UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

PEDRO LUIS ROCHA DA CRUZ

Avaliação de terapias imunossupressoras em transplantes renais com uma abordagem metabolômica

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo, 2017
Data do Depósito na SPG: 03/05/2017

PEDRO LUIS ROCHA DA CRUZ

Avaliação de terapias imunossupressoras em transplantes renais com uma abordagem metabolômica

Tese apresentada ao instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Química).

Orientadora**:** Profª. Drª. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo

2017

Dedico essa tese aos meus pais Celso e Sandra, ao meu irmão Guilherme, a minha esposa Daniela pela compreensão e apoio que me deram durante minha vida

acadêmica e a minha filha Beatriz que me deu a alegria de ser pai.

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida e por me conceder tantas graças, e a Nossa Senhora Auxiliadora, por sua incessante intercessão e proteção.

À minha orientadora Profª. Drª. Marina Tavares por toda ajuda, discussões, ensinamentos e oportunidades oferecidas durante o curso de pós-graduação.

Ao Professor Farah pelas discussões, conversas e ensinamentos.

Aos meus pais Celso e Sandra e ao meu irmão Guilherme, pelo imenso carinho, amor e compreensão que tiveram e tem comigo, e nunca me deixaram sem amparo.

Às minhas avós Tereza (*in memoriam)* e Hanna (*in memoriam*), por serem exemplos para mim até hoje de amor pelo trabalho e ao próximo.

À minha esposa Daniela por tudo, por sempre acreditar em mim, me apoiar nas horas difíceis, me compreender, e por me acompanhar em todos os momentos.

À minha filha Beatriz que preencheu nossa vida com mais alegria, e nos ensina a cada dia sermos pais.

À minha madrinha Rosângela, por fazer parte da minha vida, me acolher, orientar e pelo carinho de sempre.

Ao pessoal do laboratório: Ana Rosa, Aline Klassen, Aline Scarabelin, Carol, Andrea, Daniel, Fábio, Gisele, Loraine, Maicon, Karina. Muito obrigado a cada um de vocês que individualmente me ajudaram durante estes anos.

À Gisele A. B. Canuto, pelas discussões, ideias e ajudas com a cromatografia gasosa e na metabolômica.

A Fabiana Dörr e ao Prof. Dr. Ernani pelo suporte e auxílio na parte instrumental.

Ao Daniel Rossato pelas ajudas e discussões durante o doutorado.

Aos meus amigos Erik, Marlon, Douglas, Zé Augusto, pela companhia e por saber que sempre posso contar com vocês.

Aos professores da pós-graduação que contribuíram enormemente para minha formação.

Aos colegas da Clariant, especialmente Lívio Caribé, Marcelo Minghetti, Fabiana, Leonardo, Raphael, Leandro Blachechen, Ricardo, Iolana, Rogério, Thiago, Bruna, Monique, Juliana, Viviana, Leandro Perin, Renan, Erick, Renato, Jonathas, Patrick, Leda e Juan.

Aos paroquianos da Igreja de Santa Teresinha, sobretudo ao Padre Camilo, Dco. Marcelo, Tiago Puccini, Renata Habiro, Paulo e Márcia, Maria, Marcos, Tati, Domingos, pelo acolhimento e por me mostrarem cotidianamente o carisma de São João Bosco.

Ao Instituto de Química, representado pelos seus funcionários.

Agradeço ao CNPq (140675/2013-2) pelo auxílio financeiro.

Agradeço à Fapesp (processo 2011/18193-4) pelo auxílio financeiro.

“...Ama a Verdade, mostra-te como és, sem fingimentos, sem receios, sem respeito humano. Se a Verdade te custa a perseguição, aceita-a; se te custa o tormento, suporta-o. E se, pela Verdade, tivesses que sacrificar-te a ti mesmo e a tua vida, sê forte no sacrifício”...

Santo José Moscati (rogai por nós)

RESUMO

Cruz, P. L. R. Avaliação de terapias imunossupressoras em transplantes renais com uma abordagem metabolômica. 2017. 137p. Tese (Doutorado) -Programa de Pós-Graduação em Ciências. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O aprimoramento das técnicas analíticas viabilizou a metabolômica, uma área da ciência que busca compreender, de forma comparativa, os metabólitos envolvidos nas vias bioquímicas. A metabolômica está inserida no contexto das "ômicas", que teve início na "Era Genômica", a qual permitiu a identificação de diversos genes. Em seguida, o interesse dos pesquisadores centrou no estudo dos metabólitos (metabolômica) mostrando ser uma ferramenta valiosa na pesquisa do transplante renal, que exige um tratamento medicamentoso por meio de imunossupressores.

A combinação destes imunossupressores pode minimizar a rejeição do órgão transplantado, reforçando a necessidade de um estudo metabolômico, a fim de avaliar e comparar as mudanças ocorridas após o transplante em nível molecular, melhorando o conhecimento sobre a influência destes regimes e dando subsídios sobre prognósticos possíveis na área de transplante renal.

Nesta tese foram avaliadas 2 terapias: Everolimo/ Prednisona/Tacrolimo (grupo 1) e Micofenolato mofetil/Prednisona/Tacrolimo (grupo 2) a partir de uma abordagem *untargeted*. No presente trabalho foram coletadas amostras de urina de pacientes ao longo de 6 meses. Foi necessário determinar a melhor condição para análise das amostras de urina dos pacientes. Desta forma, foram realizados estudos sobre alguns parâmetros que impactam no preparo de amostra abordando a influência da urease, tipos e proporção de solventes para precipitação de proteína, seleção do melhor agente derivatizante e tratamento de dados.

A avaliação da medida de qualidade dos tratamentos com urease foi feita a partir do desvio padrão relativo (RSD) dos valores de intensidade de pico.

A concentração de 10 mg mL^{-1} apresentou o melhor resultado. O estudo mostrou também que o teor de ureia na urina pode influenciar na identificação dos compostos. O número de compostos identificados foi menor quando a urina não foi tratada com urease, com aproximadamente 10 compostos a

menos em relação à amostra tratada com a enzima, na mesma concentração de ureia adicionada. Dos solventes orgânicos testados para precipitação de proteínas nas amostras de urina, o isopropanol mostrou ser o solvente mais adequado na proporção 1:6 urina:solvente (v/v), utilizando-se 100 μL de urina. Foram testados dois protocolos de derivatização para análises por GC-MS: metoximação e sililação utilizando BSTFA e cloroformiato de metila. A comparação mostrou que o procedimento por BSTFA, com 40 metabólitos identificados, foi superior ao cloroformiato de metila, com 13 compostos identificados. No tratamento de dados com o software XCMS, os seguintes parâmetros foram avaliados: largura a meia altura do pico (fwhm), largura da banda (bw) e *threshold* (sntresh). Para avaliar a melhor combinação destes parâmetros, foi feita uma variação univariada destes valores.

A qualidade do resultado de cada combinação foi monitorada pelos valores gerados de número de *missing values*, quantidade de picos com RSD <15% e número de valores duplicados. Os valores ótimos foram obtidos para a combinação: fwhm=4, bw=2 e threshold=5.

A abordagem do estudo dos dois grupos de pacientes baseou-se inicialmente na comparação entre o dia 7 da terapia com os demais períodos (dia 14, mês 1, mês 3 e mês 6) e posteriormente avaliou-se a evolução temporal. A partir do mês 3 os valores de correlação e predição dos modelos de PLS-DA são melhores e já é eficaz na diferenciação entre os dois grupos. Foram observadas perturbações no metabolismo de carboidratos em ambos os grupos, como açúcares, glicerol e *N*-acetil-*D*-manosamina. No grupo 1, foram observados metabólitos discriminantes da classe dos poliois e das vias do ciclo do ácido cítrico e degradação de xenobióticos, enquanto que, no grupo 2, foi observada alteração do hidroxibutirato, um corpo cetônico. Neste grupo, foi observado também um aumento do ácido hipúrico, ácido acetamido butírico, ácido benzoico, entre outros. Nesta tese foi possível demonstrar que a metabolômica é uma ferramenta importante para comparar metabólitos discriminantes entre dois regimes imunossupressores, sendo um estudo piloto que visa fornecer subsídios para avaliação da influência destas terapias no prognóstico de transplante renal.

Palavras-chave: metabolômica, transplante de rim, imunossupressores, análise multivariada, preparo de amostras

ABSTRACT

Cruz, P. L. R Assessment of immunosuppressive therapies with a metabolomic approach. 2017. 137p. *PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry*. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The improvement of analytical techniques enabled the emergence of metabolomics, which aims to compare the metabolites involved in biochemical pathways, in certain biological conditions. Metabolomics is inserted in the "omics" context, which began in the "Genomic Age", and allowed the identification of several genes. After that, the researchers focused on the study of metabolites. Among several applications, metabolomics can be a valuable tool in renal transplant research, which requires a drug treatment through immunosuppressants. The combination of these immunosuppressants can minimize toxicity and rejection of the transplanted organ, reinforcing the need for a metabolomic study, in order to evaluate and compare changes after transplantation at the molecular level, improving knowledge about the influence of these regimens and giving subsidies on prognosis in the area of renal transplantation.

In this thesis two immunosuppressive therapies were evaluated by an untargeted approach: Everolimus/Prednisone/Tacrolimus (group 1) and Mycophenolate mofetil/Prednisone/Tacrolimus (group 2). In this study, urine samples were collected from patients over 6 months. It was necessary to determine the best condition for analysis of patients' urine samples. Thus, studies were carried out on some parameters that impact on sample preparation, evaluating the influence of urease, types and proportion of solvents for protein precipitation, selection of the best derivatizing agent, and data treatment.

The evaluation of the quality measure of the urease treatments was made from the relative standard deviation (RSD) of the peak intensity values. The concentration of 10 mg mL^{-1} presented the best result. The study also showed that urine urea content may influence the identification of the compounds. The number of identified compounds was lower when urine was not treated with urease, with approximately 10 compounds less than the enzyme-treated sample, at the same concentration of urea added. In the

evaluation of the organic solvents tested for protein precipitation in the urine samples, isopropanol was the most suitable solvent in the ratio 1: 6 urine:solvent (v/v), using 100 µL of urine. Two derivatization protocols were tested for GC-MS analysis: metoximation and silylation with BSTFA and methyl chloroformate. The comparison between the two derivatization protocols showed that the BSTFA procedure, with 40 identified metabolites, was superior to methyl chloroformate with 13 compounds identified. In data processing with the XCMS software, the following parameters were evaluated: full width at half maximum of the peak (fwhm), bandwidth (bw) and threshold (sntresh). To evaluate the best combination of these parameters, a univariate variation of these values was made. The quality of the result of each combination was monitored by the number of missing values, number of peaks with RSD <15%, and number of duplicate values. The optimal values were obtained for the combination: fwhm=4, bw=2 and threshold =5.

The study of the two groups of patients was initially based on the comparison between day 7 of the therapy with the other periods (day 14, month 1, month 3 and month 6) and later the temporal evolution was evaluated. From month 3 the values of correlation and prediction of the PLS-DA models are better and already effective in the differentiation between the two groups. Disorders in carbohydrate metabolism were observed in both groups with sugars and glycerol and N-acetyl-D-mannosamine as discriminant metabolites. In group 1, discriminant metabolites of the class of polyols and citric acid cycle pathways and degradation of xenobiotics were observed, and in group 2 alteration of hydroxybutyrate, a ketone body, was observed. In this group an increase of hippuric acid, acetamido butyric acid, benzoic acid, among others, was also observed. In this thesis it was possible to demonstrate that metabolomics is an important tool to compare discriminant metabolites between two immunosuppressive regimens, being a pilot study that aims to provide future subsidies to evaluate the influence of these therapies on the renal transplant prognosis.

Keywords: metabolomics, kidney transplantation, immunosuppressive, multivariate analysis, sample preparation

Lista de abreviaturas e siglas

ASTM American Society for Testing and Materials

AMDIS Automated mass spectral deconvolution and identification system

ANOVA Análise de variância

BID Duas vezes ao dia

Bw Largura da banda

BSA *N*,*O*-*bis*(trimetilsilil)acetamida

BSTFA *N*,*O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

C18 Octadecilsilano

CE Eletroforese capilar

CE-MS Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas

GC Cromatografia gasosa

GC-MS Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CZE Eletroforese capilar de zona

EIC Cromatograma de íon extraído

ESI Ionização por *eletrospray*

MDRD Fórmula de modificação da dieta na doença renal

Fwhm Largura a meia altura do pico

GFR Taxa de filtração glomerular

HMDB Human Metabolome Database

HILIC Cromatografia líquida com interação hidrofílica

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-MS Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

MTBSTFA *N*-terc-butildimetilsilil-*N*-metiltrifluoroacetamida

MS Espectrometria de massas

MSTFA *N*-metil-trimetilsililtrifluoracetamida

MTB-STFA *N*-metil-*N*-*t*-butil-dimetill-silil-trifluor-acetamida

NIST National Institute of Standards and Technology

NPLC Cromatografia líquida em fase normal

OPLS-DA Análise discriminante com projeção ortogonal por mínimos quadrados parciais

PC Componentes principais

PC1	Primeira componente principal
PC2	Segunda componente principal
PCA	Análise de componentes principais
PDMS	Difenil polidimetil siloxano
PLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
QC	Controle de qualidade
Q2	Previsibilidade do modelo
R2	Variância explicada
RSD	Desvio padrão relativo
RMN – ^{1}H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RP	Fase reversa
RPLC	Cromatografia líquida em fase reversa
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMCS	Trimetil cloro silano
TMS	Trimetil silil
U	Unidade
UV	Ultravioleta
U.V.	Unidade de variância
VIP	Variável importante na projeção

Lista de Figuras

Figura 1.1. Representação simplificada do metabolismo de uma célula e complementaridade entre as ciências “ômicas”, que abrangem o genoma, proteoma, transcriptoma e o metaboloma. 19

Figura 1.2. Representação gráfica da interpretação em rede contraposta à visão linear tradicional. Os retângulos representam os genes, triângulos proteínas e círculos, metabólitos. Os genes, proteínas e metabólitos estão inter-relacionados. 20

Figura 1.3. Fluxo de trabalho em metabolômica. O fluxo de trabalho depende da abordagem selecionada (targeted ou untargeted), mas apresenta sempre as etapas de formulação do problema, desenho experimental, preparo de amostra, tratamento e processamento de dados e interpretação biológica. 23

Figura 1.4. Número de publicações por ano na área de metabolômica (palavra chave metabolomics) entre os anos de 2000-2017. (Banco de dados: SciVerse Scopus). 24

Figura 1.5. Representação simplificada da deconvolução de 2 espectros (vermelho e verde) a partir do cromatograma de íons totais (TIC, em preto). 29

Figura 1.6. Etapas de tratamento de dados para espectrometria de massas. 33

Figura 1.7. Visualização de dados por PCA (adaptado da referência[61]). 35

Figura 1.8. Gráfico de PLS. Relação quantitativa entre a matriz de dados experimentais X_{ik} com i valores de cada amostra k e a matriz Y que contém os m valores quantitativos. 35

Figura 1.9. Rim e suas regiões anatômicas (modificado de http://www.aokainc.com/human-body-anatomy-kidney/, acessado em 10/06/2014). 38

Figura 1.10. Estrutura do a. everolimo; b. tacrolimo; c. ácido microfenólico; d. prednisona. 41

Figura 1.11. Mecanismo de ação do Everolimo. 41

Figura 1.12. Mecanismo de ação do micofenolato mofetila. 42

Figura 1.13. Visualização da ação dos imunossupressores utilizados neste estudo. 43

Figura 4.1. Cromatograma de íons totais obtido por GC-MS típico da urina sem tratamento com urease (verde) e com urease (vermelho). O sinal da ureia aparece no tempo de retenção de aproximadamente 8,5 min, sobrepondo por 0,2 min, quando não tratada com urease. As condições cromatográficas são descritas na seção 3.5 desta tese. 58

Figura 4.2. Gráfico de escores das componentes 1 e 2 do modelo de PCA mostrando a dispersão da amostra sem tratamento com urease e a comparação com o tratamento com 2, 10 e 15 mg mL^{-1}. R^2: 0,80; Q^2: 0,70. 60

Figura 4.3. Representação esquemática do experimento realizado. 62

Figura 4.4. Gráfico de PCA comparando isopropanol (sem preenchimento) e metanol (em preto). R^2: 0,80; Q^2: 0,60. 66

Figura 4.5. Principais grupos funcionais que podem ser derivatizados utilizando BSTFA. 68
Figura 4.6. Reação de oximação e sililação com BSTFA. 69
Figura 4.7. Derivatização de aminas e carbonilas com cloroformiato de metila. 70
Figura 4.8. Cromatograma representativo da amostra derivatizada com cloroformiato de metila (a) e BSTFA (b). Condições cromatográficas são descritas na seção 3.5 desta tese. 71
Figura 4.9. Metodologia empregada no XCMS. 73
Figura 4.10. Influência do valor de bw. (a) bw=3; (b) bw=5. 75
Figura 4.11. Gráfico do desvio de tempo de retenção (tr) em função dos tempos de retenção em minutos obtido depois de um alinhamento dos dados no XCMS. 76
Figura 4.12. Relação entre a porcentagem de valores de RSD<15% em função das variáveis bw, fwhm e threshold. Para valores fixos de bw e fwhm, quanto maior o valor do threshold, maior a porcentagem de valores de RSD<15%. 78
Figura 4.13. Relação entre a porcentagem de missing values e os valores de fwhm, bw e threshold. Podem ser observados valores mais baixos de missing values para valores de threshold mais altos. 78
Figura 4.14. Influência dos valores de bw e threshold na porcentagem de RSD<15% com diferentes valores de fwhm. 79
Figura 4.15. Influência dos valores de bw e threshold na porcentagem de missing values com diferentes valores de fwhm. 79
Figura 4.16. Influência dos valores de bw e fwhm na porcentagem de RSD<15% com diferentes valores de bw. 80
Figura 4.17. Influência dos valores de bw e fwhm na porcentagem de missing values com diferentes valores de bw. 80
Figura 4.18. Gráfico de PCA de todas as amostras do Grupo 1. (a) com R^2: 0,30 e Q^2:0,20 e grupo 2 (b) com R^2: 0,40 e Q^2:0,32. 84
Figura 4.19. Modelo de PLS-DA construído com as todas as amostras, com predição das amostras de QC (●). a) Grupo 1. R^2: 0,16; Q^2 :0,00. b) Grupo 2, R^2: 0,23; Q^2: 0,13. 85
Figura 4.20. Gráficos de scores obtidos por PCA da comparação entre o Dia 7 e Mês 6. a) Grupo 1: R^2: 0,70; Q^2: 0,54. b) Grupo 2: R^2: 0,70 e Q^2: 0,58. 87
Figura 4.21. Gráfico de scores obtido por PLS-DA da comparação entre o dia 7 e mês 6. a) Grupo 1: R^2: 0,90; Q^2:0,77. b) Grupo 2: R^2: 0,90, Q^2: 0,80. 88
Figura 4.22. Gráfico da validação do modelo de PLS-DA pelo teste de permutação (100 permutações). R2(▲) e Q2 (■). a. Grupo1; b. Grupo 2. 89
Figura 4.23. Visão geral das diferenças entre os metabólitos do grupo 1 (em azul) e grupo 2 (em verde) na comparação entre o dia 7 e mês 3 (a) e dia 7 e mês 6. 102

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Vantagens e desvantagens das técnicas analíticas mais comuns utilizadas em metabolômica. 32

Tabela 3.1. Descrição dos regimes de imunossupressores do Grupo 1 e 2 49

Tabela 3.2. Número de amostras de cada período para os grupos 1 e 2 e o valor estimado de MDRD..... 50

Tabela 4.1. Exemplos na literatura de utilização da urease para remoção de ureia e as condições experimentais 57

Tabela 4.2. Influência da concentração de urease em função dos valores de RSD..... 59

Tabela 4.3. Influência da urease sobre o número de compostos identificados 63

Tabela 4.4. Classificação dos tratamentos com solventes de precipitação por meio de pontuação. Foram comparadas proporções de 1:4 a 1:6 de urina:solvente e volumes de urina de 100 e 200 μL 65

Tabela 4.5. ANOVA da amostragem de urina em diferentes proporções..... 67

Tabela 4.6. Exemplos de combinações de valores de fwhm, bw e threshold (sn) com pontuações consideradas adequadas para aplicação no XCMS 81

Tabela 4.7. Exemplos de combinações de valores de fwhm, bw e missing values com pontuações consideradas inadequadas para aplicação no XCMS 82

Tabela 4.8. CV-ANOVA para o modelo PLS-DA obtido a partir do SIMCA para o grupo 1 90

Tabela 4.9. CV-ANOVA para o modelo PLS-DA obtido a partir do SIMCA para o grupo 2 90

Tabela 4.10. Gráficos de scores de PLS-DA dos grupos 1 e 2 de todos os períodos comparados com o Dia 7..... 92

Tabela 4.11. Gráficos scores de PLS-DA dos grupos 1 e 2 de comparação temporal..... 93

Tabela 4.12. Metabólitos discriminantes do Grupo 1 do dia 7 comparado ao mês 3..... 95

Tabela 4.13. Metabólitos discriminantes do Grupo 2 do dia 7 comparado ao mês 3..... 96
Tabela 4.14. Metabólitos discriminantes do Grupo 1 do dia 7 comparado ao mês 6..... 96
Tabela 4.15. Metabólitos discriminantes do Grupo 2 do dia 7 comparado ao mês 6..... 97
Tabela 4.16. Comparação com estudos publicados na literatura..... 103

Sumário

1. Introdução 19

1.1 Metabolômica 19

1.2 Aplicações da metabolômica em transplante de rim 37

2. Objetivos 47

2.1 Objetivo geral 47

2.2 Objetivos específicos 47

3. Parte experimental 48

3.1 Materiais e Reagentes 48

3.2 Desenho experimental de coleta e dosagem de medicamentos 48

3.3 Coleta de amostras 50

3.4 Preparo de amostras para metabolômica 51

3.4.2 Derivatização 51

3.4.2.1 Metoximação e sililação 51

3.4.2.2 Cloroformiato de metila 52

3.5 Análise por GC-MS 52

3.6 Tratamento de dados 53

3.7 Protocolo de preparo de amostra 53

4. Resultados e discussões 55

4.1 Otimização do preparo de amostras 55

4.1.1 Influência da concentração de urease 56

4.1.2 Influência do tratamento com urease sobre o número de compostos identificados 61

4.1.3 Influência dos solventes na precipitação de proteínas 64

4.1.4 Derivatização 67

4.1.5 Tratamento de dados 72

4.2 Metabolômica 83

4.3 Metabólitos e vias metabólicas afetadas 98

4.3.1 Metabolismo de carboidratos 98

4.3.2 Polióis 99

4.3.3 Ciclo de Krebs 100

4.3.4 Corpos cetônicos 100

4.3.5 Metabolismo de aminoácidos 100

4.3.6 Metabolismo do glioxalato e degradação da glicina 101

4.3.7 Metabolismo de xenobióticos 102
4.3.8 Visão geral dos metabólitos discriminantes 102
5. Conclusões e perspectivas 104
6. Anexos 106
6.1 Gráficos 106
6.1.1 Gráficos do Grupo 1 106
6.1.2 Gráficos do Grupo 2 116
6.2 Folha de rosto 127
6.3 Parecer Consubstanciado 128
6.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 131
6.5 TCLE saudáveis 134
Curriculum vitae 136

1. Introdução

1.1 Metabolômica

O estudo dos genes, das proteínas e dos metabólitos e o desenvolvimento das técnicas analíticas originaram uma nova área da ciência denominada “ômica”, que tem como característica a compreensão dos mecanismos moleculares presentes em uma célula, e teve início com o sequenciamento intensivo dos genes de diversos organismos (genômica). Quando se percebeu que o genótipo de um indivíduo ou organismo não era suficiente para uma compreensão completa de sua bioquímica, outras ciências ômicas como a transcriptômica, proteômica e metabolômica (Figura 1.1) ganharam força para auxiliar na interpretação destes mecanismos moleculares[1].

