albuminuria en el rango normal-alta.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: galvarez@fjd.es (G. Álvarez-Llamas).

<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2019.10.007>

0211-6995/© 2020 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Conclusiones: Se confirma la asociación del panel molecular constituido por 3-ureidopropionato, oxalacetato, malato y guanidoacetato con distintos niveles de albuminuria. Así mismo, se ha identificado una huella metabólica capaz de mostrar variación dentro de la condición de normoalbuminuria, lo que permite una estratificación molecular más temprana de los pacientes.

© 2020 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Differential metabolic profile associated with the condition of normoalbuminuria in the hypertensive population

A B S T R A C T

Keywords:

Albuminuria
Cardiovascular risk
Hypertension
Renin-angiotensin system
Metabolomics
Biomarkers
Metabolites

Background and aim: Albuminuria is an indicator of sub-clinical organ damage and a marker of cardiovascular risk and renal disease. A percentage of hypertensive patients develop albuminuria despite being under chronic suppression of the renin-angiotensin system (RAS). We previously identified urinary metabolites associated with the development of albuminuria. In this study, we searched for metabolic alterations which reflect different levels within the condition of normoalbuminuria.

Patients, materials and methods: Urine from 48 hypertensive patients under chronic RAS suppression was analysed. They were classified according to the albumin/creatinine ratio (ACR) into 3 groups: Normoalbuminuria (<10 mg/g); high-normal (10-30 mg/g in men, or 20-40 mg/g in women); and moderately high albuminuria (microalbuminuria, 30-200 mg/g or 40-300 mg/g, respectively). The metabolome was analysed by mass spectrometry and a correlation analysis was performed between altered metabolite levels and ACR.

Results: Oxaloacetate, 3-ureidopropionate, guanidoacetate and malate show significant variation between the normo and micro groups. Additionally, these metabolites are able to differentiate between patients in the normo and high-normal range. A significant correlation between metabolites and ACR was found. Observed variations point to alterations in the energy metabolism already in patients with albuminuria in the high-normal range.

Conclusions: The association between the molecular panel consisting of 3-ureidopropionate, oxaloacetate, malate and guanidoacetate and different levels of albuminuria is confirmed. A metabolic fingerprint was also identified showing variations within the condition of normoalbuminuria allowing an earlier molecular stratification of patients.

© 2020 Sociedad Española de Nefrología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La hipertensión es una de las enfermedades con mayor prevalencia en todo el mundo¹. En torno a un 30-40% de la población adulta mundial es hipertensa. Uno de los tratamientos de primera línea para su control es la inhibición crónica del sistema renina angiotensina (SRA) mediante monoterapia o en terapia combinada con otros antihipertensivos, con demostrada eficacia en la reducción de la presión arterial. Sin embargo, un destacable porcentaje de pacientes hipertensos controlados desarrollan albuminuria (16,1% en seguimiento a 3 años)². La albuminuria es la expresión clínica de un proceso fisiopatológico multifactorial y complejo que lleva asociado un incremento del riesgo cardiovascular^{3,4}. Si bien solo la presencia de albuminuria puede no ser predictiva de progresión de enfermedad renal crónica⁵, sí existen evidencias de una asociación entre cambios en los niveles de albuminuria y el desarrollo o agravamiento de la enfermedad renal⁶⁻⁸.

La albuminuria es un indicador de daño orgánico subclínico. Su desarrollo tiene lugar de forma continuada y como tal deben considerarse sus consecuencias sobre el riesgo cardiovascular y el daño renal⁹. Estudios previos muestran como la asociación entre el desarrollo de albuminuria y la existencia de eventos cardiovasculares empieza a niveles de ACR dentro del rango de normoalbuminuria tan bajos como 4,4 mg/g¹⁰; 6,6 mg/g¹¹ o, en cualquier caso, <10 mg/g¹². Particularmente, el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular en diabéticos aumenta en un factor de 10 si la albuminuria aumenta de 10 a 30 mg/d¹³ y, en la población general, un aumento en 5-10 mg/L se asocia a un 29% más de riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular¹⁴. De la misma forma, predice el desarrollo de hipertensión en el rango normal-alto (<30 mg/g)¹⁵ y de la enfermedad renal crónica en no diabéticos^{7,8}.