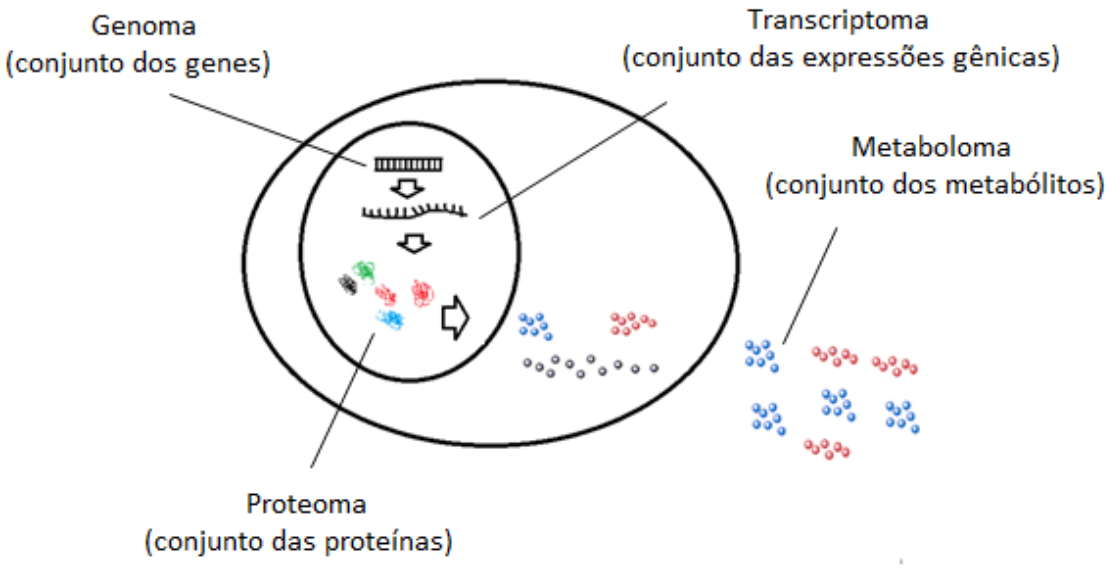


Figura 1.1. Representação simplificada do metabolismo de uma célula e complementaridade entre as ciências “ômicas”, que abrangem o genoma, proteoma, transcriptoma e o metaboloma.

A metabolômica possui alguns desafios em relação às outras ciências ômicas, em função da complexidade da matriz biológica a ser examinada, que pode ser um biofluido, tecido e até mesmo uma célula, contendo compostos de diferentes classes químicas e concentrações variadas a serem identificados, além de inúmeros interferentes. Neste contexto, é praticamente impossível que

[1] Boas, S.G.V.; Mas, S.; Åkesson, M.; Smedsgaard, J.; Jens, N.; *Mass Spectrom. Rev.*; **2005**, 24, 613.

um único método analítico seja capaz de cobrir a maior quantidade possível de compostos em uma única análise[2].

A visão sobre a relação linear entre os genes, proteínas e metabólitos, onde um gene que expressa uma proteína particular, que por sua vez tem um metabólito associado, foi proposta em 1947 por Beadle e Tatum (1941)[3] e foi baseada no trabalho experimental com linhagens mutantes de *Neurospora crassa*, incapazes de realizar determinadas reações bioquímicas, Figura 1.2. Esta visão tem sido contraposta por uma abordagem holística, na qual a alteração de um gene ou enzima pode levar a perturbações em vários sistemas de vias metabólicas, com uma rede de interação entre as vias bioquímicas, onde a variação da concentração de um metabólito influencia a concentração de outros metabólitos na célula.

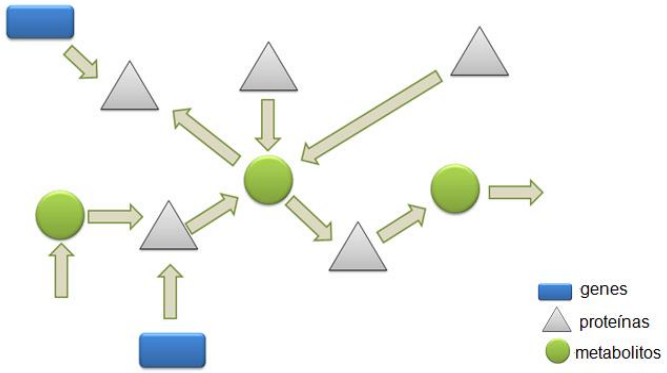


Figura 1.2. Representação gráfica da interpretação em rede contraposta à visão linear tradicional. Os retângulos representam os genes, triângulos proteínas e círculos, metabólitos. Os genes, proteínas e metabólitos estão inter-relacionados.

As ciências ômicas cada vez mais têm auxiliado na compreensão dos mecanismos moleculares da célula e mostrado a necessidade de uma abordagem sistemática pela biologia de sistemas, no seu papel na conexão entre os diferentes níveis ômicos. Estudos pioneiros realizados entre as décadas de 60 e 80 contribuíram para o desenvolvimento dos conceitos da área de estudo da metabolômica, entre os quais podem ser citadas a medicina

[2] Boas, S.G.V.; Bruheim, P.; *J. Integrative Biol.;* **2007**, 11, 305.
[3] Beadle, G.W.; Tatum, E. L.; *Proc. Natl Acad. Sci.*; **1941**, 27, 499.

ortomolecular, análises de fluxos metabólicos[4], além do uso de técnicas como ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^{1}H)[5] e de separação, como cromatografia e eletroforese capilar, que permitiram e auxiliaram a compreensão de distúrbios metabólicos.

A medicina ortomolecular relaciona-se com a metabolômica na determinação da influência de compostos oriundos no corpo humano e a origem de doenças[1]. Pode ser também citado o trabalho de Pauling e Robinson, no qual foram desenvolvidos métodos instrumentais para monitorar substâncias voláteis na urina[6]. De maneira análoga, Kacser[4] estudou as variáveis associadas com o controle do metabolismo e o seu fluxo, tais como constante de Michaelis da enzima (Km), números de *turnover* (kcat) e as constantes de inibição (Ki). Considerando estes parâmetros, ele observou que o conjunto de metabólitos e seus fluxos são interdependentes.

A ciência de separações teve um papel chave no estudo do metaboloma, com a utilização de técnicas como a cromatografia gasosa hifenada à espectrometria de massas (GC-MS)[7] e cromatografia em papel[8], embora esta última tenha aplicações muito limitadas. Pode também ser citado o uso de cromatografia de troca iônica para análise de 150 metabólitos que absorvem na região do UV, que foram detectados em urina[9] e a separação de centenas de metabólitos da urina[10] por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), devido ao desenvolvimento de novas colunas[11], adequadas à realidade das matrizes biológicas e dos metabólitos encontrados.

Neste contexto, o termo metaboloma foi primeiramente cunhado por Oliver et al. (1998)[12],[13] e o define como conjunto de todas as moléculas de baixa massa molecular (menor que 1500 Da) como carboidratos, vitaminas,

---

4 Kacser, H.; Burns, J. A.; *Symp. Soc. Exp. Biol.*; **1973**, 27, 65.
5 Bales, J.R.; Higham, D.P.; Howe, I.; Nicholson, J.K.; Sadler, P.J.; *Clin. Chem.*; **1984**, 30, 426.
6 Pauling, L.; Robinson, A.B.; Teranishi, R.; Cary, P.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **1971**; 68; 2374.
7 Jellum, E.; Close, V.A.; Patton, W.; Pereira, W.; Halpern, B.; *Anal. Biochem.*; **1969**, 31, 227.
8 Williams, R. J.; Berry, L. J.; Beerstecher, E. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **1949**, 35, 265.
9 Pitt, W. J.; Scott, S. D.; Johnson, W. F.; Jones, G. J.; *Clin. Chem.*; **1970**, 16, 657.
10 Molnar, I.; Horvath, C.; *J. Chromatogr.*; **1977**, 143, 391.
11 Horváth, C. S.; Lipsky, S. R.; *J. Chromatogr. Sci.*; **1969**, 7, 109.
12 Oliver, S.G.; Winson, M.K.; Kell, D.B.; Baganz, F.; *Tibtech.*; **1998**, 16, 373.
13 Werf, M.J.; Jellema, R.H.; Hankemeier, T.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*; **2005**, 32, 234.

ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros, presentes nas células em um determinado estado fisiológico ou de desenvolvimento.

Após a contribuição de diversos pesquisadores nesta área, Fiehn (2001)[14] introduziu alguns termos utilizados em metabolômica como análise orientada (*targeted analysis*), e não orientada (*untargeted analysis*), tais como *Fingerprinting e footprinting*. Nicholson introduziu o termo metabonômica como a medida quantitativa da metabolômica[15].

Em uma abordagem mais ampla, Villas-Bôas[16] sugere que a metabolômica é a caracterização funcional dos metabólitos, sob diversas condições ambientais ou genéticas, e a relação entre estes fenótipos com os genótipos correspondentes. Além das definições propostas pelos pesquisadores, a metabolômica é uma abordagem comparativa, entre populações. Assim, é imprescindível na análise metabolômica discriminar os metabólitos significativos entre um grupo controle e um grupo teste.

Embora não exista um consenso na literatura sobre as definições usadas em metabolômica, convencionou-se nesta tese usar a abordagem *targeted*, e *untargeted*, primeira etapa a ser decidida no trabalho, que dependerá do tipo de problema que será abordado e quais experimentos serão executados. No caso da abordagem *target*, o foco é uma determinada via bioquímica, ou classe específica de compostos; no caso de uma abordagem *untargeted*, o objetivo é identificar a maior quantidade possível de compostos presentes na amostra. Por se tratar de uma amostra biológica, é necessário realizar um *quenching* metabólico, no qual a amostra antes de ser analisada é refrigerada em condições apropriadas, de modo que impeça qualquer ação enzimática, degradando os compostos presentes[16].

O preparo de amostra é uma etapa importante, podendo ser abordado de diferentes maneiras, como remoção de proteínas, derivatização (CG-MS) e, no caso da abordagem *targeted*, é realizada uma extração líquido-líquido ou extração em fase sólida (SPE). O trabalho é executado com o auxílio de uma

14 Fiehn, O.; *Comp. Funct. Genomics*; **2001**, 2, 155.
15 Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; Holmes, E.; *Xenobiotica*; **1999**, 29, 1181.
16 Boas. S.G.V.; Rasmussen, S.; Lane, G.A.; *Trends Biotechnol.*; **2005**; 23, 385.

ou mais técnicas adequadas, como ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), ou eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS). Finalmente é realizado o tratamento de dados, que consiste nas etapas de pré-processamento, processamento, visualização, normalização e tratamento estatístico dos dados, que serão utilizados para interpretar biologicamente os resultados obtidos.

A análise dos dados depende do uso de ferramentas de estatística multivariada, que englobam análise de componentes principais (PCA), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e análise discriminante com projeção ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) usadas nas abordagens *untargeted* e opcionais nas abordagens *targeted*, sendo mais comum a quantificação. Um esquema simplificado do fluxo de trabalho na metabolômica pode ser visualizado na Figura 1.3.

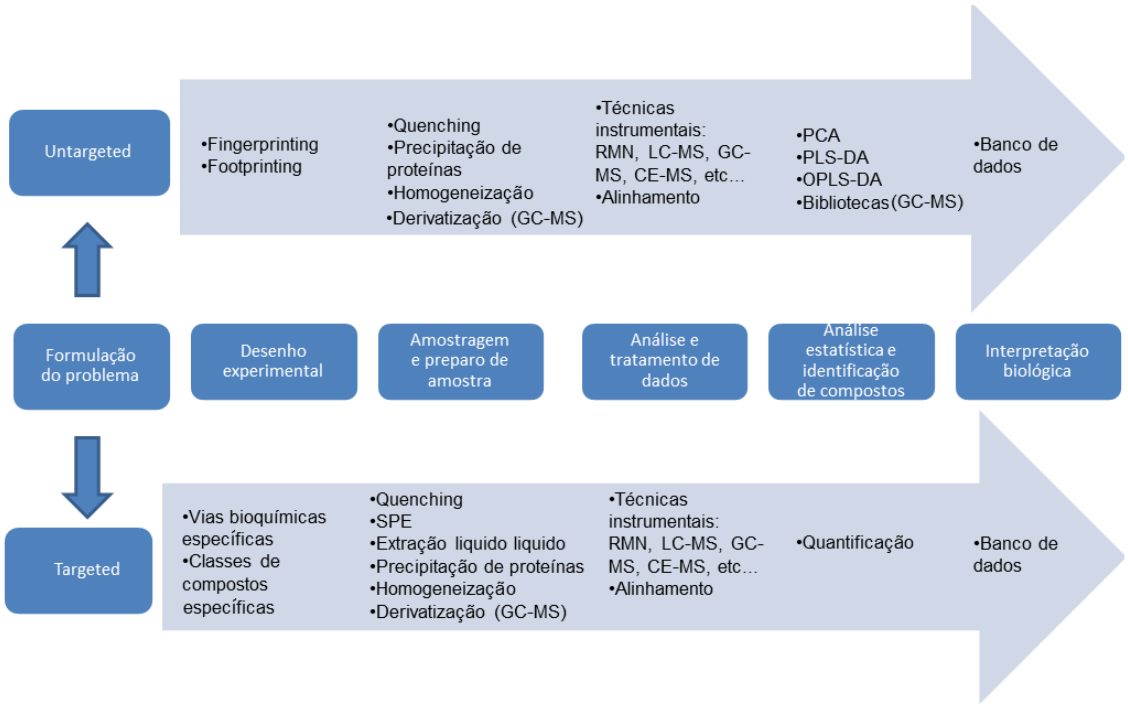


Figura 1.3. Fluxo de trabalho em metabolômica. O fluxo de trabalho depende da abordagem selecionada (*targeted* ou *untargeted*), mas apresenta sempre as etapas de formulação do problema, desenho experimental, preparo de amostra, tratamento e processamento de dados e interpretação biológica.

A metabolômica *untargeted* permite identificar centenas de metabólitos por vez, uma vantagem com relação ao diagnóstico clínico comum, e além dos padrões clínicos usuais em amostras de urina (aminoácidos, glicose, creatinina e ureia), é possível identificar também compostos que refletem o quadro fisiológico e metabólico do paciente, como por exemplo, a presença de metil-histidina, creatinina, taurina e glicina como indicativo de remodelagem do tecido, atrofia muscular e quebra de proteínas miofibrilares[17]. Outros metabólitos são indicadores de mudanças no sistema imune ou quadro inflamatório, como os tromboxanos[18], histamina[19] e cloro-tirosina[20].

O avanço da utilização da metabolômica em trabalhos científicos, representado na Figura 1.4, mostra um perfil de evolução ao longo dos anos, confirmado pelo aumento do número de artigos científicos que a utilizam.

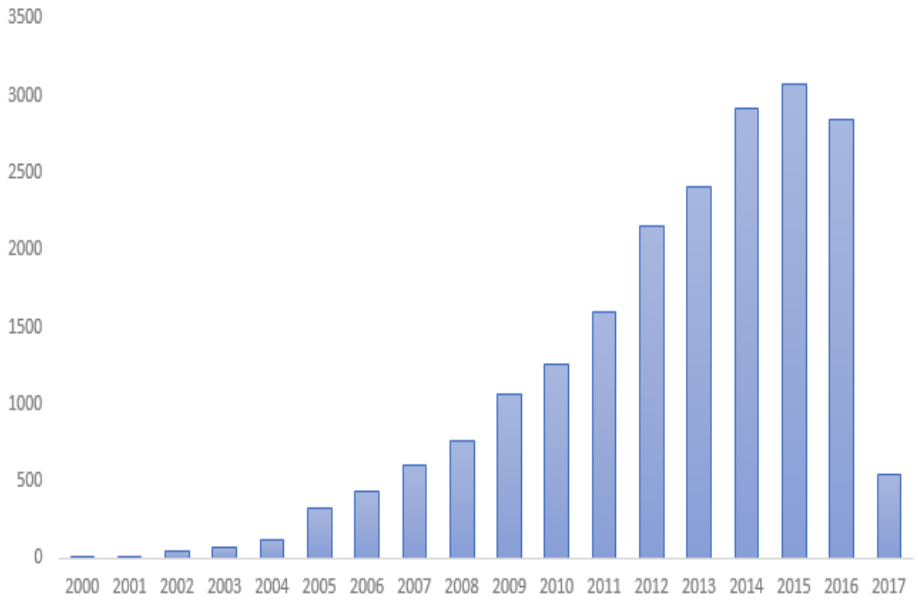


Figura 1.4. Número de publicações por ano na área de metabolômica (palavra chave *metabolomics*) entre os anos de 2000-2017. (Banco de dados: SciVerse Scopus).

17 Lindon, J.C.; Holmes, E.; Bollard, M.E.; Stanley, E.G.; Nicholson, J.K.; *Biomarkers*; **2004**, 9, 1.

18 Zhao, Y.; Katz, N.M.; Lefrak, E.A.; Foegh, M.L.; *Prostaglandins*; **1997**, 54, 881.

19 Sinclair, M.C.; Lemmi, C.A.; Moore, T.C.; *J. Surg. Res.*; **1974**, 17, 43.

20 Saude, E.J.; Lacy, P.; Musat-Marcu, S.; Mayes, D.C.; Bagu, J.; Man, S.F.; Sykes, B.D.; Moqbel, R.; *Magn. Reson. Med.*; **2004**, 52, 807.

Avanços nas técnicas de separação e identificação, além de novos *softwares* que processam mais rapidamente espectros e padrões cromatográficos, viabilizaram o desenvolvimento da metabolômica. A capacidade destas técnicas de medir rapidamente centenas de metabólitos importantes possibilitou aplicações em diversas áreas, incluindo pesquisas em plantas[21], nutrição[22], farmacêutica[23], doenças cardiovasculares[24] e transplante de órgãos[12].

Os metabólitos presentes nos fluidos corporais variam em concentração e propriedades físico-químicas, de modo que é necessária mais de uma plataforma analítica para cobrir a maior quantidade possível de metabólitos presentes. A análise do metaboloma requer o uso de várias técnicas instrumentais, uma vez que cada técnica possui limitações e vantagens em função da sensibilidade, ou do tipo de analito que pode ser identificado por uma ou outra técnica, sendo, portanto, complementares entre si.

Neste trabalho, foi selecionada a técnica de GC-MS, devido principalmente à sua robustez, resolução, sensibilidade e abrangência. Após a derivatização, tornando os produtos voláteis e termicamente estáveis, é possível analisar compostos polares, catiônicos e aniônicos, que são próprios da urina, em apenas uma análise. Além disso, o uso de bibliotecas permite a identificação de metabólitos, sem o uso de padrões analíticos dos mesmos[25].

Esta técnica pode também fornecer informações detalhadas sobre transformações estruturais de um composto metabolizado, importante para a compreensão de processos biológicos, sendo aplicada a biofluidos como o plasma ou urina, permitindo a identificação de aminoácidos, vitaminas, tióis, carboidratos e peptídeos[25].

A GC-MS é amplamente utilizada no estudo da metabolômica em análises quantitativas e qualitativas. Tais estudos datam desde a década de 70[26], devido principalmente à alta repetibilidade e robustez da técnica e à

---

21 Schauer, N.; Fernie, A.R.; *Trends. Plant. Sci.;* **2006**, 10, 508.
22 Whitfield, P.D.; German, A.J.; Noble, P.J.; *J. Nutr.*; **2004**, 92, 549.
23 Watkins, S.M.; German, J.B.; *Curr. Opin. Mol. Ther.*; **2004**, 6, 265.
24 Sabatine, M.S.; Liu, E.; Morrow, D.A.; Heller, E.; McCarroll, R.; Wiegand, R.; Berriz, G.F.; Roth, F.P.; Gerszten, R.E.; *Circulation*; **2005**, 112, 3868.
25 Wishart, D.S.; *Bioanalysis*; **2011**, 15, 769.
26 Thompson, J.A.; Markey, S.P.; *Anal. Chem.*; **1975**, 47, 1313.

disponibilidade de banco de dados com plataformas como NIST[27], Fiehnlib[28] e Golm[29], dispensando o uso de padrões. O desenvolvimento de novos computadores com melhores algoritmos para deconvolução de espectros[30] e softwares para análises estatísticas tem auxiliado nos estudos metabolômicos.

Devido à sensibilidade e alto poder de resolução da GC-MS, é possível separar e quantificar centenas de compostos voláteis e às ferramentas de tratamento de dados têm auxiliado a metabolômica na identificação de novos compostos. No entanto, um fator limitante desta técnica é o preparo de amostra, dada a necessidade de realizar derivatização dos compostos polares, tornando-os voláteis e termicamente estáveis. Adicionalmente, a amostra derivatizada em contato com a umidade pode sofrer degradação, a reação de derivatização pode ser incompleta e, com a extração e secagem da amostra, parte dos metabólitos podem ser perdidos[31].

As partes cromatográficas de CG-MS compõem-se de um reservatório de fase móvel (cilindro de gás de arraste), injetor, coluna, forno da coluna, controle de temperatura e detector. A amostra é injetada e vaporizada; o vapor é transportado pelo gás de arraste inerte por uma coluna de separação até o detector. A coluna utilizada possui dimensão capilar e os analitos vaporizados são separados devido à pressão de vapor e a interação com a fase estacionária. Antes de atingir o espectrômetro de massas, os analitos são ionizados, geralmente por ionização por elétrons (EI), o que exclui problemas de supressão iônica derivado da ionização por *electrospray* (ESI). Posteriormente, os íons são fragmentados e separados de acordo com sua razão *m/z*[32].

---

27 Babushok, V.I.; Linstrom, P.J.; Reed, J.J.; Zenkevich, I.G.; Brown, R.L.; Mallard, W.G.; Stein, S.E.; *J. Chromatogr. A*; **2007**, 1157, 414.

28 Kind, T.; Wohlgemuth, G.; Lee, do Y.; Lu, Y.; *Anal. Chem.*; **2009**, 81, 10038.

29 Kopka, J.; Schauer, N.; Krueger, S.; Birkemeyer, C.; Usadel, B.; Bergmuller, E.; Dormann, P.; Weckwerth, W.; Gibon, Y.; Stitt, M.; Willmitzer, L.; Fernie, A.R.; Steinhauser, D.; *Bioinformatics*; **2005**, 21, 1635.