La mayor dificultad en estrategias de prevención es que no es posible anticiparse a conocer qué sujetos desarrollarán albuminuria. Una de las principales razones es que los mecanismos moleculares que subyacen no se conocen en su

totalidad. El valor de la orina en el estudio de la enfermedad cardiovascular ha sido ampliamente demostrado¹⁶⁻¹⁹. En concreto, en estudios previos identificamos marcadores moleculares en orina asociados a la condición de albuminuria que apuntan a alteraciones en la respuesta inmunitaria, sistema de coagulación, respuesta inflamatoria, remodelado vascular y estrés oxidativo como los principales procesos biológicos implicados²⁰⁻²². En este trabajo exploramos la existencia de un perfil metabólico diferencial en sujetos clasificados según su nivel de ACR en: a) <10 mg/g (normo); b) 10-30 mg/g en varones o 20-40 mg/g en mujeres (normal-alta); c) 30-200 mg/g o 40-300 mg/g, respectivamente (micro). De este modo se diferencia entre individuos que no se espera que desarrollen albuminuria (normo) y aquellos que sí son susceptibles de desarrollarla (normal-alta). Analizamos la huella metabólica previamente identificada para investigar si existe variación metabólica asociada a una condición de albuminuria temprana o incipiente con la finalidad de estratificar el riesgo cardiorrenal a nivel molecular y así adaptar mejor la estrategia terapéutica en estos pacientes.

Material y métodos

Selección de pacientes

En la Unidad de Hipertensión del Hospital 12 de Octubre de Madrid se seleccionó a un total de 48 pacientes hipertensos controlados bajo supresión crónica del SRA durante un mínimo de 2 años. Aquellos pacientes con hipertensión arterial secundaria fueron excluidos del estudio. Se incluyó a pacientes con diabetes mellitus y sin ella de entre 45 y 70 años. El estudio se realizó según las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital 12 de Octubre, previo consentimiento informado de los pacientes.

Los sujetos se clasificaron según el valor de ACR en 3 grupos: normo (N), los individuos con ACR < 10 mg/g, de los que, según el estudio ROADMAP, se sabe que no desarrollarán albuminuria²³; normal-alta (NA), los individuos con ACR = 10-30 mg/g (varones) o 20-40 mg/g (mujeres) y microalbuminuria (M), los individuos con ACR = 30-200 mg/g o 40-300 mg/g, respectivamente. Las guías clínicas emplean como criterio de clasificación general un punto de corte de ACR = 30 mg/g entre albuminuria y albuminuria moderadamente elevada²⁴. En el caso de las mujeres, el punto de corte se ha aumentado ligeramente a 40 mg/g²⁵, considerando que la liberación de creatinina en orina se ve influida por la masa muscular. La [tabla 1](#) recoge las características clínicas de los sujetos incluidos en el estudio.

Análisis metabólico de la orina mediante espectrometría de masas dirigida

Se recogió la primera orina de la mañana, se centrifugó para eliminar restos celulares y se almacenó a -80°C hasta su análisis. El análisis cuantitativo de los metabolitos se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas dirigida en modo *selected reaction monitoring* (SRM-LC-MS/MS). Esta metodología fue seleccionada como método del

año por la revista *Nature Methods* 2012²⁶. Con base en estudios previos de nuestro laboratorio, se extrajeron los metabolitos de la orina tras la eliminación de la fracción proteica por precipitación orgánica^{27,28}. El sobrenadante se filtró y se analizó en un espectrómetro de masas Triple Cuadrupolo QQQ6460 (Agilent Technologies) acoplado a un sistema binario de cromatografía líquida (1200 series, Agilent Technologies) controlado por el programa Mass Hunter (v4.0 Agilent Technologies).

Análisis estadístico

La señal correspondiente a cada metabolito se integró mediante el programa Mass Hunter Acquisition Data Qualitative Analysis B.04.00 (Agilent Technologies) y se obtuvo el área de pico. Se realizó un análisis estadístico no paramétrico Mann-Whitney, con un 95% de nivel de confianza y previa detección de outliers mediante el método ROUT (valor $Q = 5\%$). Para el análisis de correlaciones se empleó un test no paramétrico de correlación de Spearman, todo ello mediante el programa GraphPad Prism (versión 6.01).

Resultados y discusión

Oxalacetato, guanidoacetato y 3-ureidopropionato muestran niveles inferiores en el grupo de individuos con microalbuminuria (M) respecto a aquellos en la condición de normoalbuminuria (N). El malato, en cambio, muestra niveles superiores en M respecto a N ([fig. 1](#)). Estos datos confirman observaciones previas en pacientes con albuminuria, bien desarrollada durante los 3 años de seguimiento previos a la toma de muestra (albuminuria *de novo*) o ya presente con anterioridad (albuminuria mantenida)²². Cabe destacar que estos 4 metabolitos son capaces de diferenciar entre los pacientes N y aquellos en el rango de albuminuria NA y, por lo tanto, permiten una estratificación molecular más temprana de los pacientes.

Paralelamente se realizó un estudio de la correlación entre los niveles de los metabolitos en orina y los valores de ACR para cada paciente, en el que resultó en todos los casos una correlación estadísticamente significativa ([fig. 2](#)).

Se ha descrito un aumento del estrés oxidativo asociado al desarrollo de albuminuria²⁹. El estrés oxidativo es causado por una desregulación en la producción y metabolismo de las especies reactivas de oxígeno, en cuya regulación intracelular participa el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Las alteraciones observadas en los niveles de oxalacetato y malato en pacientes con albuminuria en el rango normal-alta y microalbuminuria señalan nuevamente al metabolismo energético como una pieza clave en el manejo de los pacientes hipertensos³⁰. El guanidoacetato es un intermediario en el metabolismo de la arginina y prolina y precursor de la creatina, un sustrato de la creatinquinasa. Esta enzima se ha relacionado con un fracaso del tratamiento antihipertensivo, sin conocerse en detalle los mecanismos que lo provocan³¹. Por otro lado, se ha propuesto el guanidoacetato como marcador de lesión renal: muestra un nivel reducido en la orina de pacientes trasplantados con función renal normal³². Las alteraciones de estos metabolitos señalan, por tanto, una desregulación temprana de

Tabla 1 – Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio

	Normo (n = 22)	Normal-alta (n = 17)	Microalbuminuria (n = 9)
Edad (años)	57 ± 9	64 ± 5	65 ± 3
Sexo (% masculino)	59	76	66
Colesterol (mg/dl)	179 ± 38	166 ± 29	154 ± 29
Triglicéridos (mg/dl)	110 ± 33	125 ± 59	122 ± 32
Colesterol HDL (mg/dl)	54 ± 16	53 ± 16	50 ± 7
Colesterol LDL (mg/dl)	102 ± 31	88 ± 30	91 ± 26
Ácido úrico(mg/dl)	5 ± 1	6 ± 2	7 ± 2
eGFR (ml/min/1,73 m ²)	86 ± 16	85 ± 20	93 ± 22
ACR (mg/g)	4 (3-6)	22 (18-31)	85 (44-99)
Diabetes mellitus tipo II (%)	18	24	67
PAS (mmHg)	140 ± 14	144±14	141 ± 19
PAD (mmHg)	85±8	83±8	79 ± 5
Tratamiento antihipertensivo (%)			
IECA	18	18	67
ARA	41	65	33
Diuréticos	45	47	22
α-bloqueantes	18	0	22
β-bloqueantes	32	29	33
Bloqueantes del canal de calcio	41	71	78

ACR se expresa como mediana (rango intercuartílico). El resto de las variables se expresan como frecuencia o como media ± desviación estándar.