30 Stein, S.E.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*; **1999**,10, 770.

31 Jonson, P.; Gullberg, J.; Nordström, A.; Kusano, M.; Kowalczyk, M.; Sjöström, M.; Moritz, T.; *Anal. Chem.*; **2004**, 76, 1738.

32 Niessen, W.; *In. Current practice of gas chromatography-mass spectrometry*. Nova Iorque: Marcel Dekker, **2001**.

O espectrômetro de massas contém 3 componentes principais: fonte de ionização, analisador de massas e o detector. Na ionização por EI, os elétrons provenientes de um filamento são projetados com uma energia de 70 eV e colidem com as moléculas. As moléculas são ionizadas formando espécies positivas. Os íons gerados na fonte de ionização passam pelo quadrupolo, um analisador composto por 4 cilindros paralelos, com variação de tensão, permitindo a separação pela razão *m/z* de cada fragmento[32].

Devido à natureza dos metabólitos presentes na urina, é essencial a etapa de derivatização. Em metabolômica, existem principalmente dois métodos utilizados: sililação e alquilação. A sililação é adequada para compostos como aldeídos, amidas, ácidos carboxílicos, aminoácidos, cetonas, entre outros[32].

O reagente mais comum utilizado é o *N*,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), contendo 10% de trimetilcloro silano (TMCS). Outro reagente é o *N*-metil-*N*-*t*-butil-dimetill-silil-trifluor-acetamida (MTB-STFA), que forma derivados menos sensíveis à hidrólise, com relação aos adutos de trimetilsilício (TMS). Ambos podem formar misturas de derivatizados parciais. O *N*-metil-*N*-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA) é também um reagente muito comum[32].

Para a derivatização por sililação é necessária remover a água da amostra, uma vez que os reagentes são sensíveis a sua presença. Assim para reduzir o número de etapas no preparo das amostras, outra alternativa é realizar a derivatização direta, em solução aquosa, seguida de extração com solvente orgânico, como é o caso do pentafluorobenzil cloroformiato e octafluoropentil cloroformiato.

As colunas de cromatografia gasosa, geralmente são capilares de diâmetro interno reduzido (*narrow bore*) com fase estacionária apolar, como por exemplo, 5% de difenil 95% polidimetil siloxano (PDMS) e a análise é conduzida com hélio como gás de arraste. A razão de *split* também é outro fator a se considerar, pois é necessário balancear entre a sensibilidade e uma menor vida útil da coluna, devido aos reagentes sililantes residuais, que podem reagir com a fase estacionária da coluna, deteriorando-a ao longo do tempo.

Segundo o estudo levantado pelo *Human Metabolome Database* (HMDB)[33], usando a urina como biofluido, foi possível caracterizar 178 compostos, sendo 88 identificados apenas por esta técnica. Diferentemente da ionização por *electrospray* (utilizada em LC-MS e CE-MS), na ionização por elétrons (utilizada em GC-MS), a energia utilizada é sempre a mesma, o que torna os espectros de massas reprodutivos. Assim, é possível a identificação dos metabólitos em banco de dados, a partir da comparação do espectro de massas e pelo índice de retenção dos compostos da biblioteca, diminuindo a influência das condições experimentais, tais como diferentes dimensões de colunas, proporções das fases estacionárias e suas seletividades.

Outros dados de retenção como banco de dados de giberilinas[34], ou óleos essenciais[35] podem ser citados. Assim, para aproximar dos problemas relacionados à metabolômica, algumas bibliotecas foram desenvolvidas com o objetivo de utilizar informações espectrais mais próximas da natureza dos metabólitos identificados, como é o caso da biblioteca FiehnLib, utilizada neste trabalho, para obtenção dos metabólitos identificados.

A biblioteca Fiehnlib é baseada no sistema de índices de retenção de metil éster de ácidos graxos e contém aproximadamente 2200 espectros de massas e índices de retenção de mais de 1000 metabólitos metoximados e trimetilsililados de diversas classes químicas[28]. Entre os metabólitos presentes na biblioteca, muitos são componentes da urina e fazem parte de importantes vias metabólicas, como aminoácidos e ácidos orgânicos.

A identificação dos compostos em metabolômica pode ser dificultada em função da complexidade dos cromatogramas e devido à coeluição de compostos. Para esta finalidade é utilizado o software AMDIS[30], que permite

---

33 Wishart, D.S.; Tzur, D.; Knox, C.; Eisner, R.; Guo, A.C.; Young, N.; Cheng, D.; Jewell, K.; Arndt, D.; Sawhney, S.; Fung, C.; Nikolai, L.; Lewis, M.; Coutouly, M.A.; Forsythe, I.; Tang, P.; Shrivastava, S.; Jeroncic, K.; Stothard, P.; Amegbey, G.; Block, D.; Hau, D.D.; Wagner, J.; Miniaci, J.; Clements, M.; Gebremedhin, M.; Guo, N.; Zhang, Y.; Duggan, G.E.; Macinnis, G.D.; Weljie, A.M.; Dowlatabadi, R.; Bamforth, F.; Clive, D.; Greiner, R.; Li, L.; Marrie, T.; Sykes, B.D.; Vogel, H.J.; Querengesser, L.; *Nucleic Acids Res.*; **2007**, 35, D521.

34 Gaskin, P.; MacMillan,J.; GS–MS of Gibberellins and Related Compounds: Methodology and a Library of spectra, University of Bristol, **1991**.

35 In Adams, R.P.; Identification of Essential Oil Components by Gas chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry, third ed., Allured, Carol Stream, IL, **2001**

realizar a deconvolução de espectros. Este software está disponível na rede e tem mostrado resultados satisfatórios, comparados a softwares comerciais[36]. A deconvolução é um processo que separa componentes coeluídos a partir dos cromatogramas de íons totais (TIC) discriminando cada espectro respectivo, onde é calculada a contribuição de cada componente. As diferenças de espectros entre os compostos permitem identificar individualmente cada componente presente no pico cromatográfico (Figura 1.5).

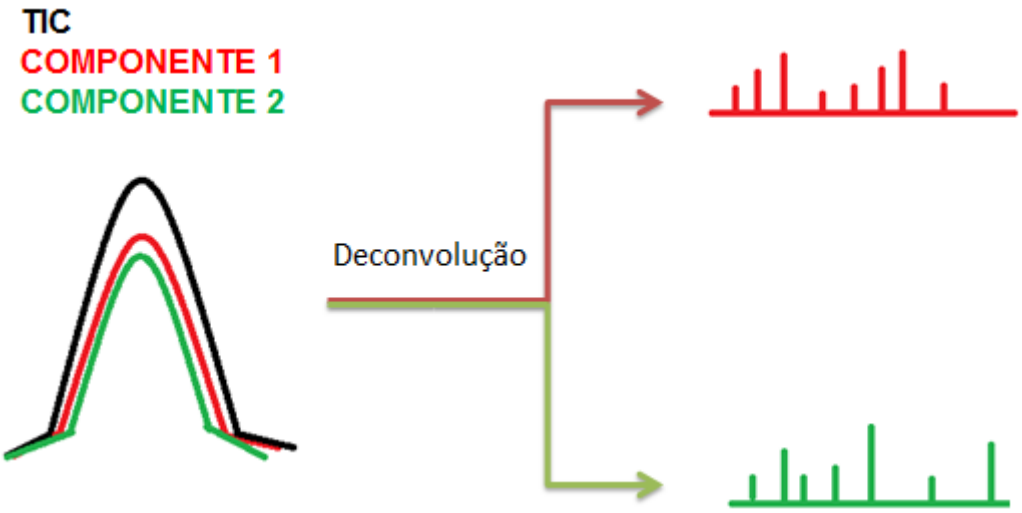


Figura 1.5. Representação simplificada da deconvolução de 2 espectros (vermelho e verde) a partir do cromatograma de íons totais (TIC, em preto).

Devido à possibilidade de identificar e quantificar centenas de compostos de maneira não destrutiva, a ressonância magnética nuclear de prótons (RMN^{1}H) tem sido utilizada em metabolômica, sendo uma técnica espectroscópica muito utilizada para identificação estrutural de compostos orgânicos, tendo como base a propriedade de spin de alguns núcleos que se alinham com o campo magnético aplicado. Quando a radiofrequência é retirada, ocorre a relaxação de spin, gerando um sinal característico[37].

Em comparação com outras técnicas, a RMN^{1}H é pouco sensível, com limite de detecção entre 10^{-9} a 10^{-11} mol L^{-1}. Entretanto, o desenvolvimento de novas tecnologias como ímãs mais fortes, sondas criogênicas, avanço nas

[36] Lu, H.M.; Dunn, W.B.; Kell, D.B.; Liang, Y.Z.; *Trends Anal. Chem.*; **2008**, 27, 215.
[37] Malet-Matino, M.; Holzgrabe, U.; *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*; **2011**, 55, 1.

sequências de pulsos, entre outras, tem aumentado grandemente o seu desempenho[38].

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de alta resolução baseada na migração de íons em solução sob um campo elétrico, que são separados de acordo com suas cargas e tamanho, em um tubo capilar. A separação baseia-se nas diferenças de migração eletroforética dos solutos em um fluxo eletrosmótico de eletrólitos sob alta tensão[39].

O modo mais simples e mais usado na metabolômica é a eletroforese capilar de zona (CZE), baseada na migração diferencial de espécies carregadas em um campo elétrico através de um meio condutor. Os custos dos acessórios são menores em relação ao HPLC, pois possui menor consumo de solventes e os capilares são mais baratos, quando comparados com as colunas[40].

O acoplamento com o espectrômetro de massas (CE-MS) combina a alta resolução de CE com a sensibilidade da detecção por MS[41]. Em metabolômica, *electrospray* (ESI) é a fonte de ionização mais utilizada e exige uma conexão elétrica adequada para uma boa interface. Existem três configurações de acoplamento entre CE e ESI: com líquido auxiliar coaxial (*coaxial sheath liquid*), com junção líquida (*liquid junction*) e sem líquido auxiliar (*sheathless*)[42].

Um problema desta técnica é a migração variável, quando são utilizados capilares de sílica fundida. As alterações da parede do capilar, solução de eletrólito ou flutuações da condição elétrica resulta em maior variação de

38 Shucha, Z.; Gowda, G.A.N.; Tao, Y.; Raftery, D.; *Analyst*; **2010**, 135, 1490.

39 Ban, E.; Park, S.H.; Kang, M.J.; Lee, H.J.; Song, E.J.; Yoo, Y.S.; *Electrophoresis*, **2012**, 33, 2.

40 Monton, M.R.N.; Soga, T.; *J. Chromatogr.A*; **2007**, 1168, 237.

41 Rodrigues, K. T.; Cieslarová, Z.; Tavares, M. F. M.; Simionato, A. V. C.. Strategies Involving Mass Spectrometry Combined with Capillary Electrophoresis in Metabolomics. In: Alessandra Sussulini. (Org.). Advances in Experimental Medicine and Biology. 1ed.: Springer International Publishing, 2017, v. , p. 99-141.

42 Maxwell, E.J.; Chen, D.D.Y.; *Anal. Chim. Acta*; **2008**, 627, 25.

migração, perdendo a reprodutibilidade quando comparada com outras técnicas de separação como HPLC ou GC[43].

A HPLC é adequada para metabolômica na separação de moléculas polares e íons como aminoácidos, nucleotídeos e peptídeos sem a necessidade de um longo preparo ou quantidade de amostra e com tempo de análise relativamente curto[44]. O acoplamento com o espectrômetro de massas de alta resolução (HPLC-MS) gera métodos mais sensíveis, com uma boa capacidade de identificação de metabólitos. A coluna usada com mais frequência contém sílica modificada por C18, constituindo o modo de fase reversa (RP). Neste caso, a fase estacionária é apolar, e a fase móvel é uma mistura polar de um ou mais solventes orgânicos e água, ou um tampão[45].

No caso de amostras de urina, existe uma grande quantidade de moléculas altamente polares que não são retidas quando usada coluna em fase reversa. Uma alternativa é a utilização da cromatografia líquida por interação hidrofílica (HILIC) para separação de metabólitos mais polares[46], que é complementar à cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) e semelhante à de fase normal (NPLC), com a vantagem da utilização de solventes que são compatíveis com o espectrômetro de massas, como a acetonitrila.

Gradientes típicos usados para HILIC consistem em misturas de solventes orgânicos (50-95%) e água ou um tampão[47,48]. Um solvente comumente usado é a acetonitrila, pois este garante picos menos alargados quando comparado com o metanol e o fato de ser um solvente aprótico e menos polar, a sua força cromatográfica é menor e o analito é mais retido na coluna.

A Tabela 1.1 apresenta algumas vantagens e desvantagens das técnicas analíticas apresentadas.

---

43 Nevedomskaya, E.; Ramautar, R.; Derks, R.; Westbroek, I.; Van der Pluijm, G.I.; Deelder, A.M.; Mayboroda, O.A.; *J. Proteome Res.*; **2010**, 9, 4869.

44 Ramautar, R.; Mayboroda, O.A.; Somsen, G.W.; de Jong, G.J.; *Electrophoresis*; **2011**, 32, 52.

45 Nguyen, H.P.; Schug, K.A.; *J. Sep. Sci.*; **2008**, 31, 1465.

46 Aihua, Z.; Hui, S.; Ping, W.; Ying, H.; Xijun, W.; *Analyst*; **2012**, 137, 293.

47 Yoshida, T.; *J. Biochem. Biophys. Methods*; **2004**, 60, 265.

48 Churms, S. C.; *J. Chromatogr. A*; **1996**, 720, 75.

Tabela 1.1. Vantagens e desvantagens das técnicas analíticas mais comuns utilizadas em metabolômica.

Técnica analítica	Vantagens	Desvantagens
RMN-^{1}H	• Tempo de análise curto • Informações estruturais • Preparo de amostra relativamente simples • Robustez e repetibilidade	• Baixa sensibilidade • Complexidade do tratamento de dados • Quantificação absoluta
GC-MS	• Resolução • Sensibilidade • Robustez • Disponibilidade de bibliotecas que auxiliam na identificação estrutural • Pode ser realizada com espectrômetro de massas de baixa resolução	• Derivatização • Etapas de preparo de amostra
LC-MS	• Versatilidade • Sensibilidade	• Efeito de matriz • Formação de adutos • Necessidade de acoplamento com espectrômetro de massas de alta resolução em abordagem *untargeted*
CE-MS	• Alta resolução • Pequena quantidade de amostra • Rapidez de análise	• Repetibilidade dos tempos de migração

Os dados obtidos a partir dos equipamentos utilizados na análise dos metabólitos são gravados e exportados em formatos NetCDF, mzXML, mzData, entre outros, que permitem serem lidos em softwares de tratamentos de dados. Estes arquivos são então processados antes de realizar alguma análise multivariada, cuja etapa pode ser denominada de pré-tratamento. Os dados

gerados por análise metabolômica são muito complexos e por isso um pré-tratamento de dados deve ser realizado, constituindo a etapa inicial do manuseio dos dados e tem como objetivo obter informações precisas e relevantes a partir das medidas obtidas de cada amostra, facilitando a sua interpretação[49]. Para isto são realizadas algumas operações como filtragem e detecção de picos, alinhamento dos tempos de retenção e normalização, para dados de espectrometria de massas (Figura 1.6).

Figura 1.6. Etapas de tratamento de dados para espectrometria de massas.

Existem diversas ferramentas para processamento de dados e a maioria destas inclui procedimentos para remoção de ruído, detecção de picos, alinhamento e normalização. Entre as plataformas para pré-processamento de dados de espectrometria de massas (hifenado) podem ser citadas MZmine[50], MAthDAMP[51], metAlign[52], MSFacts[53], XCMS[54], MeltDB[55] ou softwares comerciais como MS Resolver[56] e MarkerLynx[57]. Neste trabalho foi utilizado o XCMS.

---

49 Boccard, J.; Veuthey, J-L; Rudaz, S.; *J. Sep. Sci.*; **2010**, 33, 290.

50 Katajamaa, M.; Oresic, M.; *Biomed. Chromatogr. Bioinformatics*; **2005**, 6, 179.

51 Baran, R.; Kochi, H.; Saito, N.; Suematsu, M.; Soga, T.; Nishioka, T.; Robert, M.; Tomita, M.; *Biomed Chromatogr. Bioinformatics*; **2006**, 7, 530.

52 Vorst, O.; De Vos, C. H. R.; Lommen, A.; Staps, R. V.; Visser, R. G. F.; Bino, R. J.; Hall, R. D.; *Metabolomics*; **2005**, 1, 16.

53 Duran, A. L.; Yang, J.; Wang, L.; Sumner, L. W.; *Bioinformatics*; **2003**, 19, 2283.

54 Smith, C. A.; Want, E. J.; O'Maille, G.; Abagyan, R.; Siuzdak, G.; *Anal. Chem.*; **2006**, 78, 779.

55 Neuweger, H.; Albaum, S. P.; Dondrup, M.; Persicke, M.; Watt, T.; Niehaus, K.; Stoye, J.; Goesmann, A.; *Bioinformatics*; **2008**, 24, 2726.

56 Idborg-Björkman, H.; Edlund, P. O.; Kvalheim, O. M.; Schuppe-Koistinen, I.; Jacobsson, S. P.; *Anal. Chem.*; **2003**, 75, 4784.

57 Lenz, E. M.; Bright, J.; Knight, R.; Westwood, F. R.; Davies, D.; Major, H.; Wilson, I. D.; *Biomarkers*; **2005**, 10, 173.

O XCMS[57] é um pacote desenvolvido em linguagem de programação R (www.r-project.org) e disponibilizado pelo Bioconductor Project (http://www.bioconductor.org/) e fornece classes para armazenamento dos dados brutos (xcmsRaw) e processamento de dados (xcmsSet). Ao final do processamento de dados, uma tabela com valores de *m/z*, intensidade e tempo de retenção é obtida e, a partir dessa tabela, pode-se realizar testes estatísticos multivariados e univariados.

Em metabolômica são utilizados métodos multivariados que empregam covariância ou correlações, que refletem a relação entre as variáveis. A utilização de métodos multivariados permite reduzir o número de dimensões e discriminar dois grupos, mostrando as diferenças estatisticamente significativas.

A análise de componentes principais (PCA) é um método não supervisionado, ou seja, não contém informação sobre os grupos que estão sob análise, e resulta na projeção dos dados originais em um espaço dimensional menor, capturando tanto quanto possível a variação observada, gerando um conjunto de combinações lineares a partir dos dados originais, denominados de componente principal (PC). A primeira componente principal (PC1) relaciona-se com a maior variabilidade das amostras. Os gráficos de PCA fornecem dados de agrupamento de amostras, da presença de *outliers*, da separação de amostras em grupos e quais variáveis são responsáveis por essa separação, o que pode ser visualizado com gráficos de *scores*. Os gráficos de *loadings* mostram o peso de quanto cada variável contribui[58].

Esta é geralmente a primeira etapa na análise dos dados metabolômicos, Figura 1.7.

[58] Trygg, J.; Holmes, E.; Lundstedt, T.; *J. Proteome Res.*; **2007**, 2, 469.

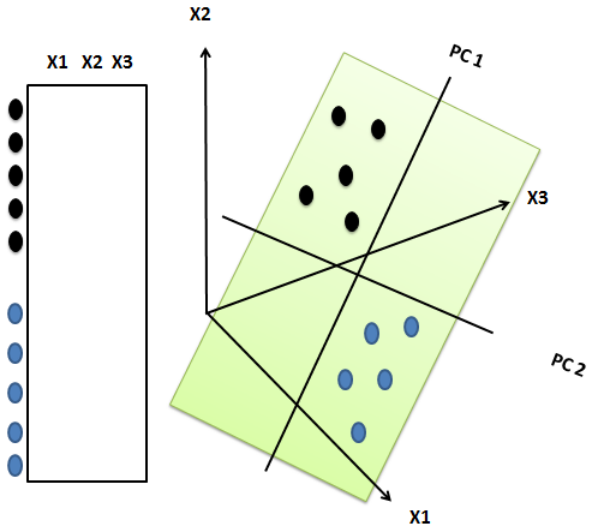


Figura 1.7. Visualização de dados por PCA (adaptado da referência[61]).

De forma análoga, o PLS[61] tem como objetivo descrever um conjunto de variáveis medidas em um conjunto geralmente menor de indivíduos em uma forma mais condensada, projetando os dados em um espaço dimensional menor. No entanto, a informação adicional sobre a relação entre as variáveis dependentes e independentes é incluída na análise. Sendo assim, ao contrário do PCA, PLS é uma técnica supervisionada (Figura 1.8).

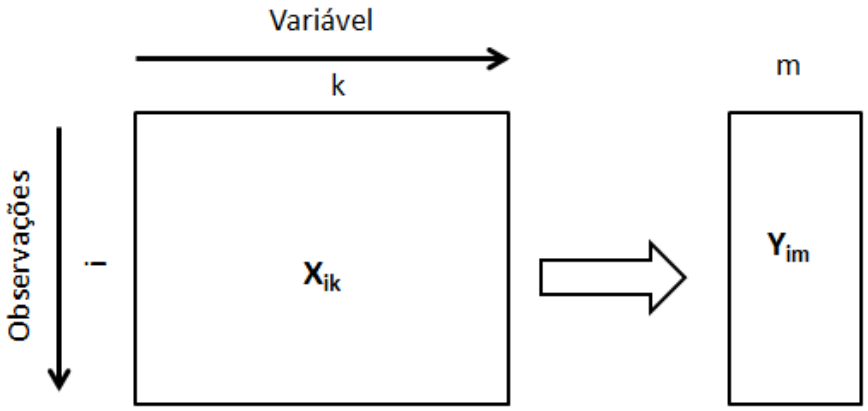


Figura 1.8. Gráfico de PLS. Relação quantitativa entre a matriz de dados experimentais X_{ik} com i valores de cada amostra k e a matriz Y que contém os m valores quantitativos.

Se a variável dependente é uma variável categórica, a variante que atinge o PLS é chamada de análise PLS-discriminante (PLS-DA)[59], ou com projeção ortogonal (OPLS-DA) para identificação dos metabólitos discriminadores candidatos[60,61].

A última etapa no trabalho da metabolômica consiste na identificação dos metabólitos. Existem atualmente diversos bancos de dados, que tem se expandido em número desde a década de 90, devido ao aumento do número de genomas sequenciados e de ferramentas de bioinformática existentes[62]. Entre estes bancos de dados, podem ser destacados o MetaCyc[63] e o KEGG[64], que fornecem dados genômicos em associação com dados metabólicos. Podem ser citados também os seguintes bancos de dados: HMDB[33] (Human Metabolome Database), PubChem[65], Metlin[66], MassBank[67], LIPID MAPS[68], ChEBI (*Chemical Entities of Biological Interest*)[69], MMD (*Manchester Metabolomics Database*)[70], BioMagResBank[71], MetaboID[72], entre outros.

---

59 Saccenti, E.; Hoefsloot, H.C.J.; Smilde, S.K.; Westerhuis, J.A.; Hendriks, M.M.W.B.; *Metabolomics*; **2014**, 10, 361.