ACR: cociente albúmina/creatinina; ARA: antagonista de los receptores de angiotensina; eGFR: filtrado glomerular estimado; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica.

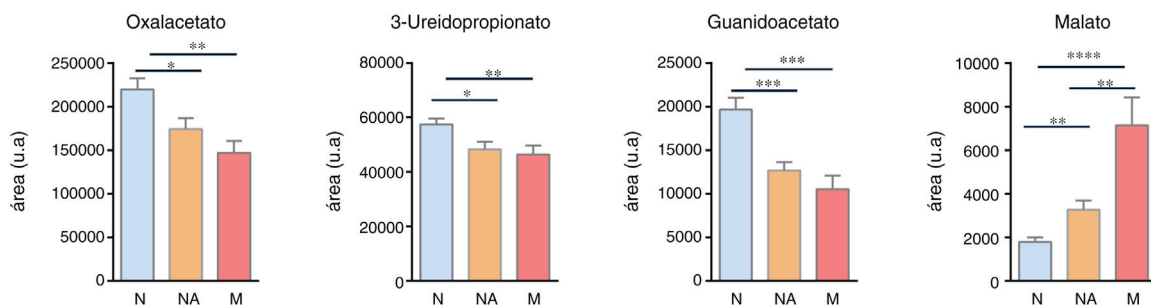


Figura 1 – Huella metabólica en orina asociada al desarrollo de albuminuria.

M: microalbuminuria; N: normo; NA: normal-alta; u.a.: unidades arbitrarias.

*p < 0,05. **p < 0,01. ***p < 0,001. ****p < 0,0001.

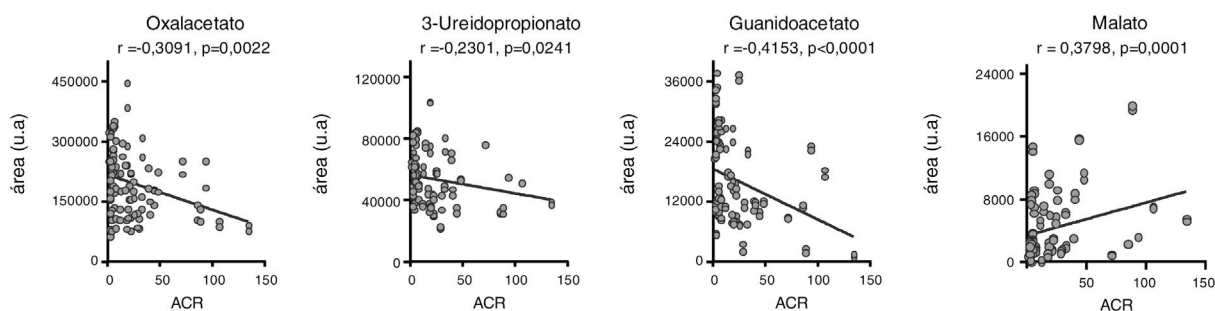


Figura 2 – Correlaciones observadas entre los metabolitos identificados en orina y el nivel de ACR. Correlación de Spearman. u.a: unidades arbitrarias.

los metabolismos de energía y de la arginina y prolina ya en pacientes con albuminuria en el rango normal-alta.

Como limitaciones del estudio cabe destacar diferencias en algunas de las características basales de los grupos clínicos comparados, en particular, en lo que se refiere al porcentaje de individuos diabéticos. Si bien es esperable una mayor presencia de diabetes mellitus en el grupo de sujetos con microalbuminuria, sería de interés evaluar en una mayor cohorte de sujetos únicamente no diabéticos las variaciones metabólicas observadas para determinar exactamente el grado de contribución de la diabetes.