60 Wiklund, S.; Johansson, E.; Sjöström, L.; Mellerowicz, E.J.; Edlund, U.; Shockcor, J.P.; Gottfries, J.; Moritz, T.; Trygg, J.; *Anal. Chem.*; **2008**, 80, 115.

61 Rubingh, C.M.; Bijlsma, S.; Derks, E.P.P.A.; Bobeldijk, I.; Verheij, E.R.; Kochhar, S.; Smilde, A.K.; *Metabolomics*; **2006**, 2, 53.

62 Karp, P.D.; Caspi, R.; *Arch. Toxicol.*; **2011**, 85, 1015.

63 Caspi, R.; Altman, T.; Dreher, K.; Fulcher, C.A.; Subhraveti, P.; Keseler, I.M.; Kothari, A.; Krummenacker, M.; Latendresse, M.; Mueller, L.A.; Ong, Q.; Paley, S.; Pujar, A.; Shearer, A.G.; Travers, M.; Weerasinghe, D.; Zhang, P.; Karp, P.D.; *Nucleic Acids Res.*; **2012**, 40, D742.

64 Kanehisa, M.; Goto, S.; Hattori, M.; Aoki-Kinoshita, K. F.; Itoh, M.; Kawashima, S.; Katayama, T.; Araki, M.; Hirakawa, M.; *Nucleic Acids Res.;* **2006**, 34, D354

65 Wang, Y.; Xiao, J.; Suzek, T. O.; Zhang, J.; Wang, J.; Bryant, S.H.; *Nucleic Acids Res.*; **2009**, 37, W623.

66 Tautenhahn, R.; Cho, K.; Uritboonthai, W.; Zhu, Z.J.; Patti, G.J.; Siuzdak, G.; *Nat Biotechnol*.; **2012**, 30, 826.

67 Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M.Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.; Maoka, T.; Takahashi, H.; Ara, T.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Shibata, D.; Neumann, S.; Lida, T.; Tanaka, K.; Funatsu, K.; Matsuura, F.; Soga, T.; Taguchi, R.; Saito, K.; Nishioka, T.; *J. Mass Spectrom.*; **2010**, 45, 703.

68 Fahy, E.; Sud, M.; Cotter, D.; Subramaniam, S.; *Nucleic Acids Res*.; **2007**, 35, W606.

69 Degtyarenko, K.; de Matos, P.; Ennis, M.; Hastings, J.; Zbinden, M.; McNaught, A.; Alcántara, R.; Darsow, M.; Guedj, M.; Ashburne, M.; *Nucleic Acids Res.;* **2008**, 36, D344.

70 Brown, M.; Dunn, W.B.; Dobson, P.; Patel, Y.; Winder, C.L.; Francis-McIntyre, S.; Begley, P.; Carroll, K.; Broadhurst, D.; Tseng, A.; Swainston, N.; Spasic, I.; Goodacrebc, R.; Kell, D.B.; *Analyst*; **2009**, 134, 1322.

O banco de dados do HMDB[33] destaca-se por ser um dos mais completos em termos de informação sobre metabólitos em biofluidos, com cerca de 40000 metabólitos, e possui informações de outros bancos de dados sobre vias bioquímicas, como KEGG e PubChem, por exemplo. Estes dois bancos de dados citados disponibilizam informações em todos os níveis "ômicos" das vias metabólicas em um sistema biológico.

1.2 Aplicações da metabolômica em transplante de rim

O rim é um órgão cuja função é remover produtos derivados do metabolismo endógeno ou de xenobióticos, realizar funções homeostáticas, tais como a regulação de eletrólitos, manutenção do equilíbrio ácido-base, e regulação da pressão arterial, além de ser um órgão endócrino, sintetizando e secretando diversos hormônios[73].

Anatomicamente pode ser dividido em três regiões: o córtex, medula e a pelve renal. O córtex é a camada exterior e contêm os néfrons, unidades de filtragem de compostos pelo túbulo renal e o glomérulo, vasos capilares, principal local de filtragem do sangue. A medula é a camada média, que contém as pirâmides renais (coletores de urina). A pelve renal é a região do interior do rim e contém as cavidades denominadas cálices renais maiores e menores. O cálice renal menor recebe a urina da medula sendo recolhida pelo cálice maior e direcionada pelo ureter [74]. As regiões anatômicas do rim podem ser visualizadas na Figura 1.9.

---

71 Ulrich, E.L.; Akutsu, H.; Doreleijers, J.F.; Harano, Y.; Ioannidis, Y.E.; Lin, J.; Livny, M.; Mading, S.; Maziuk, D.; Miller, Z.; Nakatani, E.; Schulte, C. F.; Tolmie, D.E.; Wenger, R.K.; Yao, H.; Markley, J.L.; *Nucleic Acids Res.*; **2008**, 36, D402.

72 MacKinnon, N.; Somashekar, B.S.;Tripathi, P.; Ge, W.; Rajendiran, T.M.; Chinnaiyan, A.M.; Ramamoorthy, A.; *J. Magn. Reson.*; **2013**, 226, 93.

73 Stenlund, H.; Madsen, R.; Vivi, A.; Calderisi, M.; Lundstedt, T.; Tassini, M.; Carmellini, M.; Trygg; *J. Chemom. Intell. Lab. Syst.*; **2009**, 98, 45.

74 Niemann, C.U.; Serkova, N.J.; *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.*; **2007**, 4, 527.

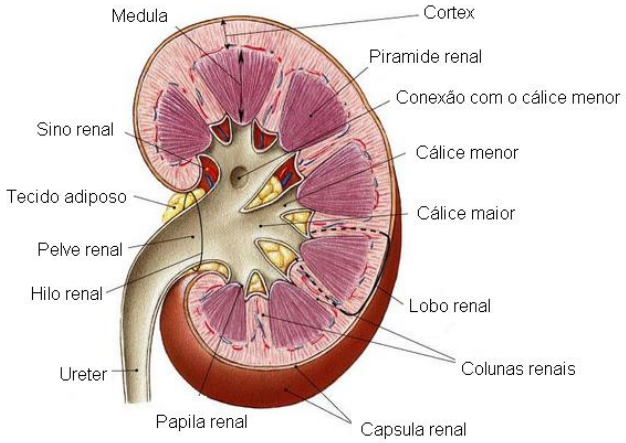


Figura 1.9. Rim e suas regiões anatômicas (modificado de http://www.aokainc.com/human-body-anatomy-kidney/, acessado em 10/06/2014).

O metabolismo renal varia de acordo com a região anatômica[21] e pode ser explicado pela distribuição diferencial das enzimas neste órgão. Os túbulos proximais contêm a maioria das enzimas oxidativas e antioxidantes. As enzimas glicolíticas e transportadores de osmólitos estão presentes principalmente no néfron inferior (loop de Henle e duto coletor) devido à diminuição de oxigênio e ao aumento na osmolaridade da medula e papila.

Garrod *et al.* (1999)[75] mostraram a partir de estudos de RMN^{1}H que o córtex contém altos níveis de aminoácidos livres, ácidos orgânicos, colina, glicose e trimetil *N*-óxido (TMAO), além de altas quantidades de triglicerídeos e fosfolipídios. A medula utiliza para o seu metabolismo a glicose, lactato e hidroxibutirato, além de osmólitos orgânicos como betaína, sorbitol, glicerofosforilcolina e *mio* inositol [21].

A funcionalidade dos rins pode ser avaliada pela taxa de filtração glomerular (GFR), cujos valores são constantes em um indivíduo, mas podem variar conforme a idade, sexo e altura[76].

Como a GFR não pode ser calculada diretamente usa-se o valor de depuração de um marcador, como a creatinina. A sua concentração no sangue, usada como estimativa, pode ser usada para o cálculo de GFR em fórmulas,

[75] Garrod, S.; Humpfer, E.; Spraul, M.; Connor, S.C.; Polley, S.; Connelly, J.; Lindon, J.C.; *Magn. Reson. Med.*; **1999**, 41, 1108.

[76] Stevens, L.A.; Levey, A.S.; *Med. Clin. N. Am.*; **2005**, 89, 457.

como a equação de Cockcroft-Gault[77] e a Fórmula de Modificação da Dieta na Doença Renal (MDRD) [78].

O transplante renal é realizado quando o paciente está em estágio de falência renal[79]. A remoção do rim no transplante interrompe o fornecimento de sangue por um período de tempo (tempo de isquemia), que se for muito longo pode danificar seriamente os rins [80]. Os tecidos também podem ser danificados pelo processo de reoxigenação ou reperfusão, que ocorre no retorno do sangue fornecido ao órgão após tempo prolongado da isquemia. A ausência de oxigenação resulta na inflamação causada por células brancas do sangue, proteínas inflamatórias e radicais livres[14].

Em 1954 foi registrado o primeiro transplante renal, entre dois irmãos gêmeos idênticos, não necessitando o uso de imunossupressão. Outro marco na história do transplante foi o ano de 1959, quando foi utilizada a 6-mercaptopurina como imunossupressor. Um pouco depois, no ano de 1962, foi relatado o primeiro transplante de rim proveniente de um doador falecido. Apesar da ocorrência de alguns transplantes bem-sucedidos, antes da década de 80, a taxa de rejeição era de aproximadamente 80% e de mortalidade era de aproximadamente 60%[81]. Por volta da década de 80, a introdução da ciclosporina após o transplante de órgãos foi um grande avanço para a clínica, representando um marco no transplante, com taxas de sobrevivência de mais de 80%. Posteriormente, novos medicamentos foram introduzidos.

O pós-transplante exige um tratamento medicamentoso por meio de imunossupressores, que apesar de terem sua segurança e eficácia comprovadas, apresentam respostas imunes, toxicidade e outras complicações que representam uma ameaça real para o paciente e o enxerto renal[82], além do risco de aumento de fatores como pressão alta, colesterol e desenvolvimento de diabetes.

---

77 Cockcroft, D.; Gault, M.; *Nepfron.*; **1976**, 16,31.

78 Levey, A.S.; Bosh, J.P.; Lewis, J.B.; Greene, T.; Rogers, N.; Roth, D.; *Ann Intern Med*; **1999**, 130, 461.

79 Wolfe, R.A.; Ashby, V.B.; Milford, E.L.; Ojo, A.O.; Ettenger, R.E.; Agodoa, L.Y.; Held, P.J.; Port, F.K.; *N. Engl. J. Med.*; **1999**, 341, 1725.

80 Wishart, D.S.; *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*; **2006**, 15, 637.

81 Zand, M.S.; *Semin. Dial.*; **2005**, 18, 511.

82 Bohra, R.; Klepacki, J.; Klawitter, J.; Thurman; J.M.; Christians, U.; *Transpl Int.*; **2013,** 26, 225.

Agentes imunossupressores atuais podem ser classificados em cinco categorias[83]: agentes de ligação a imunofilinas (ciclosporina, tacrolimo), inibidores do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (sirolimo, everolimo), agentes antiproliferativos (azatioprina, micofenolato de mofetila), anticorpos (globulinas antilinfocitários e antitimócito, basiliximab, daclizumab) e corticosteróides, que constituem a base da terapia imunossupressora após o transplante renal e são eficazes na prevenção da rejeição aguda.

A combinação destes imunossupressores pode minimizar a toxicidade, reforçando a necessidade de um estudo metabolômico a fim de comparar as diferenças entre as terapias, fornecendo um subsídio para avaliar o quadro clínico de um paciente[84].

O Everolimo (Figura 1.10.a) é um análogo sintético do Sirolimo com propriedades imunossupressoras e toxicológicas equivalentes. Este fármaco liga-se a uma imunofilina denominada proteína de ligação FK506 (FKBP12) formando um complexo everolimo-FKBP12, que inibe a proteína mTORC1 levando à ativação da quinase AKT, que inibe processos de sinalização celular[85]. Este mecanismo de atuação está ilustrado na Figura 1.11.

83 Hardinger, K. L.; Koch, M. J.; Brennan, D. C.; *Pharmacotherapy*; **2004**, 24, 1159.
84 Kuypers, D.R.; *Ann. Transplant*; **2008**, 13, 11.
85 Garnock-Jones, K.P.; Keating, G.M.; *Drugs*; **2009**, 69, 2115

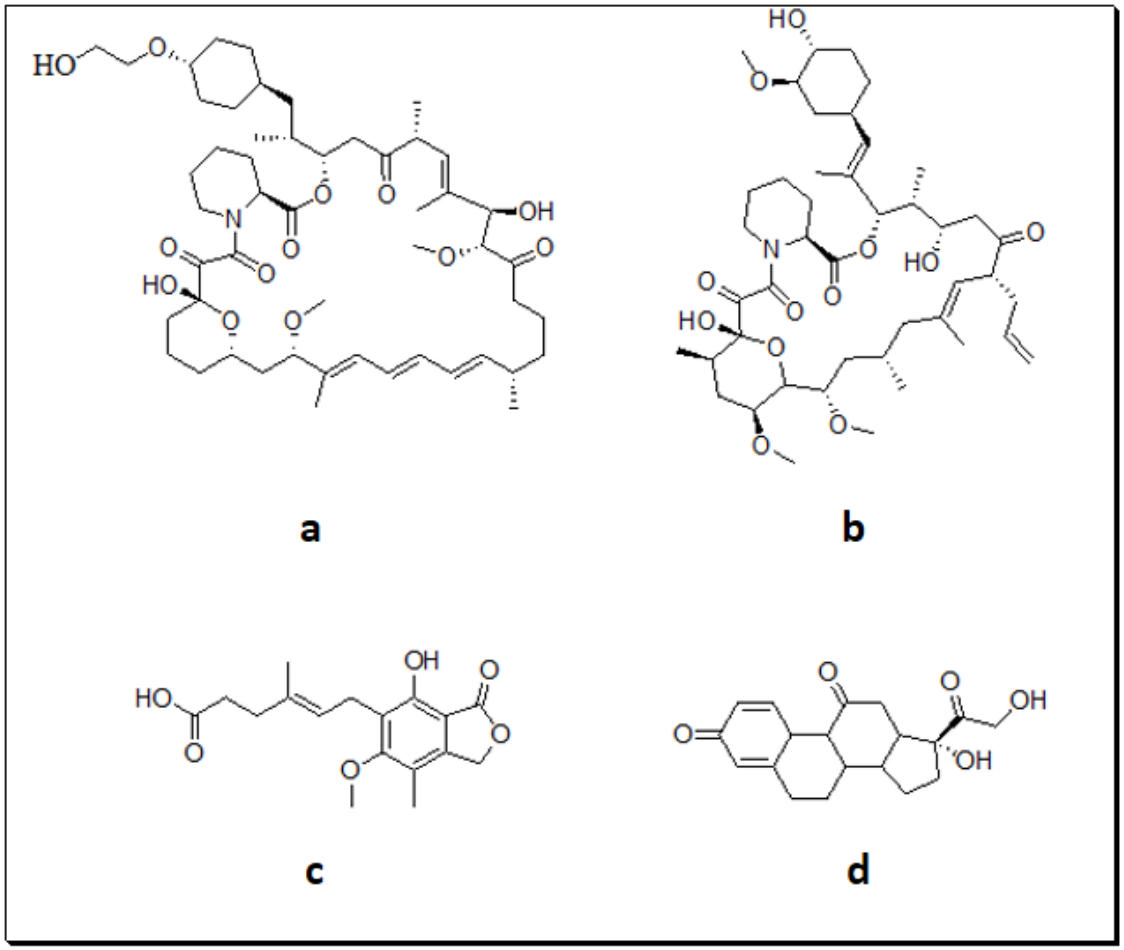


Figura 1.10. Estrutura do **a.** everolimo; **b.** tacrolimo; **c.** ácido microfenólico; **d.** prednisona.

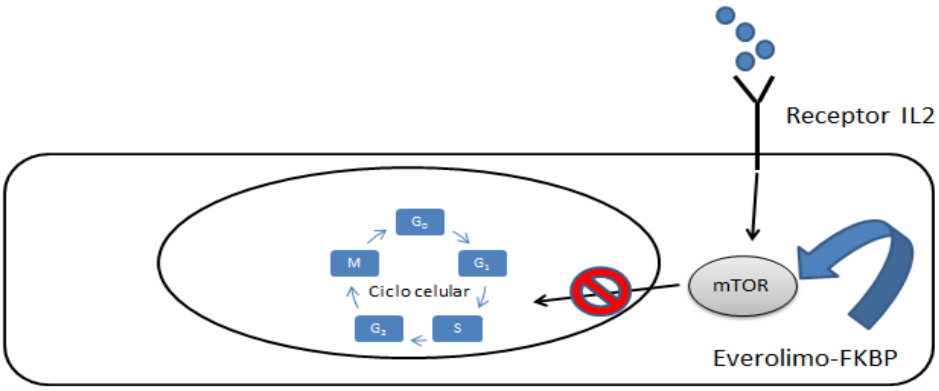


Figura 1.11. Mecanismo de ação do Everolimo.

O Tacrolimo (Figura 1.10.b), assim como o Everolimo, ligam-se ao receptor FKBP formando um complexo que inibe a calcineurina, uma fosfatase

que ativa as células T do sistema imune (ou linfócitos T)[86]. Os inibidores de calcineurina são metabolizados por duas variantes de citrocromo P450, denominadas CYP3A4 e CYP3A5, que quando apresentam polimorfismos, levam a disfunções metabólicas com consequências na saúde do paciente e na funcionalidade do órgão[87]. De forma análoga à ciclosporina, o tacrolimo induz stress oxidativo[88].

Micofenolato mofetil[89] é um agente antiproliferativo, pró-droga na forma morfolino-etilester do ácido micofenólico (Figura 1.10.c).

Este fármaco é um inibidor não competitivo da inosina monofosfato desidrogenase (tipo 2), envolvida na biossíntese de nucleotídeos guanosina dentro dos linfócitos, inibindo a proliferação dos linfócitos B e T (Figura 1.12).

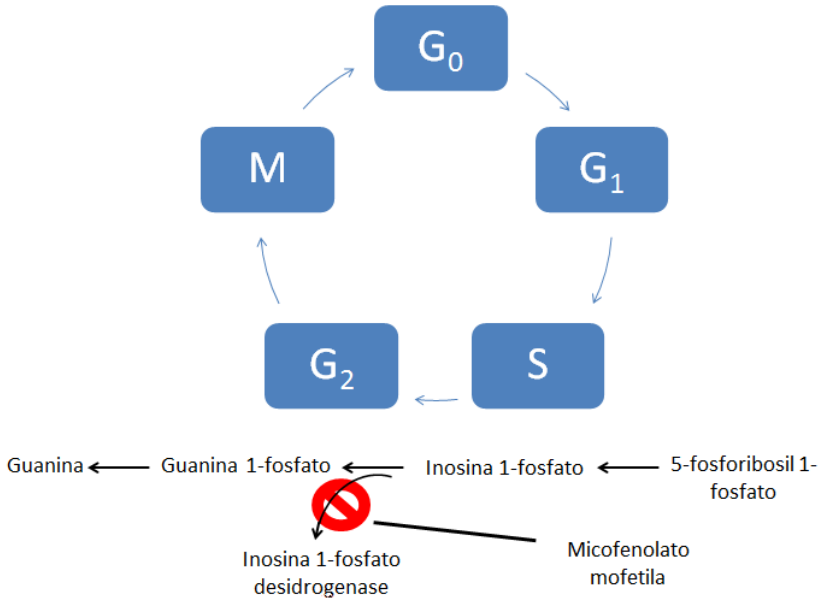


Figura 1.12. Mecanismo de ação do micofenolato mofetila.

A prednisona[90] é um fármaco glicocorticóide com atividade anti-inflamatória, convertida em prednisolona no fígado, Figura 1.10.d. A

86 Schreiber, S.L.; Crabtree, G.R.; *Immunol. Today*; **1992**, 13,136.
87 Thrvet, E.; Legendre, C.; Beaune, P.; Anglicheau, D.; *Pharmacogenomics*; **2005**, 6, 37.
88 Han, S.Y.; Mun, K.C.; Choi, H.J.; Kwak, C.S.; Bae, J.H.; Suh, S.I.; Park, S.B.; Kim, H.C.; Chang, E.J.; *Transplant Proc.*; **2006**, 38, 2240.
89 Fulton, B.; Markham, A.; *Drugs*.; **1996**, 51, 278.

prednisolona atravessa a membrana celular e liga-se aos receptores específicos, inibindo a infiltração de linfócitos no local da inflamação. A ação antiinflamatória envolve as proteínas fosfolipase A2 que controlam a biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos.

Alterações no perfil lipídico não foram evidenciadas quando comparados dois regimes imunossupressores com tacrolimo/micofenolato mofetila e corticosteróide e tacrolimo/corticosteróide, sem micofenolato mofetila[91]. Por outro lado existem vários efeitos colaterais associados, tais como pressão arterial elevada, diarréia, leucopenia, entre outros, que aumentam o risco cardiovascular e até mesmo a mortalidade.[92]

A ação dos imunossupressores utilizados em nosso estudo podem ser visualizados na Figura 1.13.

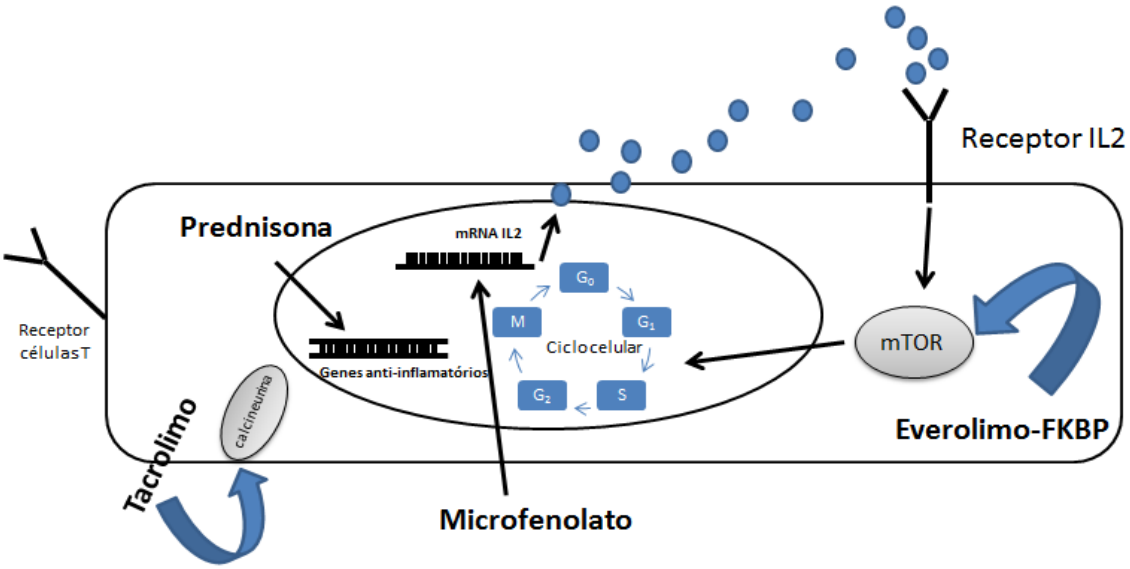


Figura 1.13. Visualização da ação dos imunossupressores utilizados neste estudo.