Conclusiones

En este estudio hemos confirmado la asociación de los niveles de los metabolitos 3-ureidopropionato, oxalacetato, malato y guanidoacetato con distintos grados de albuminuria. Por vez primera, se ha identificado una huella molecular (panel metabólico) capaz de mostrar variación dentro de la condición de normoalbuminuria, distinguiendo entre sujetos con ACR < 10 mg/g o superior. Este hecho es destacable por cuanto que supone una herramienta con un enorme potencial en el manejo terapéutico de pacientes hipertensos con niveles de ACR considerados «no patológicos» y que, por lo tanto, no reciben una atención médica especial. Sin embargo, son estos pacientes los que más se beneficiarían de una intervención temprana, ya que presentan un mayor riesgo de enfermedad renal o cardiovascular.

Financiación

Instituto de Salud Carlos III-Fondos FEDER (PI16/01334, PI13/01873, PI17/01193, PI17/01093, IF08/3667-1, CPII15/00027, CP15/00129, PT13/0001/0013, PRB3 (IPT17/0019 ISCIIS-GEFI/ERDF), REDinREN (RD16/0009)), Ayuda a la Investigación de la Fundación SENEPRO y Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A Lucía Guerrero, Luisa Fernández y María Cruz Casal, del Hospital 12 de Octubre.

BIBLIOGRAFÍA

- Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018;39:3021-104.
- Cerezo C, Ruilope LM, Segura J, Garcia-Donaire JA, de la Cruz JJ, Banegas JR, et al. Microalbuminuria breakthrough under chronic renin-angiotensin-aldosterone system suppression. *J Hypertens*. 2012;30:204-9.
- Arnlov J, Evans JC, Meigs JB, Wang TJ, Fox CS, Levy D, et al. Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2005;112:969-75.
- Kong X, Jia X, Wei Y, Cui M, Wang Z, Tang L, et al. Association between microalbuminuria and subclinical atherosclerosis evaluated by carotid artery intima-media in elderly patients with normal renal function. *BMC Nephrol*. 2012;13:37.
- Bakris GL, Molitch M. Microalbuminuria as a risk predictor in diabetes: The continuing saga. *Diabetes Care*. 2014;37:867-75.
- Coresh J, Heerspink HJL, Sang Y, Matsushita K, Arnlov J, Astor BC, et al. Change in albuminuria and subsequent risk of end-stage kidney disease: An individual participant-level consortium meta-analysis of observational studies. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7:115-27.
- Ashitani A, Ueno T, Nakashima A, Doi S, Yamane K, Masaki T. High-normal albuminuria and incident chronic kidney disease in a male nondiabetic population. *Clin Exp Nephrol*. 2018;22:835-42.
- Melsom T, Solbu MD, Schei J, Stefansson VT, Norvik JV, Jenssen TG, et al. Mild albuminuria is a risk factor for faster GFR decline in the nondiabetic population. *Kidney Int Rep*. 2018;3:817-24.
- Volpe M, Battistoni A, Tocci G, Rosei EA, Catapano AL, Coppo R, et al. Cardiovascular risk assessment beyond Systemic Coronary Risk Estimation: A role for organ damage markers. *J Hypertens*. 2012;30:1056-64.
- Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, et al. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA*. 2001;286:421-6.
- Klausen K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen G, Clausen P, Scharling H, et al. Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. *Circulation*. 2004;110:32-5.
- Romundstad S, Holmen J, Kvenild K, Hallan H, Ellekjaer H. Microalbuminuria and all-cause mortality in 2 089 apparently healthy individuals: A 4.4-year follow-up study. The Nord-Trøndelag Health Study (HUNT), Norway. *Am J Kidney Dis*. 2003;42:466-73.
- Rachmani R, Levi Z, Lidar M, Slavachevski I, Half-Onn E, Ravid M. Considerations about the threshold value of microalbuminuria in patients with diabetes mellitus: Lessons from an 8-year follow-up study of 599 patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000;49(2-3):187-94.
- Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, et al. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation*. 2002;106:1777-82.
- Forman JP, Fisher ND, Schopick EL, Curhan GC. Higher levels of albuminuria within the normal range predict incident hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:1983-8.
- Martínez PJ, Baldán-Martín M, López JA, Martín-Lorenzo M, Santiago-Hernández A, Agudiez M, et al. Identification of six cardiovascular risk biomarkers in the young population: A promising tool for early prevention. *Atherosclerosis*. 2019;282:67-74.
- Xuan Y, Gào X, Holleczeck B, Brenner H, Schöttker B. Prediction of myocardial infarction, stroke and cardiovascular mortality with urinary biomarkers of oxidative stress: Results from a large cohort study. *Int J Cardiol*. 2018;273:223-9.
- Von Scholten BJ, Reinhard H, Hansen TW, Oellgaard J, Parving HH, Jacobsen PK, et al. Urinary biomarkers are associated with incident cardiovascular disease, all-cause mortality and