Apesar da eficácia, esses regimes imunossupressores apresentam alguns efeitos adversos característicos inerentes ao mecanismo de ação dos fármacos. Até agora, a maioria dos estudos relacionados com a metabolômica em transplante de órgãos tem se baseado na disfunção renal e lesão de

90 Bergmann, T. K.; Barraclough, K. A.; Lee, K. J.; Staatz, C. E; *Clinical Pharmacokinetics*; **2012**, 51, 711.

91 Squifflet, J-P; Vanrenterghem, Y.; van Hooff, J.P.; Salmela, K.; Rigotti, P.; *Transplant. Proc.;* **2002**, 34, 1584.

92 Bobadilla, N.A.; Gamba, G.; *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*; **2007**, 293, F2.

isquemia e reperfusão do enxerto, e estudos identificaram biomarcadores associados com as lesões dos órgãos dos doadores, rejeição e disfunção renal[93]. Klawitter *et al.* (2009)[94] sugeriram que as mudanças nos padrões dos metabólitos na urina refletem os efeitos dos imunossupressores sobre os rins e por isso tem sido utilizada para investigar a influência dos imunosupressores no transplante renal e para detectar doenças metabólicas inatas.

Com relação à nefrotoxicidade dos imunossupressores, podem ser indicadas 4 grandes perturbações bioquímicas: evidência metabólica direta de excreção anormal de metabólitos endógenos, perturbação na osmolaridade renal, desregulação dos níveis de glicose, ácidos graxos e corpos cetônicos e stress oxidativo. Alterações nas concentrações de certos metabólitos refletem alterações na viabilidade das células (apoptose), nos níveis de oxigenação (anoxia, isquemia, stress oxidativo), pH e homeostasia[95].

O monitoramento dos transplantes de rim depende dos níveis de creatinina, da produção total de urina e da pressão arterial. Apesar de identificar a disfunção renal, esses testes não são suficientemente seletivos para determinar a causa das dificuldades de funcionamento, podendo ser uma infecção ou hipertensão, e não uma rejeição. Portanto, não é possível uma intervenção adequada e oportuna. Em tais casos, são necessárias biópsias invasivas e o diagnóstico definitivo é demorado[96]. Neste sentido, a metabolômica é uma ferramenta valiosa, uma vez que viabiliza um estudo de identificação e quantificação de novos metabólitos que podem, individualmente ou em combinação, auxiliar no fornecimento de um diagnóstico mais preciso do quadro clínico do paciente.

---

93 Foxall, P.J.; Mellotte, G.J.; Bending, M.R.; Lindon, J.C.; Nicholson, J.K.; *Kidney Int*; **1993**; 43, 234.

94 Klawitter, J.; Bendrick-Peart, J.; Rudolph, B.; Beckey, V.; Klawitter, J.; Haschke, M.; Rivard, C.; Chan, L.; Leibfritz, D.; Christians, U.; Schmitz, V.; *Chem. Res. Toxicol.*; **2009**, 22, 118.

95 Oberholzer, J.; Testa, G.; Sankary, H.; John, E.; Thielke, J.; Benedetti, E.; *Clin Transpl.*; **2004**,143.

96 Goldsmith, P.; Fenton, H.; Morris-Stiff, G.; Ahmad, N.; Fisher, J.; Prasad, R.; *J. Surg. Res.*; **2010**, 160, 122.

A disfunção renal está associada com um elevado nível sérico de inibidores de óxido nítrico sintase como ácido fenil-acético[97] e dimetil-arginina[98]. Níveis reduzidos de óxido nítrico estão correlacionados com hipertensão e complicações cardiovasculares, diminuindo a função renal. Rins danificados também parecem elevar rapidamente os níveis séricos e urinários de lactato, acetato, succinato, citrato e ureia, que são geralmente considerados como marcadores do ciclo de Krebs[93].

Em um estudo mais abrangente, envolvendo proteômica, metabolômica, histomorfologia, parâmetros de função plasmática, taxas de filtração glomerular e isoprostanas (indicador de stress oxidativo) foi demonstrado um aumento na expressão da enzima aminoacilase no rim e superregulação da piruvato desidrogenase e frutose-1,6-bifosfatase e uma diminuição da arginina/glicina amidinotransferase. Ratos tratados com ciclosporina apresentaram danos nos túbulos, que aumentou com o tratamento com sirolimo[99].

Os padrões urinários de pacientes submetidos a terapias de combinação de fármacos inibidores de calcineurina variaram com o tempo. No entanto, o estudo comparativo de grupos tratados com ciclosporina e tacrolimo não foi conclusivo com relação às diferenças significativas entre os dois regimes. Ambos possuem propriedades similares, na alteração da hemodinâmica renal, hipercalemia, entre outros[100].

São descritas na literatura metodologias de RMN^{1}H e HPLC-MS[101] para monitorar concentrações de imunossupressores como o micofenolato de mofetila e sua forma farmacologicamente ativa, ácido micofenólico, metabolizado como ácido micofenólico glucuronídeo. Como o seu modo de

---

97 Jankowski, J.; van der Giet, M.; Jankowski, V.; Schmidt, S.; Hemeier, M.; Mahn, B.; Giebing, G.; Tolle, M.; Luftmann, H.; Schluter, H.; Zidek, W.; Tepel, M.; *J. Clin. Invest.*; **2003**, 112, 256.

98 Zoccali, C.; Kielstein, J.T.; *Curr Opin Nephrol Hypertens*; **2006**; 15, 314.

99 Klawitter, J.; Kushner, E.; Jonscher, K.; Peart, J.P.; Leibfritz, B.; Christians, U.; Schmitz, V.; *J. Proteome Res.*; **2010**, 9, 865.

100 Diémé, B.; Halimi, J.M.; Emond, P.; Büchler, M.; Nadal-Desbarat, L.; Blasco, H.; Le Guellec, C.; *Transplantation*; **2014**, 98, 195.

101 Vollenbroeker, B.; Koch, J.H.; Fobker, M.; Suwelack, B.; Hohage, H.; Müller, U.; *Transplant Proc.*; **2005**, 37, 4, 1741.

ação difere da ciclosporina A, Tacrolimo e Sirolimo, podem ser co-prescritos como parte de um regime de múltiplos medicamentos[102].

Nosso trabalho parte da hipótese que o regime de diferentes imunossupressores pode afetar vias metabólicas diferentes e podem ser analisadas pela metabolômica. As mudanças metabólicas ocorridas após o transplante de rim possibilitam comparar em nível molecular aumento ou diminuição de determinados metabólitos que podem ser identificados usando as técnicas analíticas e tratamentos estatísticos adequados.

Um estudo semelhante realizou uma abordagem *untargeted* por GC-MS de urina de pacientes submetidos a transplante renal e que receberam tacrolimo ou ciclosporina. Foi observada uma variação nos padrões metabólicos ao longo do tempo e os principais metabólitos diferenciadores foram açúcares, inositol e ácido hipúrico[100].

[102] Annesley, T.M.; Clayton, L.T.; *Clin. Chem.*; **2005**, 51, 872.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Comparar, a partir de uma abordagem metabolômica *untargeted*, dois grupos de pacientes submetidos a diferentes regimes imunossupressores após transplante renal e suas diferenças e similaridades em nível molecular a fim de avaliar as vias metabólicas e metabólitos afetados.

Grupo 1 Everolimo/Prednisona/Tacrolimo

Grupo 2 Micofenolato mofetil/Prednisona/Tacrolimo

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar preparo de amostras de urina para análise metabolômica por GC-MS;
- Otimizar os parâmetros do programa XCMS para extração dos *molecular features*;
- Realizar o estudo metabolômico, a partir das condições otimizadas.

3. Parte experimental

3.1 Materiais e Reagentes

Acetonitrila (grau MS, Sigma-Aldrich, Alemanha), isopropanol (Sigma-Aldrich, Alemanha), metanol (Sigma-Aldrich, Alemanha), etanol (Synth, Brasil), heptano (Sigma-Aldrich, Alemanha), C13 metil éster (Sigma-Aldrich, Alemanha), N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida – BSTFA com 1% trimetilclorosilano -TMCS, (Sigma-Aldrich, Alemanha), cloridrato de O-metoxiamina (Sigma-Aldrich, Alemanha), piridina (grau sililação, Sigma-Aldrich, Alemanha), cloroformiato de metila (Sigma-Aldrich, Alemanha), urease (Sigma-Aldrich, Alemanha) e hidróxido de sódio (Synth, Brasil) foram utilizados neste trabalho.

Como equipamentos de bancada foram utilizados: Vortex (Quimis, Brasil), banho de ultrassom (Quimis, Brasil), banho termostatizado (LAUDA ECO RE 1225, Alemanha) e SpeedVac (Thermo Scientific SPD1010, USA).

3.2 Desenho experimental de coleta e dosagem de medicamentos

Os pacientes do Hospital do Rim e Hipertensão, receptores de transplante renal de doadores vivos, foram convidados a participar deste estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), cujo teor encontra-se no Anexo 6.4 desta Tese. Aproximadamente 30 pacientes foram incluídos no estudo e classificados pelo tipo de terapia que estão submetidos: Tacrolimo, Prednisona e Everolimo (Grupo 1) Tacrolimo, Prednisona e Micofenolato mofetil (Grupo 2).

A coleta de amostras de urina dos pacientes foi realizada na Unidade de Transplante Renal do Hospital do Rim e Hipertensão (UNIFESP, São Paulo) e supervisionada pelo Dr. Helio Tedesco-Silva Jr. Os pacientes estavam em jejum na hora da coleta.

Critérios de inclusão:

1. Termo de consentimento livre e esclarecido assinado
2. Pacientes com pelo menos 18 anos de idade acompanhados no ambulatório do hospital por 6 meses.

3. Receptores de transplante renal primário.

Critérios de exclusão:

1. Receptores de qualquer transplante combinado (rim/pâncreas, rim/fígado).
2. Incapazes de atender aos requerimentos do estudo.

Todos os pacientes receberam 4 doses fixas de 1,5 mg/kg de timoglobulina administrada nos dias 1, 3, 5 e 7 após o transplante. Todos os pacientes também receberam 1,0 g de metil-prednisolona antes da revascularização do enxerto e dose inicial de prednisona de 0,5 mg/kg/dia (máximo de 30 mg/dia), reduzido para 5 mg/dia até 45 dias. Todos os pacientes receberam também uma dose de tacrolimo inicial de 0,05 mg/kg BID (duas vezes ao dia) a partir do dia 8. A dose de tacrolimo foi ajustada para manter as concentrações sanguíneas mínimas de tacrolimo entre 3-5 ng mL^{-1}. Pacientes randomizados para o grupo 1 receberam everolimo 1,5 mg BID a partir do dia 1 e as doses foram ajustadas para manter a concentração sanguínea entre 4-8 ng/ml. Os pacientes randomizados para o grupo 2 receberam micofenolato de sódio 720 mg BID (duas vezes ao dia) a partir do dia 1. Todas as doses foram ajustadas para a segurança e tolerabilidade (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Descrição dos regimes de imunossupressores do Grupo 1 e 2

	Fármaco em estudo	**Dose inicial**	**Faixa de concentração sanguínea mínima (ng mL^{-1})**
Grupo 1 (n=15)	Timoglobulina	6 mg/Kg (4 doses de 1,5 mg/kg em dias alternados; primeira dose iniciada nas primeiras 24h após o transplante)	NA
	Tacrolimo	0,05 mg/kg BID. Primeira dose iniciada no dia 8	3-5
	Everolimo	1,5 mg 12/12h. Primeira dose	4-8

		iniciada nas primeiras 24h após o transplante	
Grupo 2 (n=15)	Timoglobulina	6 mg/Kg (4 doses de 1,5 mg/kg em dias alternados; primeira dose iniciada nas primeiras 24h após o transplante)	NA
	Tacrolimo	0,05 mg/kg BID. Primeira dose iniciada no dia 8	3-5
	Micofenolato de sódio	720mg BID. Primeira dose iniciada nas primeiras 24h após o transplante	NA

3.3 Coleta de amostras

O número de amostras de urina (n) de cada período (Tabela 3.2) não foi constante ao longo do tempo, devido à ausência de coletas em algum período específico. Alguns pacientes não compareceram em determinados períodos.

Tabela 3.2. Número de amostras de cada período para os grupos 1 e 2 e o valor estimado de MDRD

Características	Grupo 1	Grupo 2
Todos os pacientes (homem/mulher)	n=18 (13/5)	n=16 (13/3)
ClCr (estimado MDRD)	33,6	33,7
D7 (homem/mulher)	n=15 (10/5)	n=9 (7/2)
ClCr (estimado MDRD)	8,83	7,3
D14 (homem/mulher)	n=16 (10/6)	n=16 (13/3)
ClCr (estimado MDRD)	19,4	16,2
M1 (homem/mulher)	n=18 (13/5)	n=16 (13/3)
ClCr (estimado MDRD)	37,0	44,9
M3 (homem/mulher)	n=14 (9/5)	n=14 (11/3)
ClCr (estimado MDRD)	30,3	51,2
M6 (homem/mulher)	n=5 (3/2)	n=7 (6/1)
ClCr (estimado MDRD)	30,3	47,8

A urina de cada paciente foi coletada no pré-transplante e semanalmente até o primeiro mês pós-transplante, e uma vez por mês nos meses subsequentes até o período de 6 meses.

As amostras coletadas foram divididas em 5 partes aproximadamente iguais e armazenadas a -80 °C até análise. A primeira urina coletada no dia, minimiza a influência da dieta e do estilo de vida no estudo[103].

3.4 Preparo de amostras para metabolômica

3.4.1 Tratamento com urease

As amostras de urina foram descongeladas em gelo e homogeneizadas com auxílio de vortex. Uma alíquota de urina de 100 μL foi retirada e transferida para tubo eppendorf. A amostra foi tratada com solução de urease na concentração final de 10 mg mL^{-1} e incubada em banho termostatizado a 37 ^{o}C durante 1 hora.

Em seguida, foi adicionado isopropanol a frio, na proporção urina:isopropanol 1:6 (v/v). As amostras foram agitadas em vortex e colocadas em freezer por 30 minutos. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 10 minutos. Foram retirados 200 μL de sobrenadante e transferidos para *inserts* e evaporado em evaporador centrífugo do tipo SpeedVac.

3.4.2 Derivatização

3.4.2.1 Metoximação e sililação

Foram adicionados 10 μL de cloridrato de metoxiamina (15 mg mL^{-1}) em piridina em cada *vial* contendo a urina tratada no item 3.4.1. O vial foi colocado em ultrassom durante 10 s e agitado em *vortex*. Os *vials* foram colocados em banho a 37 ^{o}C durante 2 h.

Foram adicionados 10 µL de BSTFA com 1% TMCS (catalisador) para cada amostra, seguido de agitação em banho de ultrassom durante 10 s e vortex. Os *vials* foram colocados em banho a 70 ^{o}C por 1 h.

Após a incubação em banho, foram adicionados 100 µL de heptano.

---

[103] Walsh, M.C.; Brennan, L.; Malthouse, J.P.G.; Roche, H.M.; Gibney, M.J.; *Am. J. Clin. Nutr.;* **2006**, 84, 531.

3.4.2.2 Cloroformiato de metila[104]

Foram adicionados em 150 μL de urina fresca os seguintes reagentes e solventes: 30 μL de NaOH 5 mol L^{-1}, 167 μL de metanol e 34 μL de piridina. Em seguida foram adicionados 20 μL de cloroformiato de metila. A mistura foi agitada em *vortex* por exatamente 30 s. Foram adicionados novamente 20 μL de cloroformiato de metila com agitação por 30 s. Posteriormente, foram adicionados 400 μL de clorofórmio e a mistura foi homogeneizada em vortex por 10 s. Finalmente, foram adicionados 400 μL de solução de bicarbonato de sódio 50.10^{-3} mol L^{-1} e agitou-se por 10 s.

As amostras foram centrifugadas a 4 ^{o}C por 3 min, a 4000 rpm.

3.5 Análise por GC-MS

As análises por GC-MS foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Ernani Pinto Junior, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

O equipamento utilizado foi o Agilent Technologies 7890A com amostrador automático (Agilent Technologies 7693) e quadrupolo MSD (Agilent Technologies 5975). Um volume de 2 μL da amostra derivatizada foi injetado na coluna DB5-MS (30 m comprimento, 0.25 mm d.i., 0.25 μm de filme de espessura 95% dimetil/5% difenil-polisiloxano). A vazão de gás hélio foi de 1 mL min^{-1} e a temperatura do injetor foi de 250 ºC. A razão de *split* foi de 1:10 a 10 mL min^{-1}.

O seguinte gradiente de temperatura foi utilizado: temperatura inicial do forno a 60 ºC mantida por 1 min, aumentando para 300 ºC na taxa de 10 ºC min^{-1}. O tempo total de análise foi de 25 min. A temperatura da linha de transferência do detector foi de 290 ºC, do filamento foi 230 ºC e do quadrupolo, 150 ºC. A energia de ionização por elétrons (EI) foi de -70 eV. O espectrômetro de massas operou no modo scan na faixa de massas de *m/z* 50-600 na taxa de 2 espectros/s.

O software utilizado para a aquisição dos dados foi o Mass Hunter B.05.00 (Agilent Technologies). As bibliotecas utilizadas para identificação estrutural foram

[104] Boas, S.G.V.; *Anal. Biochem;* **2003**, 322, 134.

Fiehnlib (*retention time locked*) e NIST e o software AMDIS foi utilizado para auxiliar na deconvolução de espectros[28].

Para determinar a estabilidade instrumental durante aquisição de dados, e viabilidade dos dados obtidos para o tratamento estatístico comparativo, uma amostra "controle de qualidade" (QC) foi preparada pela mistura de 5 μL de todas as amostras utilizadas neste estudo. A amostra QC foi injetada de 5-10 vezes no início das medidas cromatográficas e a cada 5 amostras reais. A ordem de medida das amostras foi randomizada.

3.6 Tratamento de dados

Os dados gerados nas análises por GC-MS foram processados usando o software de acesso livre *R* versão 2.14 e o pacote XCMS[105,*106*]. Após normalização, os dados foram analisados no software *SIMCA* P+13.0 (Umetrics), utilizando PCA para classificação de grupos e PLS-DA para identificação dos metabólitos discriminadores candidatos[107,108].

Valores de *m/z* e tempo de retenção dos compostos foram identificados usando as bibliotecas Fiehnlib e NIST. De posse da identificação dos compostos foi realizada a busca por informações adicionais sobre vias metabólicas as quais podem estar correlacionadas com os metabólitos por meio das plataformas KEGG e HMDB.

3.7 Protocolo de preparo de amostra

As amostras usadas para o estudo metabolômico seguiram o seguinte protocolo.

---

105 Colin, A. S.; Want, E. J.; O'maille, G.; Abagyan, R.; Siuzdak, G.; *Anal. Chem.*; **2006**, 78, 779.

106 Gary, J.P.; Tautenhahn, R.; Siuzdak; G.; *Nat. Protoc.*; **2012**; 7, 508.

107 Goodacre, R.; Broadhurst, D.; Smilde, A.K.; Kristal, B.S.; Baker, J.B.; Beger, R.; Bessant, C.; Connor, S.; Capuani, G.; Craig, A.; Ebbels, T.; Kell, D.B.; Manetti, C.; Newton, J.; Paternostro, G.; Somorjai, R.; Sjöström, M.; Trygg, J.; Wulfert, F.; *Metabolomics*; **2007**, 3, 231.

108 http://www.icmje.org

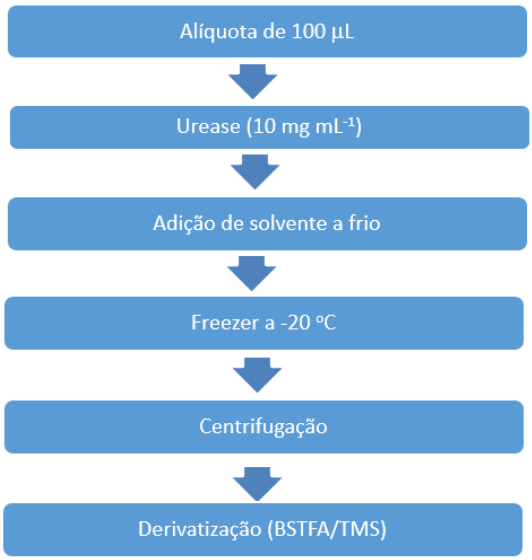


Figura 3.1. *Protocolo experimental desenvolvido para o preparo de amostra.*

4. Resultados e discussões

4.1 Otimização do preparo de amostras

No presente trabalho foi selecionada a abordagem *untargeted*, por ser uma forma de se obter o maior número de informação possível a respeito dos metabólitos discriminantes envolvidos com a administração dos regimes de imunossupressores e possibilitar a comparação e geração de hipóteses sobre o papel destes no estudo.

A urina, do ponto de vista analítico, é uma matriz complexa e composta por uma grande variedade de metabólitos, oriundos das diversas vias bioquímicas, que são extraídos da corrente sanguínea. Entre as classes de compostos podem ser citados os aminoácidos, ácidos orgânicos, sais inorgânicos (formados com cloreto, sódio, potássio), acil-carnitinas, açúcares, entre outras. Com este conjunto de informações metabólicas, este biofluido pode ser útil na elucidação de alguns mecanismos bioquímicos, uma vez que qualquer alteração no organismo refletirá em sua composição[109].

No entanto, quando utilizada a técnica de GC-MS, apesar de suas vantagens, muitas variáveis devem ser controladas para evitar erros na interpretação dos resultados. Estes erros podem ser provenientes da amostragem, armazenamento da amostra, extração, derivatização, atividade da urease, entre outros[110]. É necessário, portanto, um procedimento adequado de preparo de amostra para obtenção de resultados confiáveis.

A análise de urina por GC-MS requer uma etapa adicional de tratamento de amostra com urease, para remoção de ureia, um interferente na matriz potencialmente prejudicial, por encobrir vários sinais, devido a sua alta concentração na urina. Além disso, é necessária uma etapa de precipitação de proteínas utilizando um solvente orgânico, para remover possíveis proteínas

---

109 Bouatra, S.; Aziat, F.; Mandal, R.; Guo, A.C.; Wilson, M.R.; Knox, C.; Bjorndahl, T.C.; Krishnamurthy, R.; Saleem, F.; Liu, P.; Dame, Z.T.; Poelzer, J.; Huynh, J.; Yallou, F.S.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bogumil, R.; Roehring, C.; Wishart, D.S.; *PLOS ONE*, **2013**; 8; e73076.

110 Koek, M.M.; Jellema, R.H.; van der Greef, J.; Tas, A.C.; Hankemeier, T.; *Metabolomics*; **2011**, 3, 307.

contidas na urina, que podem diminuir o tempo de vida da coluna e afetar a repetibilidade do método.

A urease é uma enzima amido hidrolase, ou seja, catalisa a reação de hidrólise da ureia, formando gás carbônico e amônia (Equação 1).

$$(NH_2)_2CO + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3 \qquad \textbf{\textit{Equação 1}}$$

Com a finalidade de minimizar os erros sistemáticos e melhorar a confiabilidade dos resultados, foi necessário determinar a melhor condição de preparo de amostra para análise da urina dos pacientes, bem como o tratamento de dados, antes de iniciar os estudos metabolômicos.

Foram realizados estudos sobre alguns parâmetros que impactam no preparo de amostra abordando a influência da urease, tipos e proporção de solventes para precipitação de proteína, seleção do melhor agente derivatizante e tratamento de dados, tais como alinhamento dos picos no XCMS para obtenção de dados com maior confiabilidade. As amostras de urina utilizadas para este estudo foram de voluntários que assinaram o TCLE (anexo nesta tese).

4.1.1 Influência da concentração de urease

A urina contém alto teor de ureia, chegando até cerca de 20 mg mL^{-1}. Assim é um composto que pode influenciar a análise dos demais compostos da urina por GC-MS. Na literatura são encontrados diversos trabalhos, que remontam desde a década de 1960, que utilizam a urease para remoção da ureia [111].

Um estudo recente sobre a influência da urease em amostras de urina foi publicado por Robertson (2014)[112], no qual foi observado que as amostras tratadas com urease resultavam em menores valores de RSD (<30%) da área de picos dentre as replicatas de preparo, quando comparado com replicatas de amostras não tratadas com a enzima. Portanto, a precisão da análise pode ser

[111] Putnam D.F. Composition and Concentrative Properties of Human Urine. Huntington Beach, California: National Aeronautics and Space Administration; **1971**. p. 112

[112] Robertson, B.J.W.; Kim, M.Y.; Zink, E.M.; Hallaian, K.A.; Zhang, Q.; Madupu, R.; Waters, K.M.; Metz, T.O.; *Metabolomics*, **2014**, 10, 897.

afetada pela concentração de ureia que pode interferir negativamente. Assim, os valores de RSD de área dos picos são indicadores importantes da variabilidade a qual o experimento está submetido, uma vez que valores altos podem impactar negativamente na interpretação de um estudo comparativo, como está baseada a metabolômica.

Para a remoção de ureia da urina, uma quantidade variável de urease tem sido reportada (Tabela 4.1), geralmente entre 30 e 100 U de enzima para cerca de 200 μL de urina[113]. O valor de 1 unidade é o equivalente a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de produto por minuto.

Tabela 4.1. Exemplos na literatura de utilização da urease para remoção de ureia e as condições experimentais

Volume de urina (μL)	Volume de metanol (μL)	Concentração de urease (mg mL^{-1})	Referência
100	1000	1,0	[112]
300	800	2,5	[114]
200	1700	16,0	[115]

Com base nos trabalhos publicados e com o objetivo de avaliar qual a concentração ótima de urease a ser utilizada neste estudo, foram preparadas amostras de urina em triplicata e estas foram tratadas com a enzima em 3 concentrações finais diferentes em 1 mL de urina: 2, 10 e 15 mg mL^{-1}. Como controle, foi utilizada uma triplicata de amostras não tratadas com urease e submetida às mesmas condições experimentais.

Para realização deste experimento, foram retiradas alíquotas de 200 μL de urina, que foram tratadas com a urease nas concentrações acima especificadas, em banho termostatizado na temperatura ótima de atividade da urease (37 ^{o}C) durante 1 h na sequência[123].

As amostras foram tratadas com isopropanol na proporção 1:3 (v/v) (urina:solvente) para precipitação de proteínas. A derivatização foi realizada

[113] Pasikanti, K.K.; Ho, P.C.; Chan, E.C.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; **2008**, 22, 2984.
[114] Yi, L.; Shi, Shuting; Yi, Z.; He, R.; Lu, H.; Liang, Y.; *Anal. Methods*.; **2014**; 6, 4380
[115] Chan, E.C.Y.; Pasikanti, K.K.; Nicholson, J.K.; *Nat. Protoc.*, 6, **2011**,1483.

com BSTFA e a análise foi realizada por GC-MS. Os dados foram tratados calculando as áreas de cada *molecular feature*. O termo *molecular feature* está relacionado com um sinal que combina um determinado valor de razão *m/z*, tempo de retenção, e está presente em todas as amostras. Tais sinais configuram um grupo no tratamento de dados. Dessa forma, o desvio padrão relativo (RSD) dos valores de área foram utilizados como medida de qualidade dos tratamentos com urease.

Os dados foram tratados utilizando o programa XCMS e os cromatogramas foram visualizados no software AMDIS onde os picos são deconvoluídos e identificados por meio de base de dados NIST e Fiehnlib. Dessa forma, foram identificados aproximadamente 40 compostos, em sua maioria, ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares. O sinal da ureia na amostra controle foi o mais intenso, no tempo de retenção de aproximadamente 8,5 min, sobrepondo por 0,2 min (Figura 4.1). Esta interferência foi menor quando comparado com o trabalho de Kind *et al*. (2007)[116], cujo sinal sobrepôs outros picos por aproximadamente 1 min. Esta sobreposição intensa pode prejudicar o tratamento de dados quando utilizado o XCMS.

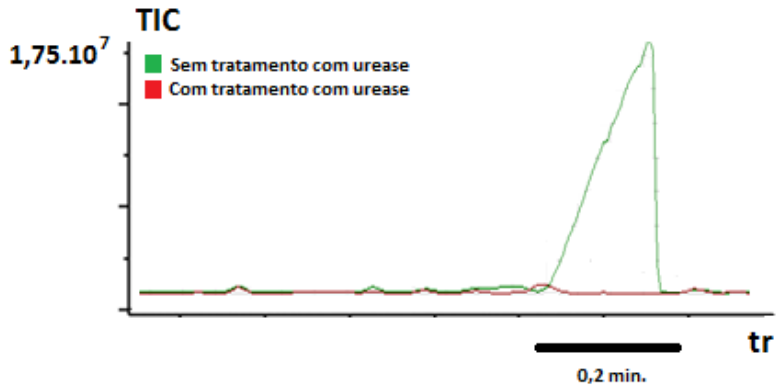


Figura 4.1. Cromatograma de íons totais obtido por GC-MS típico da urina sem tratamento com urease (verde) e com urease (vermelho). O sinal da ureia aparece no tempo de retenção de aproximadamente 8,5 min, sobrepondo por 0,2 min, quando não tratada com urease. As condições cromatográficas são descritas na seção 3.5 desta tese.

[116] Kind, T.; Tolstikov, V.; Fiehn, O.; Weiss, R.H.; *Anal. Biochem*; **2007**, 363, 185.

Somado ao efeito da sobreposição da ureia sobre outros picos cromatográficos, foi verificado que houve diferença na qualidade dos cromatogramas nas amostras tratadas com urease e controle. Os dados das amostras analisadas foram avaliados de acordo com os valores de RSD da área dos picos, considerado ótimo quando menor que 20%; aceitável entre 20% e 30% e inaceitável quando maior que 30%, entre as triplicatas.

Para mensurar os valores de RSD de cada molecular *feature*, foi atribuído um sistema de pontuação de acordo com a Equação 2, com peso maior (5) para o número de compostos identificados com RSD menor que 20% (N1), intermediário (3) para valores de RSD entre 20% e 30% (N2) e peso negativo (-1) para a quantidade de compostos com RSD maior que 30% (N3).

Pontuação=5xN1+3xN2 – N3 *Equação 2*

A amostra tratada com urease apresentou maior quantidade de compostos com valores de RSD menores que 30% e, consequentemente, a melhor pontuação. Os valores de concentrações 10 e 15 mg mL^{-1} apresentaram as maiores pontuações. As amostras não tratadas com urease apresentaram mais *molecular features* com valores de RSD de suas áreas maior que 30%, quando comparadas com as amostras tratadas - a pior pontuação. Esses resultados sugerem que com valores mais elevados de urease, obtém-se melhor repetibilidade nas análises.

Na Tabela 4.2 pode ser visualizado o número de *molecular features* nas amostras de urina tratadas com diferentes concentrações de urease.

Tabela 4.2. Influência da concentração de urease em função dos valores de RSD

	RSD (%)	**0 mg mL^{-1}**	**2 mg mL^{-1}**	**10 mg mL^{-1}**	**15 mg L^{-1}**
Número de *molecular features*	<20 (N1)	1174	1488	1648	1562
	20<RSD<30 (N2)	169	126	110	170
	>30 (N3)	371	318	207	232
	Pontuação	6006	7500	8363	8088

Realizou-se uma análise multivariada de componentes principais (PCA) para visualizar graficamente a dispersão e diferença entre as concentrações. O

gráfico de scores (Figura 4.2) mostra a dispersão das amostras de urina tratadas com urease.

Nesse tipo de análise multivariada, a dispersão das amostras é um reflexo de suas diferenças, as amostras mais próximas são mais parecidas entre si, enquanto que as amostras mais distantes apresentam maior diferença. As replicatas das amostras controle ficaram mais dispersas quando comparadas com as réplicas dos outros experimentos (amostras tratadas com 10 e 15 mg mL^{-1} de urease), o que se explica pelo maior número de compostos identificados com RSD > 30%. A diferença entre os grupos controle e tratados (com urease) sugere que a ureia pode ter interferido negativamente na derivatização, pois devido à sua elevada concentração na urina pode competir com os demais metabólitos na reação de derivatização.

A análise de todos os *molecular features* mostra que a diferença entre o controle e as demais amostras tratadas com urease é mais pronunciada, como pode ser observado pelo gráfico de scores obtido por PCA (Figura 4.2).

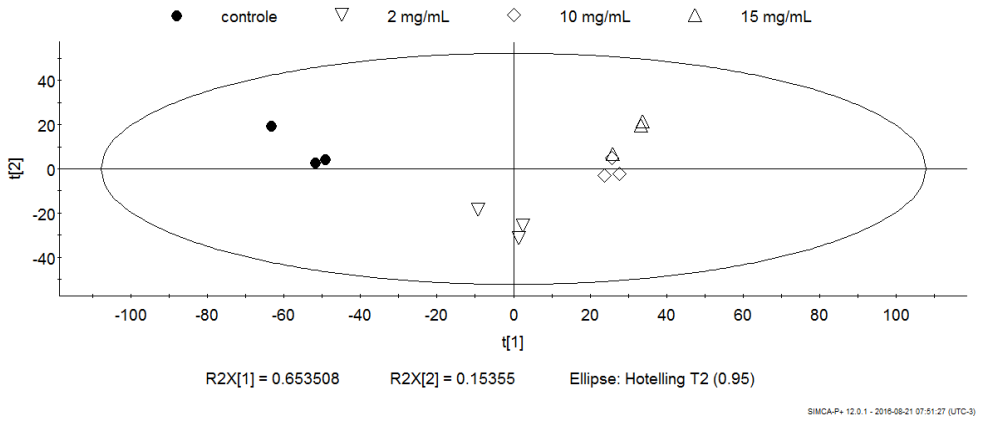


Figura 4.2. Gráfico de escores das componentes 1 e 2 do modelo de PCA mostrando a dispersão da amostra sem tratamento com urease e a comparação com o tratamento com 2, 10 e 15 mg mL^{-1}. R^2: 0,80; Q^2: 0,70.

4.1.2 Influência do tratamento com urease sobre o número de compostos identificados

O tratamento das amostras de urina com urease mostrou ser eficaz para a confiabilidade dos dados, uma vez que diminuiu a sua variabilidade devido à interferência da ureia. No entanto, a concentração de ureia na urina pode variar bastante, como foi observado no estudo de Bouatra *et al*.[109] e para avaliar a influência do teor de ureia no tratamento da amostra de urina com urease em amostras com alto teor de ureia, um novo experimento foi realizado. Os dados gerados pela análise por GC-MS foram analisados no AMDIS utilizando a biblioteca Fiehn.

Para simular uma amostra de urina com alto teor de ureia, foi adicionada ureia (nas concentrações finais de 2, 20 e 50 mg mL^{-1}) nas amostras e estas foram tratadas com urease (uma amostra tratada com urease na concentração de 2 mg mL^{-1} e uma tratada com urease na concentração de 15 mg mL^{-1}). Como controle, foi adicionada ureia em uma amostra em uma concentração final de 50 mg mL^{-1} que não foi tratada com urease. Em 2 amostras (branco) não foram adicionadas ureia, mas foram tratadas com urease nas concentrações de 2 e 15 mg mL^{-1} (Figura *4.3*) com a finalidade de comparar o tratamento com um teor alto e baixo de urease. Todas as amostras foram analisadas e comparadas com relação ao número de compostos identificados.

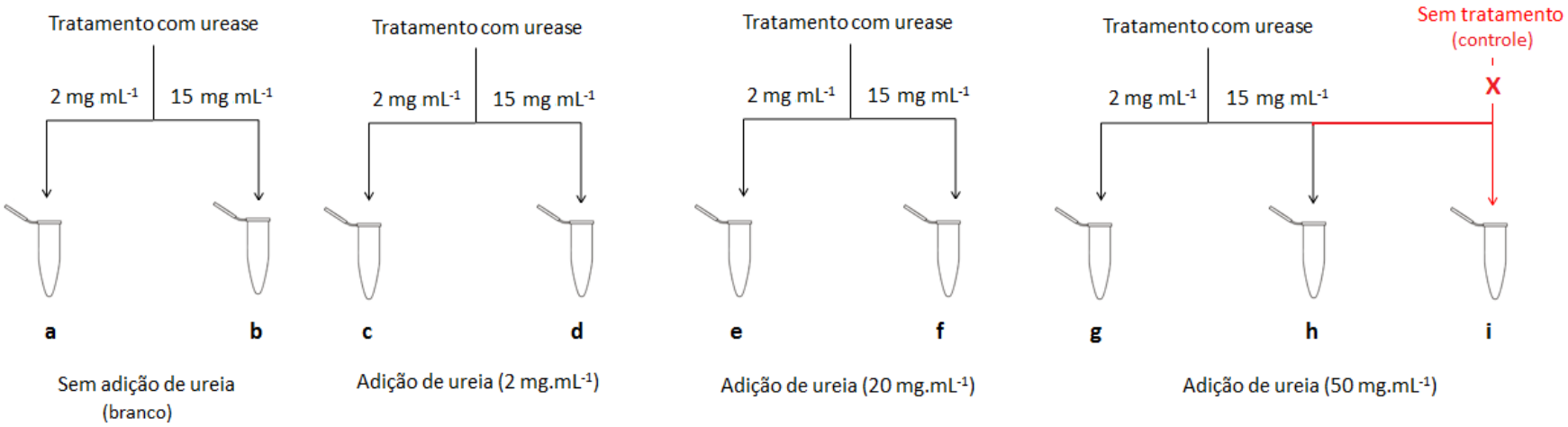


Figura 4.3. Representação esquemática do experimento realizado.

Como pode ser observado na Tabela 4.3, para a amostra de urina na qual foi adicionada ureia em uma concentração final de 50 mg mL^{-1}, o número de compostos identificados foi menor quando não tratado com urease (i), com aproximadamente 10 compostos a menos em relação à amostra tratada com a enzima na mesma concentração de ureia adicionada (g). Foi utilizada esta concentração para simular um experimento no qual a concentração da ureia era relativamente alta e, neste caso, como discutido anteriormente, poderia comprometer negativamente a interpretação de resultados. A alta quantidade de ureia também interferiu negativamente nas amostras tratadas com urease, uma vez que o número de compostos identificados foi menor quando comparado com as outras condições, realçando a interferência negativa da ureia. Os dados gerados pela análise por GC-MS foram analisados no AMDIS utilizando a biblioteca Fiehnlib.

Tabela 4.3. Influência da urease sobre o número de compostos identificados

Concentração de ureia (mg mL^{-1})	Concentração de urease (mg mL^{-1})	Número de compostos identificados
branco (a)	2	37
branco (b)	15	35
2 (c)	2	37
2 (d)	15	36
20 (e)	2	37
20 (f)	15	38
50 (g)	2	35
50 (h)	15	31
50 (i)	sem adição (controle)	26

4.1.3 Influência dos solventes na precipitação de proteínas

A precipitação das proteínas é realizada por meio de solventes orgânicos como metanol[117], isopropanol[118] ou algum outro solvente que seja capaz de, além de precipitar a proteína presente na urina, extrair a maior quantidade de metabólitos da amostra. Na literatura existem poucos estudos mais aprofundados sobre a influência dos solventes na precipitação de proteínas na urina.

Para remover proteínas presentes na urina, foram testados diferentes solventes para precipitação, por meio de um estudo comparativo entre 3 solventes mais utilizados e descritos na literatura: acetonitrila, metanol e isopropanol. As amostras foram descongeladas em gelo, centrifugadas e o sobrenadante foi evaporado. Após o tratamento com urease (15 mg mL^{-1}) e solvente, as amostras foram derivatizadas com BSTFA e analisadas.

Os critérios utilizados para a avaliação foram também baseados em valores de RSD de acordo com a Equação 2, na visualização de turbidez e homogeneidade de cada amostra, e no número de compostos identificados.

Primeiramente, foi avaliada a proporção urina:solvente. Após o tratamento com a urease, foram retiradas alíquotas de amostra e adicionados solventes a frio nas proporções de urina:solvente que variaram de 1:1 até 1:6 (v/v). Com o uso de acetonitrila, observou-se a presença de turbidez e heterogeneidade nas amostras indicando que a precipitação de proteínas não foi eficiente, comprometendo a derivatização. Assim, este solvente não foi mais considerado nas análises posteriores. Embora as amostras precipitadas com isopropanol ou metanol nas proporções de 1:1 e 1:3 (v/v) de urina:solvente tenham tido visualmente um desempenho melhor que acetonitrila, algumas replicatas apresentaram turbidez menor que a acetonitrila, o que pode evidenciar que não foi retirada uma quantidade suficiente de proteínas, sendo necessária a utilização de uma proporção maior de solvente orgânico.

Em proporções maiores, de 1:3 a 1:6 (v/v) de urina:solvente, foram obtidos melhores resultados. Foram atribuídas pontuações relativas a cada

[117] Kuhara, T.; *J. Chromatogr. B.*; **2002**, 781, 497.
[118] Pasikanti, K.K.; Esuvaranathan, K; Ho, P.C.; Mahendran, R.; Kamaraj, R; Wu, Q.H.; Chiong, E; Chan, E.C.; *J. Proteome Res.*; **2010**, 9, 2988.

uma das abordagens a partir do número de *molecular features* com valores de RSD de área menor que 20%, entre 20% e 30% e maior que 30%. Utilizando 100 μL de urina, foi possível utilizar proporções de urina:solvente de 1:3, 1:4 e 1:6 e, utilizando 200 μL, apenas foi possível testar proporções de 1:3 e 1:4, devido à limitação de volume do *insert* no vial.

Aplicando o sistema de pontuação (Equação 2), o uso do solvente isopropanol na proporção 1:6 (v/v) (urina:solvente) apresentou o maior valor (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Classificação dos tratamentos com solventes de precipitação por meio de pontuação. Foram comparadas proporções de 1:4 a 1:6 de urina:solvente e volumes de urina de 100 e 200 μL

Solvente	Volume (μL)	Proporção urina:solvente (v/v)	Número de compostos identificados	Pontuação
Isopropanol	100	1:6	42	145
Metanol	100	1:5	39	116
Isopropanol	200	1:5	30	106
Metanol	100	1:6	39	104
Isopropanol	100	1:4	39	75
Metanol	200	1:4	39	49

O gráfico de escores do modelo de PCA (Figura 4.4) permite visualizar a distribuição da amostra tratada com isopropanol e metanol. As amostras tratadas com isopropanol estão menos dispersas.

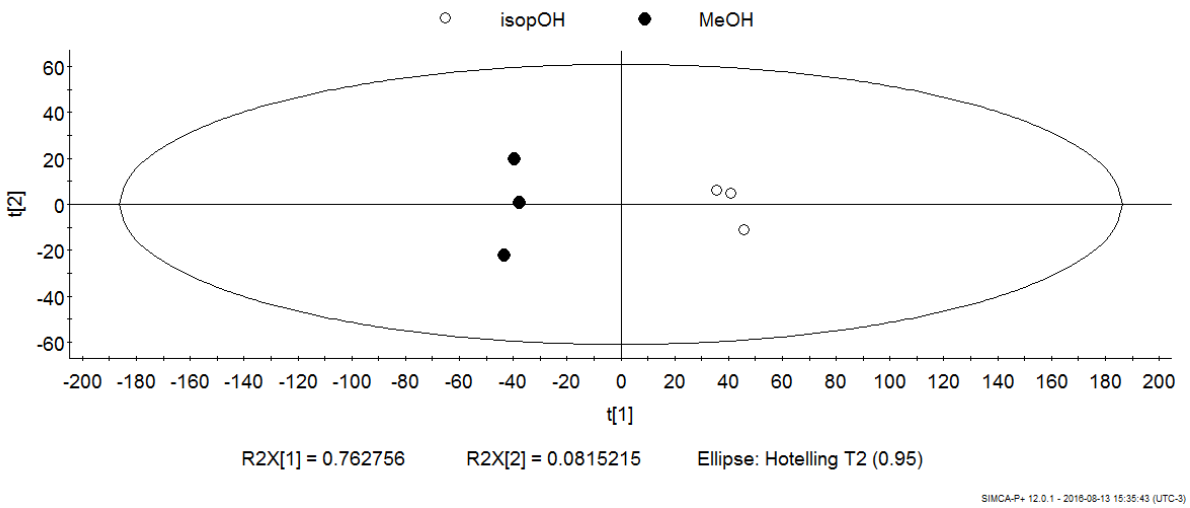


Figura 4.4. Gráfico de PCA comparando isopropanol (sem preenchimento) e metanol (em preto). R^2: 0,80; Q^2: 0,60.

Para avaliar se existe diferença significativa na amostragem de urina utilizadas nas triplicatas de amostras de 100 e 200 μL, foi realizada ANOVA dos valores das replicatas, com base no número de compostos identificados.

Pelo p-valor pode-se concluir que não existe diferença significativa entre os volumes de urina utilizados, tendo como base o número de compostos identificados (Tabela 4.5). Este resultado permite optar pelo menor volume e utilizar maior quantidade de solvente.

Tabela 4.5. *ANOVA da amostragem de urina em diferentes proporções*

Solvente	**Proporção urina:solvente (v/v)**	***p*-valor**
Metanol	1:4	0,83
Metanol	1:5	0,81
Isopropanol	1:4	0,23
Isopropanol	1:5	0,25

4.1.4 Derivatização

Os compostos que apresentam grupos polares como carbonilas, hidroxilas, aminas, entre outros, devem ser derivatizados para que se tornem mais voláteis e termicamente estáveis[119] e, para uma análise global de metabólitos, deve-se escolher um método de derivatização adequado para a maior parte destes. Neste trabalho foram testados dois protocolos de derivatização para comparação: metoximação e sililação com BSTFA N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida e cloroformiato de metila.

Em 2011, Koek *et al*.[110] revisaram artigos sobre abordagens metabolômicas quantitativas realizadas por GC-MS. Na maioria dos artigos revisados, os métodos de derivatização escolhidos foram metoximação seguida de sililação ou somente sililação. A sililação é amplamente escolhida devido à variedade de classes de compostos que podem ser derivatizados por esse método e à sua versatilidade. A volatilidade dos compostos após a sililação é decorrente da substituição do hidrogênio por um grupo alquil-silil, neste caso, trimetil silil (TMS). Entre a variedade de grupos funcionais que podem ser derivatizados por BSTFA na urina podem ser citados álcoois, ácidos carboxílicos, tióis, aminas, iminas e fosfatos, vide Figura 4.5.