- deterioration of kidney function in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetologia*. 2016;59:1549–57.
19. Martin-Lorenzo M, Zubiri I, Maroto AS, Gonzalez-Calero L, Posada-Ayala M, de la Cuesta F, et al. KLK1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery. *Metabolomics*. 2015;11:1056–67.
 20. Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, de la Cuesta F, Maroto AS, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, et al. Urinary alpha-1 antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:8.
 21. Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, Martinez PJ, Baldan-Martin M, Lopez JA, Ruiz-Hurtado G, et al. Immune system deregulation in hypertensive patients chronically RAS suppressed developing albuminuria. *Sci Rep*. 2017;7:8894.
 22. Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, Martínez PJ, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Segura J, et al. Hypertensive patients exhibit an altered metabolism. A specific metabolite signature in urine is able to predict albuminuria progression. *Transl Res*. 2016;178:25–37, e7.
 23. Haller H, Viberti GC, Mimran A, Remuzzi G, Rabelink AJ, Ritz E, et al. Preventing microalbuminuria in patients with diabetes: Rationale and design of the Randomised Olmesartan and Diabetes Microalbuminuria Prevention (ROADMAP) study. *J Hypertens*. 2006;24:403–8.
 24. Group KDIGOKHCW. KDIGO 2018 clinical practice guideline for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of hepatitis C in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2018;8(3):91–165.
 25. Hasanato RM. Diagnostic efficacy of random albumin creatinine ratio for detection of micro and macro-albuminuria in type 2 diabetes mellitus. *Saudi Med J*. 2016;37:268–73.
 26. Picotti P, Aebersold R. Selected reaction monitoring-based proteomics: Workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat Methods*. 2012;9:555–66.
 27. Martin-Lorenzo M, Martinez PJ, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Prado JC, Segura J, et al. Citric acid metabolism in resistant hypertension: Underlying mechanisms and metabolic prediction of treatment response. *Hypertension*. 2017;70:1049–56.
 28. Posada-Ayala M, Zubiri I, Martin-Lorenzo M, Sanz-Maroto A, Molero D, Gonzalez-Calero L, et al. Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2014;85:103–11.
 29. Ruiz-Hurtado G, Condezo-Hoyos L, Pulido-Olmo H, Arangué I, González MC, Arribas S, et al. Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *J Hypertens*. 2014;32:2082–91, discussion 91.
 30. Liang M. Hypertension as a mitochondrial and metabolic disease. *Kidney Int*. 2011;80:15–6.
 31. Oudman I, Kewalbansingh PV, van Valkengoed I, Zwinderman AH, Clark JF, van Montfrans GA, et al. Creatine kinase is associated with failure of hypertension treatment. *J Hypertens*. 2013;31:1025–31.
 32. Andrade F, Rodríguez-Soriano J, Prieto JA, Elorz J, Aguirre M, Ariceta G, et al. The arginine-creatine pathway is disturbed in children and adolescents with renal transplants. *Pediatr Res*. 2008;64:218–22.