[119] Pasikanti, K.K.; Ho, P.C.; Chan, E.; C.Y.; *J. Chromatogr. B*; **2008**, 871, 202.

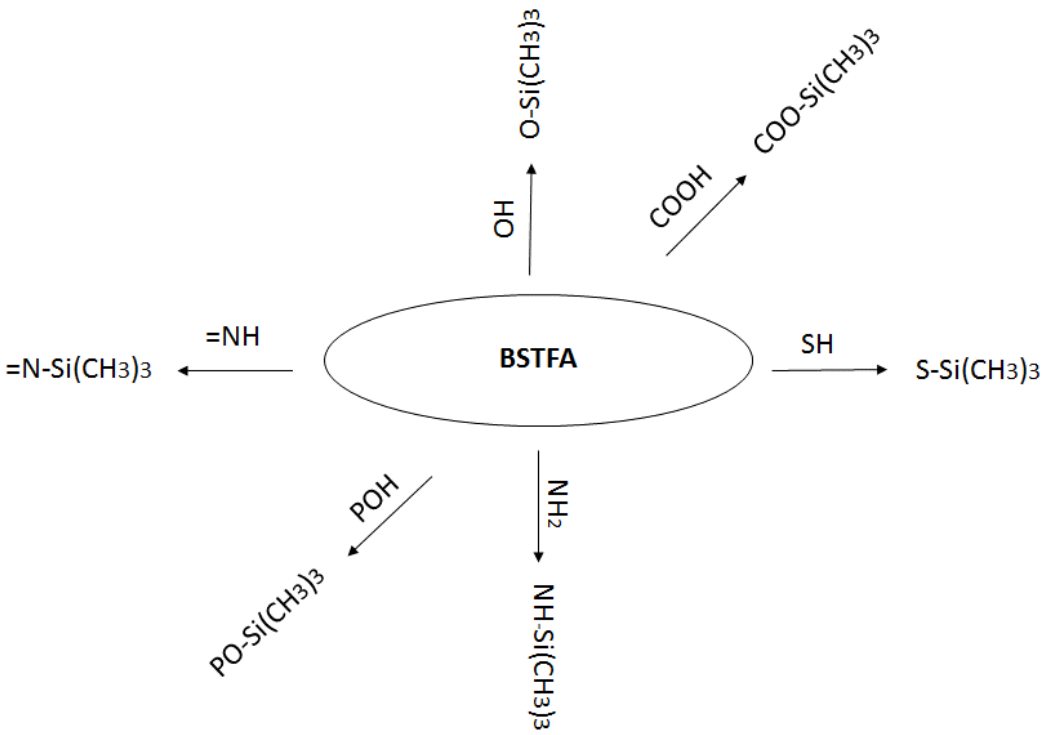


Figura 4.5. Principais grupos funcionais que podem ser derivatizados utilizando BSTFA.

Alguns reagentes de sililação mais utilizados em estudos metabolômicos são *N*-metiltrimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) e *N*-terc-butildimetilsilil-*N*-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA)[32].

O protocolo de derivatização utilizado foi a metoximação e sililação com BSTFA, comumente utilizado em análises de GC-MS, e com eficiência comparável à MSTFA. Antes da etapa de sililação, é necessário realizar uma reação de metoximação, tendo em vista a presença de açúcares, que sem a etapa de metoximação, levam a um cromatograma com múltiplos picos cromatográficos. Na primeira etapa de metoximação a ciclização é inibida e a carbonila é protegida do tautomerismo ceto-enólico, inibindo a conversão intramolecular de açúcares hemiacetais a cetais, durante a etapa de sililação (Figura 4.6).

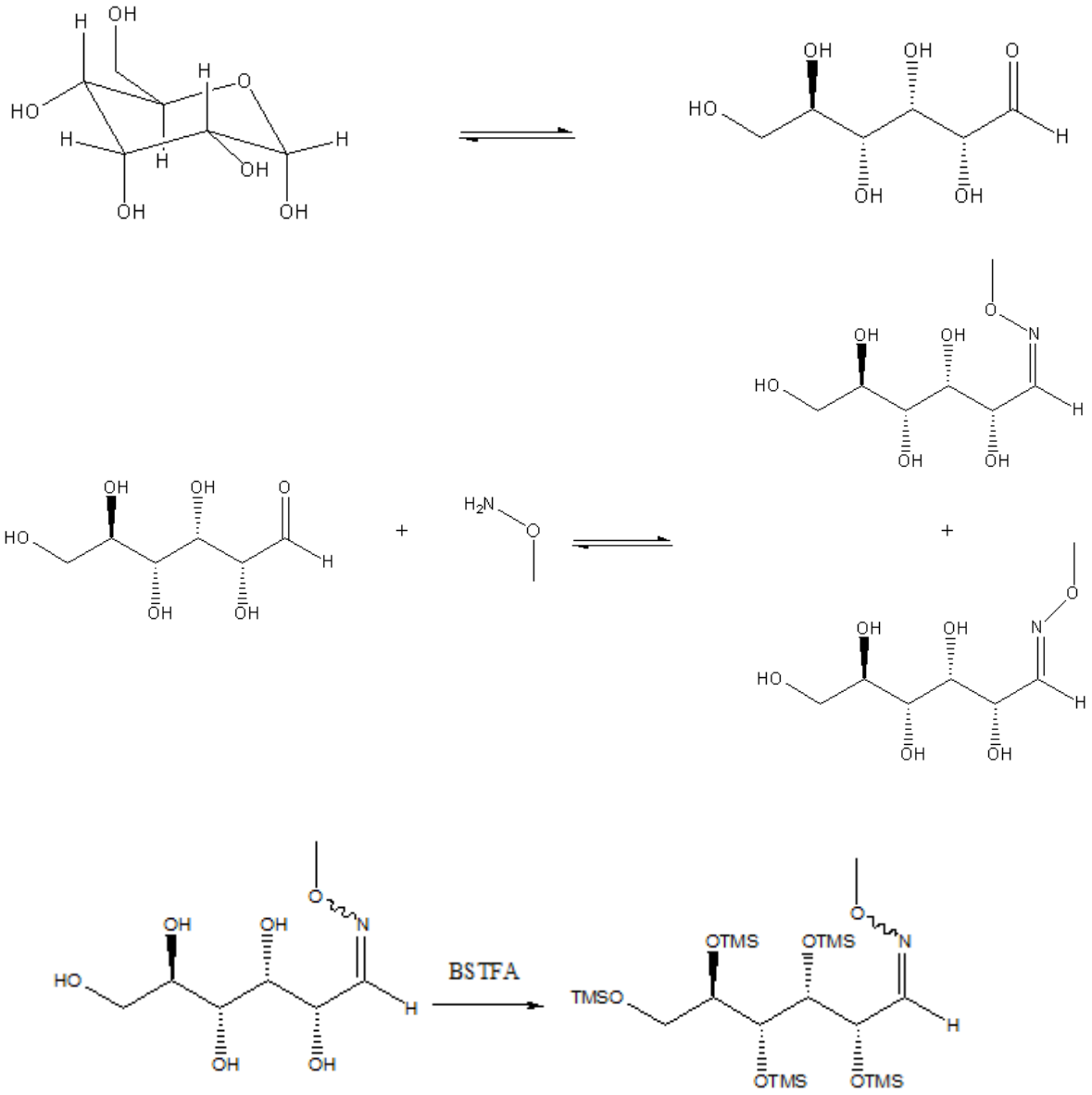


Figura 4.6. Reação de oximação e sililação com BSTFA.

Já a utilização de cloroformiato de metila na derivatização envolve a reação de amidação e esterificação, convertendo aminoácidos e ácidos orgânicos, que compõem a maior parte dos metabólitos envolvidos no metabolismo do carbono (Figura 4.7).

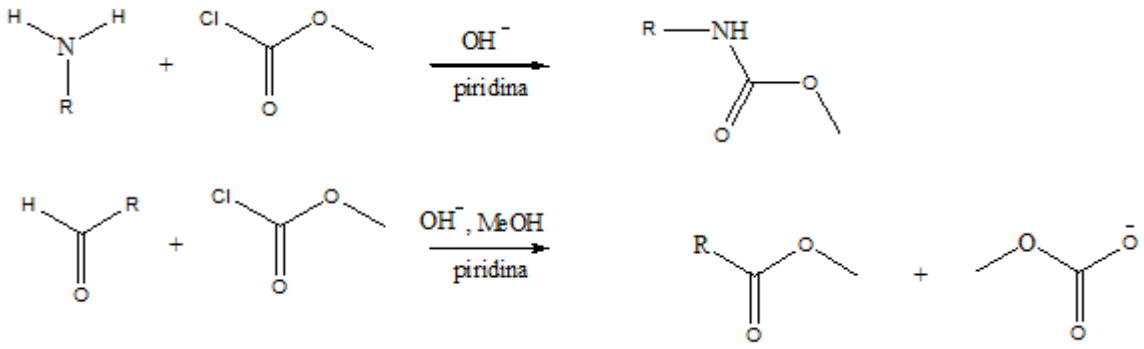


Figura 4.7. Derivatização de aminas e carbonilas com cloroformiato de metila.

Os *molecular features* obtidos pelos dois processos de derivatização foram identificados por meio de bancos de dados da NIST, uma vez que na biblioteca Fiehnlib só é possível identificar compostos que foram metoximados e sililados. Assim, os protocolos foram comparados pelo número de compostos identificados. Como pode ser observado visualmente pelo cromatograma (Figura 4.8), o protocolo de derivatização utilizando BSTFA possibilitou a obtenção de um maior número de picos cromatográficos. Utilizando o banco de dados da NIST foi possível identificar apenas 13 compostos com o protocolo de derivatização por cloroformiato de metila, número significativamente inferior ao protocolo de BSTFA, cujo número de compostos identificados é de aproximadamente 40.

Visualmente é possível concluir que a amostra tratada com BSTFA possui mais sinais no cromatograma em relação à amostra tratada com cloroformiato de metila (Figura 4.8).

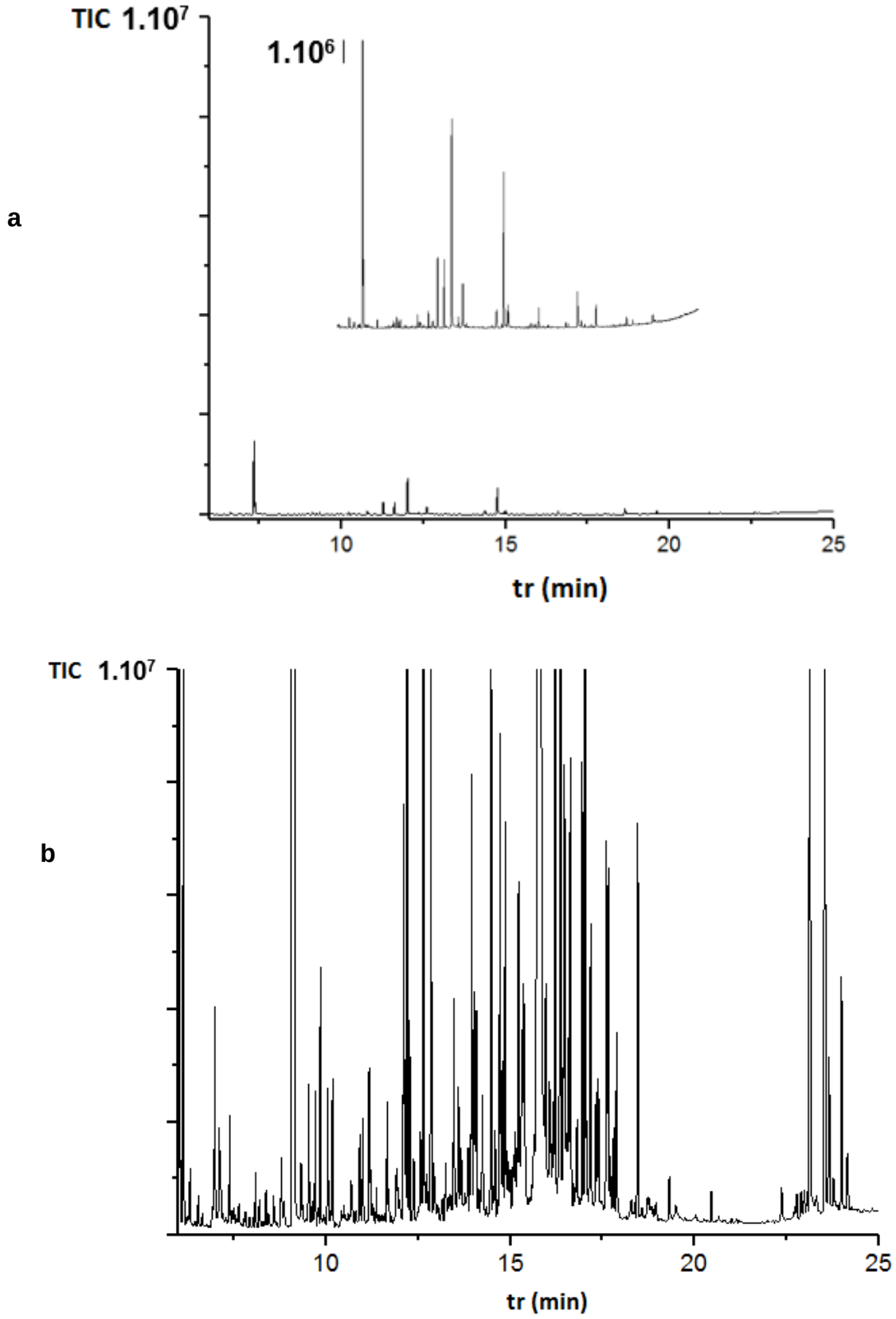


Figura 4.8. Cromatograma representativo da amostra derivatizada com cloroformiato de metila (a) e BSTFA (b). Condições cromatográficas são descritas na seção 3.5 desta tese.

Após a otimização das condições de preparo de amostras, foi utilizado o protocolo experimental descrito na seção 3.7 desta tese.

4.1.5 Tratamento de dados

O preparo de amostra, o desenvolvimento dos métodos analíticos e a aplicação de uma técnica instrumental adequada são importantes para obter dados confiáveis e reprodutíveis. A metodologia do tratamento de dados influencia também na confiabilidade dos resultados. Neste sentido, é necessário realizar a otimização no processo de tratamento.

O pré-tratamento dos dados brutos constitui a etapa inicial do manuseio dos dados e tem como objetivo obter informações precisas e relevantes a partir das medidas obtidas de cada amostra, facilitando a sua interpretação[13]. Para esta finalidade foi utilizado o pacote XCMS, uma das ferramentas mais utilizadas em tratamento de dados metabolômicos, no qual estes passam por uma etapa de detecção de picos (xcmsSet), agrupamento de picos (group), correção de tempo de retenção (retcor), reagrupamento de picos, preenchimento de valores (fillPeaks) e comparação univariada (diffreport) (Figura 4.9). Após o pré-tratamento de dados, uma tabela de dados é gerada, que pode ser aberta como uma planilha de Excel, contendo os resultados do tratamento.

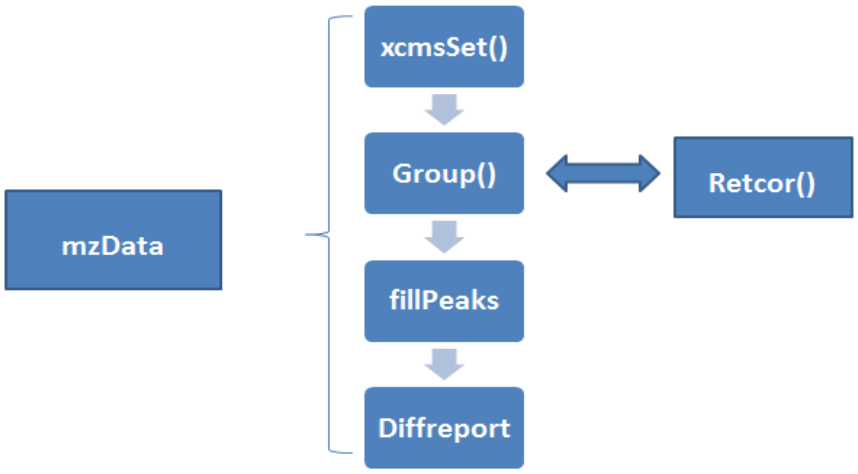


Figura 4.9. Metodologia empregada no XCMS.

O software XCMS foi inicialmente desenvolvido para tratar dados de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução. Assim, os parâmetros normalmente utilizados para esse tipo de dado são inadequados para o tratamento de dados de GC-MS, em que os cromatogramas são mais reprodutíveis em relação ao tempo de retenção.

O XCMS possui diversos algoritmos para extrair os *molecular features* das análises. O algoritmo que é mais adequado para dados em que o espectrômetro de massas não é de alta resolução é o *findPeaks.matchedFilter*. Esse método de extração de *features* é o padrão do software e foi utilizado nesse caso.

Os *molecular features* (compostos por informações de *m/z*, intensidade e tempo de retenção) obtidos pelo XCMS possuem o modelo gaussiano e tem um desvio padrão equivalente à largura a meia altura do pico (fwhm). O parâmetro fwhm foi avaliado, devido à sua importância na identificação dos picos. Para selecionar os picos extraídos, estes devem ter um valor mínimo de sinal/ruído para não serem considerados ruídos (argumento snthresh no XCMS)[54]. Valores muito baixos de threshold podem resultar numa tabela com muitos dados provenientes de ruído analítico, em vez de compostos reais. Por outro lado, um threshold muito alto pode levar a perda de informação, como a

ausência na tabela final de metabólitos de baixa concentração, que seriam considerados ruídos. Assim, esse parâmetro foi otimizado nesse trabalho.

Os picos de cada *molecular feature* são agrupados (*algoritmo grouping*) em um número crescente de valores de *m/z* e depois de agrupados, é realizada uma correção do tempo de retenção. Após a correção de tempo de retenção, o algoritmo de agrupamento é novamente realizado, para que mais picos (com tempos de retenção corrigidos) possam ser agrupados como um mesmo *molecular feature*.

O algoritmo de agrupamento inicia fazendo um intervalo de todas as amostras no domínio de massa. Após o agrupamento dos picos em intervalos, o algoritmo resolve os grupos de picos com diferentes tempos de retenção em cada intervalo e começa a operar no domínio cromatográfico.

É utilizada neste caso, a estimativa de densidade de *kernell*, que detecta grupo de picos encontrando regiões de alta densidade, identificando os picos com tempos de retenção semelhantes. O algoritmo seleciona somente grupos que contêm mais da metade das amostras. Assim, nessa etapa um parâmetro a ser otimizado é a largura dos picos (bw).

A influência da largura da banda pode ser visualizada graficamente na Figura 4.10. Os picos individuais são representados como pontos. Como pode ser observado, o menor valor de bw diminui a abrangência do agrupamento. Valores menores de bw podem cortar um sinal cromatográfico e erroneamente contabilizar como dois, originando um sinal duplicado. De maneira análoga, valores maiores de bw possuem sinais mais largos, podendo incluir mais sinais em um único pico.

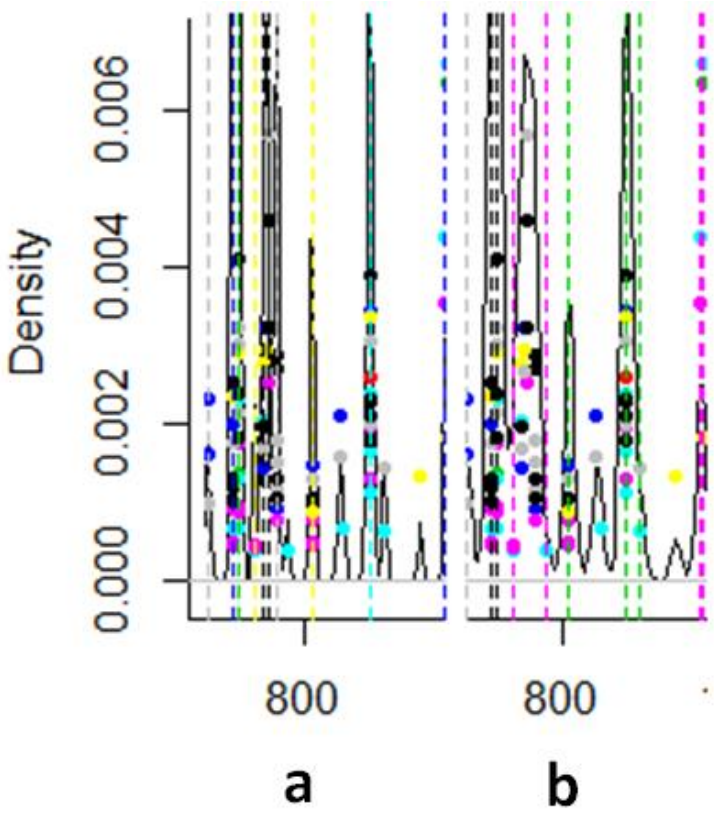


Figura 4.10. Influência do valor de bw. **(a)** bw=3; **(b)** bw=5.

A correção do tempo de retenção (algoritmo *retcor*) é calculada pela média do tempo de retenção para cada amostra agrupada. Para isso, o algoritmo usa um modelo de regressão para aproximar as diferenças entre os desvios [120]. Os desvios de tempo de retenção em GC-MS são geralmente baixos, devido à sua repetibilidade (Figura 4.11).

[120] Dunn, W.B.; Broadhurst, D.; Brown, M.; Baker, P.N.; Redman, C.W.G.; Kenny, L.C.; Kell, D.B.; *J. Chromatogr. B*; **2008**, 871, 288.

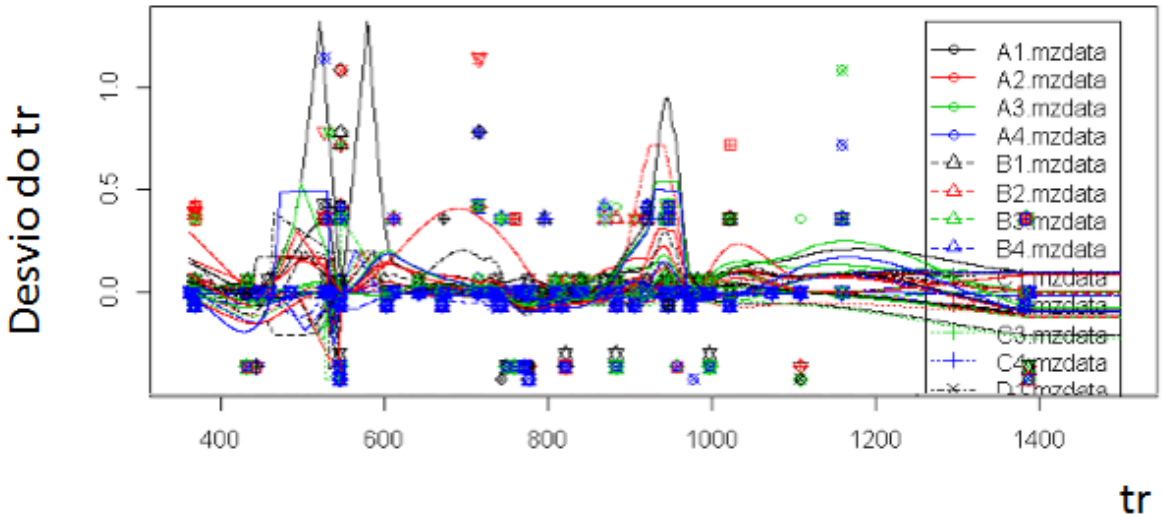


Figura 4.11. Gráfico do desvio de tempo de retenção (tr) em função dos tempos de retenção em minutos obtido depois de um alinhamento dos dados no XCMS.

Após a correção do tempo de retenção, os picos são novamente agrupados, dessa vez com maior eficiência, devido ao alinhamento dos dados.

Finalmente, utilizando o comando fillPeaks(), os picos não observados em alguma amostra serão preenchidos, embora algumas vezes na planilha, ainda contém *missing values*. Uma planilha é gerada após o comando diffreport, mostrando as diferenças estatísticas entre as amostras, bem como os valores de área ou altura de cada pico cromatográfico.

Então, os parâmetros mais importantes para a obtenção de dados com qualidade e que foram otimizados nesse trabalho são threshold (sntresh, na função *findPeaks.matchedFilter*), fwhm (algoritmo *findPeaks.matchedFilter*) e bw (algoritmo *grouping*).

Para avaliar a melhor combinação destes parâmetros, os valores de fwhm, bw e threshold (sntresh) foram variados e combinados (fwhm: 2 a 5; bw: 0,01 a 15; sntresh: 1 a 5), de modo a ter para cada *molecular feature* um dado valor de fwhm, bw e snthresh.

Para avaliar o efeito desses parâmetros na qualidade dos dados obtidos, foram utilizados dois critérios:

- O primeiro foi a porcentagem de molecular *features* obtidos da triplicata que possuem RSD menor que 15% para a sua intensidade.

- O segundo foi a presença de valores faltantes (*missing values*), que prejudicam a interpretação dos resultados, sendo um critério importante para se avaliar a qualidade dos dados obtidos. Idealmente, estes *missing values* deveriam ser apenas devido ao resultado da ausência de um determinado metabólito, ou seja, derivado das questões biológicas e não a outros fatores externos como instrumentais ou de tratamento de dados.

Para um valor fixo de fwhm e bw, com o aumento do valor de threshold, a proporção de features com RSD < 15% é maior (Figura 4.12). O inverso pode ser observado com relação ao valor de *missing values* (Figura 4.13), ou seja, com o aumento do valor do threshold, observam-se valores menores de *missing values*.

A tendência do número de *missing values* é diminuir quando aumenta o valor de fwhm de 2 a 4. No entanto, para valores de fwhm = 2, os desvios em relação ao tempo de retenção foram menores, quando comparado com fwhm = 3 e 4.

Pode-se observar também que ao manter os valores de bw e threshold fixos, o aumento de fwhm de 2 a 5, resulta em maior porcentagem de intensidade de picos com RSD menor que 15%.

Para valores de bw menores que 2, a porcentagem de valores de RSD < 15% é maior. Com valores maiores de *threshold*, obtêm-se valores maiores de porcentagem de RSD < 15%, como mostra a Figura 4.12, com o valor de fwhm = 4, utilizando *threshold* = 5 que tem a maior porcentagem de *molecular features* com RSD < 15%.

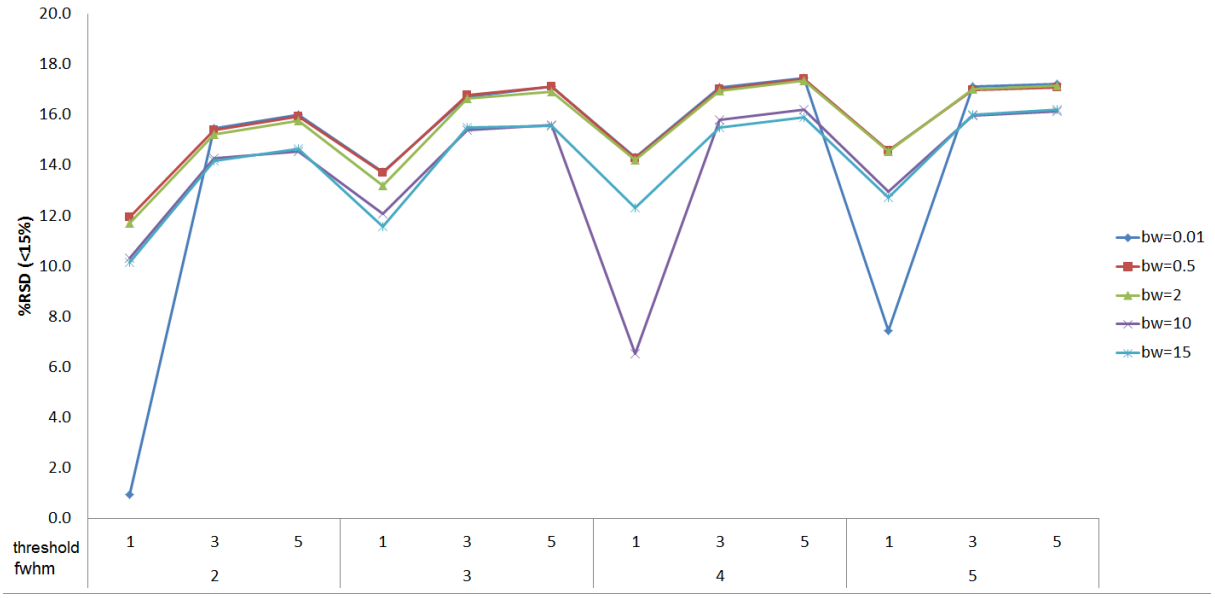


Figura 4.12. Relação entre a porcentagem de valores de RSD<15% em função das variáveis bw, fwhm e threshold. Para valores fixos de bw e fwhm, quanto maior o valor do threshold, maior a porcentagem de valores de RSD<15%.

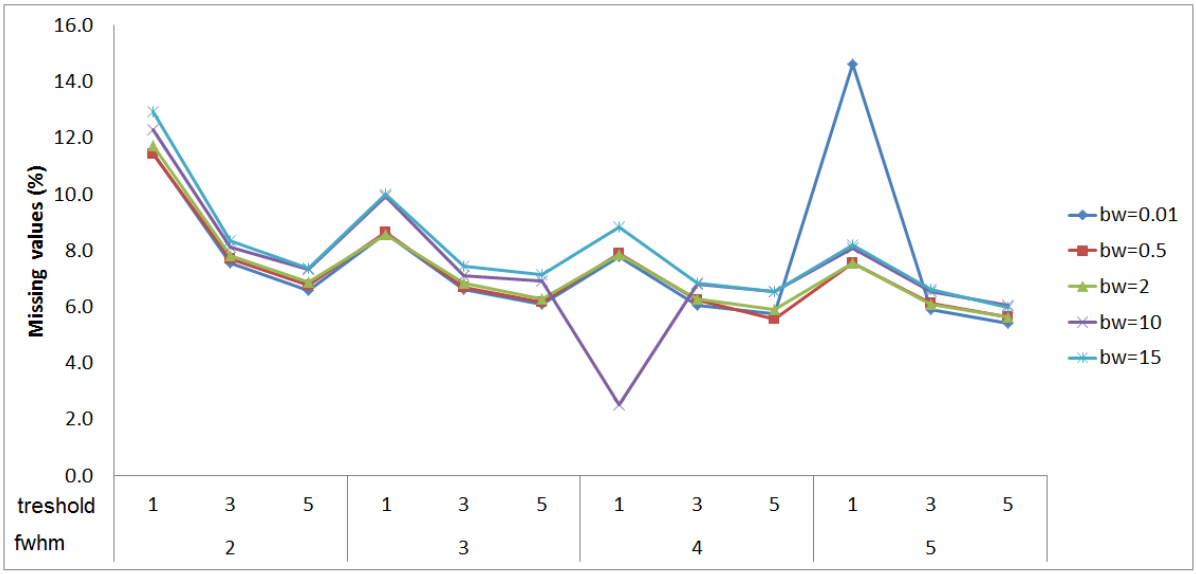


Figura 4.13. Relação entre a porcentagem de *missing values* e os valores de fwhm, bw e threshold. Podem ser observados valores mais baixos de *missing values* para valores de threshold mais altos.

Na Figura 4.14, pode-se observar que valores de fwhm de 3 a 5 possuem melhores resultados (maior porcentagem de RSD menor que 15%) em relação a fwhm = 2, principalmente com valores de bw = 0.1 a 2 e threshold = 5.

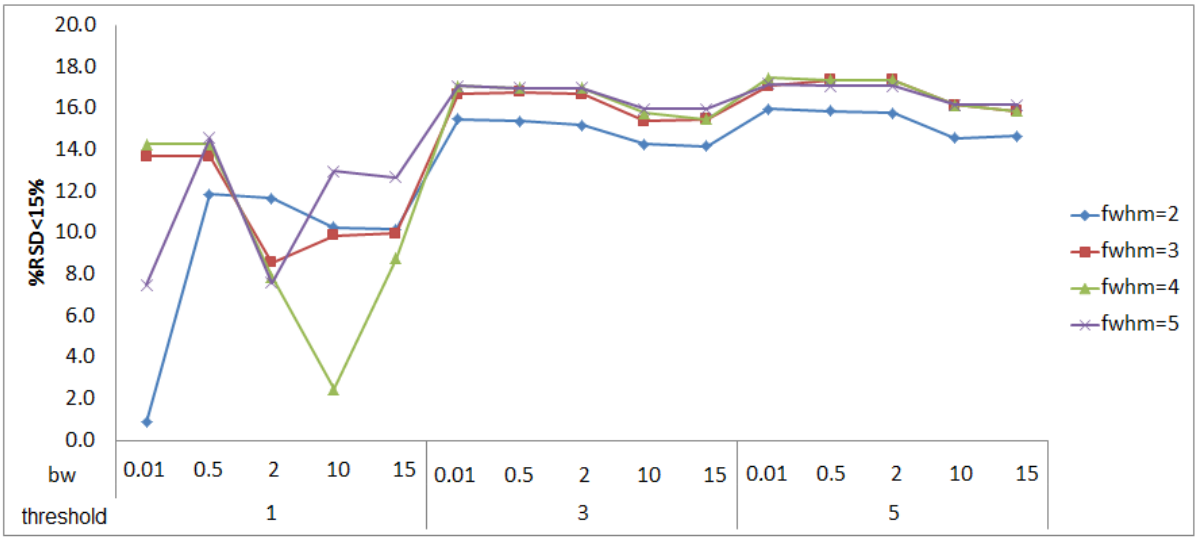


Figura 4.14. Influência dos valores de bw e threshold na porcentagem de RSD<15% com diferentes valores de fwhm.

Com relação aos *missing values* (Figura 4.15), os menores valores são com fwhm com valores de 3 a 5 usando threshold = 5 e bw menor que 2.

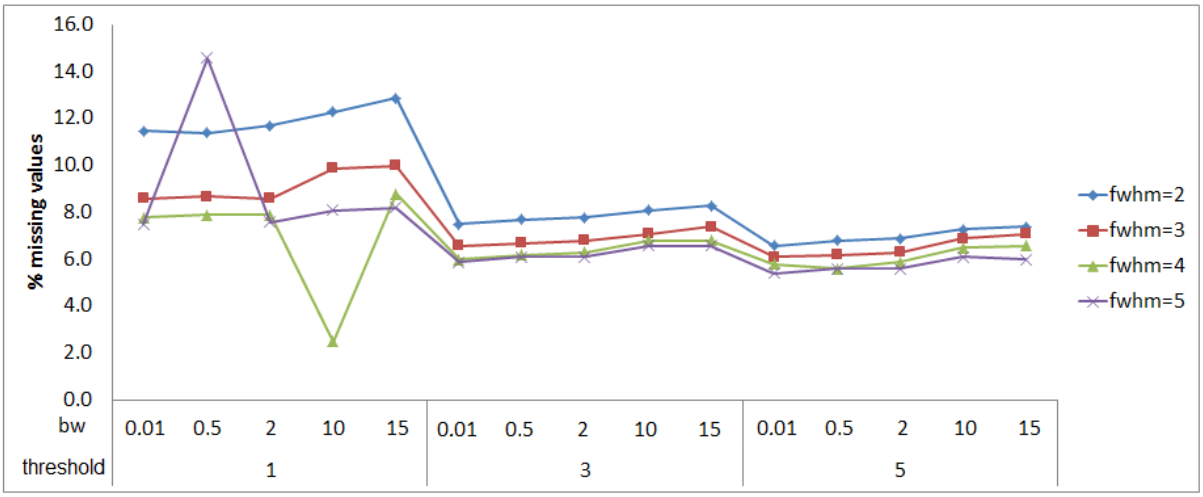


Figura 4.15. Influência dos valores de bw e threshold na porcentagem de missing values com diferentes valores de fwhm.

A porcentagem de features com RSD menor que 15% tendem a valores maiores quando utilizados *threshold* = 3 e 5, utilizando valores de fwhm = 4 e 5 com valores de bw entre 0,01 e 2,0 (Figura 4.16).

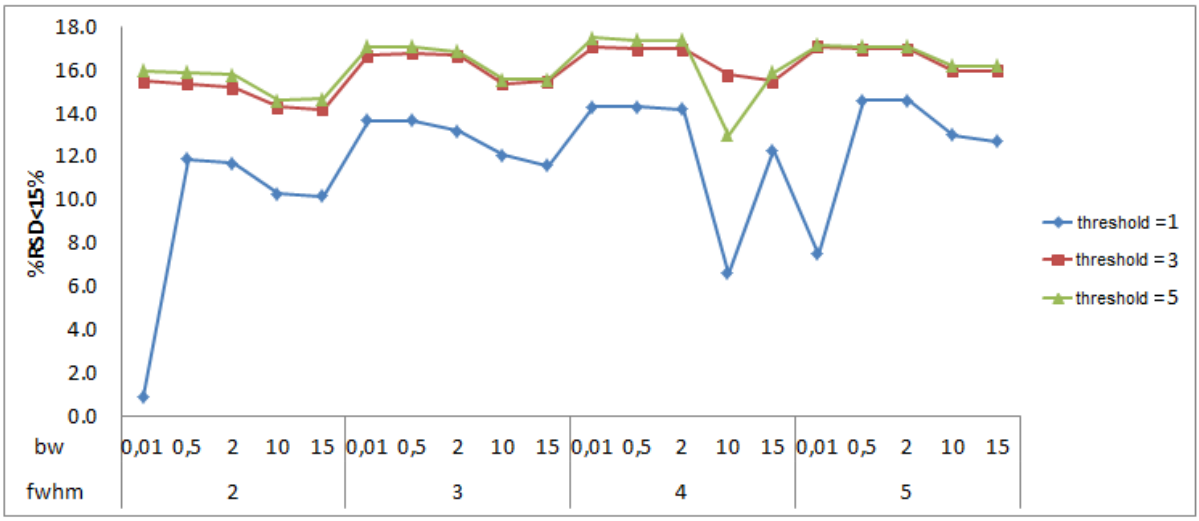


Figura 4.16. Influência dos valores de bw e fwhm na porcentagem de RSD<15% com diferentes valores de bw.

Quando observados os missing values a tendência é que os valores sejam menores quando fwhm = 4 e 5 e bw entre 0,01 e 2 (Figura 4.17).

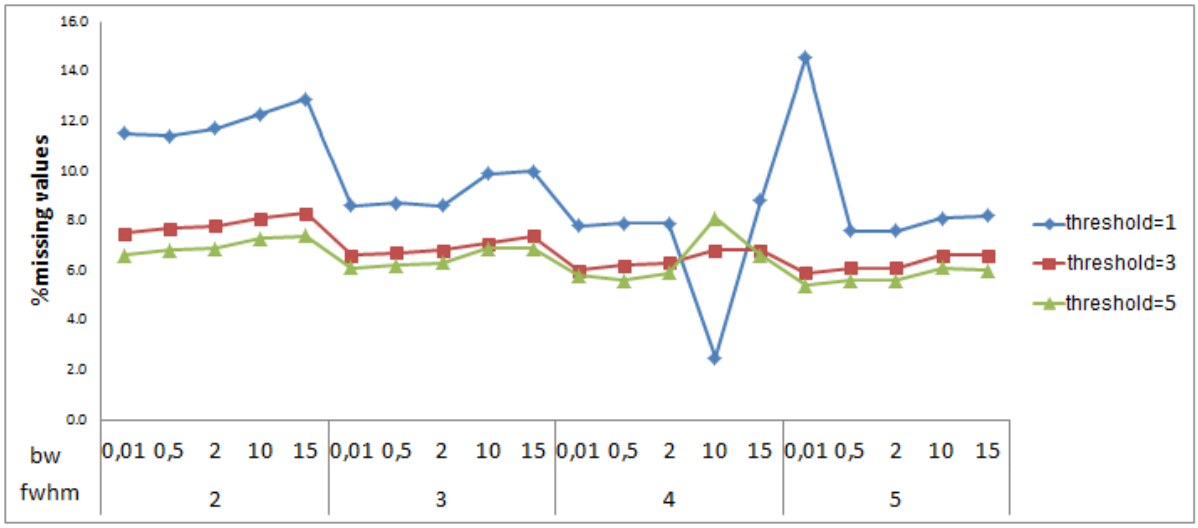


Figura 4.17. Influência dos valores de bw e fwhm na porcentagem de missing values com diferentes valores de bw.

A qualidade do resultado de cada combinação monitorada pelos números de *missing values*, quantidade de picos com RSD de intensidade

menor que 15%, e número de valores duplicados foi também analisada pela Equação 3, com cada um dos critérios com um valor ponderado.

Pontuação = (7xN1) - (5xN2) - (7xN3) - (7xN4) *Equação 3*

N1: % de features com RSD < 15%

N2: % de missing values

N3: % de valores duplicados

N4: % de variação no tempo de retenção

Foram consideradas adequadas as combinações com pontuações maior ou iguais a 65. Estas combinações obtiveram porcentagens baixas ou nulas de valores duplicados e *missing values* e valores relativamente altos de porcentagem de features com RSD de área abaixo de 15%. Além disso, para todas essas combinações os desvios de tempo de retenção são menores que 2% (Tabela 4.6).

As combinações que foram consideradas inadequadas tiveram relativamente poucos *molecular features* com RSD de área abaixo de 15%. A porcentagem de *missing values* e valores duplicados foram maiores (

Tabela ***4.7***). O número de combinações com desvio do tempo de retenção acima de 2% também foi maior em comparação com os valores que foram considerados adequados.

Tabela 4.6. Exemplos de combinações de valores de fwhm, bw e threshold (sn) com pontuações consideradas adequadas para aplicação no XCMS

Parâmetros	RSD<15(%)	*Missing values* (%)	Valores duplicados (%)	Desvio tr (%)	Pontuação
fwhm4_bw0,5_sn5	17,4	5,6	0,00	1,4	84,4
fwhm4_bw0,01_sn5	17,5	5,8	0,00	1,4	83,7
fwhm5_bw0,01_sn3	17,1	5,9	0,03	1	83,3
fwhm4_bw0,01_sn3	17,1	6,0	0,00	1	82,5
fwhm4_bw2_sn3	17,0	6,3	0,00	0,8	81,9
fwhm4_bw2_sn5	17,4	5,9	0,00	1,5	81,6
fwhm3_bw0,01_sn5	17,1	6,1	0,00	1,2	81,0
fwhm4_bw0,5_sn3	17,0	6,2	0,03	1,0	80,8
fwhm3_bw0,5_sn5	17,1	6,2	0,00	1,5	80,7
fwhm5_bw2_sn3	17,0	6,1	0,03	1,2	80,3

Tabela 4.7. Exemplos de combinações de valores de fwhm, bw e missing values com pontuações consideradas inadequadas para aplicação no XCMS

Parâmetros	RSD<15(%)	*Missing values* (%)	Valores duplicados (%)	Desvio tr (%)	Pontuação
fwhm3_bw4_sn5	15,9	6,8	0,2	30	-134,0
Fwhm2_bw0,01_sn1	0,9	11,5	0,2	0,4	-55,0
fwhm5_bw0,01_sn1	7,5	14,6	0,02	0,8	-26,7
fwhm2_bw25_sn1	10,2	12,9	1,1	3	-22,4
fwhm4_bw25_sn1	12,3	8,8	1,0	8	-20,7
fwhm2_bw_10_sn1	10,3	12,3	0,8	2	-8,6
fwhm2_bw7_sn1	10,3	13,0	0,7	1,5	-8,0
fwhm3_bw25_sn1	11,6	10,0	1,1	4	-4,8
fwhm2_bw5_sn3	14,2	8,7	0,4	8	-2,4
fwhm2_bw5_sn1	10,6	13,0	0,7	1	-2,4

Apesar de valores de bw < 1,0 terem pontuações altas, ao avaliar os cromatogramas, a maior parte dos picos tinham valores de bw em torno de 2,0, que somado à avaliação dos gráficos e tabelas, direcionou a decisão para adotar o valor de bw = 2. Assim, com base neste estudo foi possível concluir que a condição ótima para o tratamento dos dados utilizando XCMS foi utilizar valores de fwhm = 4, bw = 2 e threshold = 5.

4.2 Metabolômica

O estudo metabolômico foi realizado a partir das condições otimizadas de preparo de amostra desenvolvidas na primeira parte desta tese. No presente estudo, foram avaliados dois grupos de terapias aplicadas a pacientes transplantados compreendendo os regimes Tacrolimo, Prednisona e Everolimo (Grupo 1) e Tacrolimo, Prednisona e Micofenolato (Grupo 2).

As amostras de urina de cada paciente foram analisadas de forma randomizada e intercalada com amostras de controle de qualidade (QC), uma mistura de volumes iguais de todas as amostras em estudo, que é injetada no início, a cada 5 amostras e no final da batelada, para garantir a qualidade dos dados gerados.

As amostras de QC auxiliam na avaliação da estabilidade do instrumento durante as medidas e podem ser avaliadas por meio de um gráfico de escores de PCA, que indica a dispersão dos dados amostrais. Foram testados no software SIMCA alguns escalonamentos de dados, e o que mais se adequou foi a Unidade de Variância (UV), em que a escala é o desvio padrão. Assim, os metabólitos têm o desvio padrão igual a 1.

As amostras de QC devem se posicionar no centro do PCA. No entanto, como cada amostra de QC foi derivatizada individualmente, alguma dispersão entre as amostras QC, inerentes ao processo de preparo, podem ser observadas. Na Figura 4.18, são apresentados os modelos de PCA nos grupos 1 e 2. É possível observar maior dispersão entre os QCs nas amostras do grupo 1 (Figura 4.18a) do que nas amostras do grupo 2 (Figura 4.18b).

Antes de realizar a identificação dos metabólitos, foi feita uma análise das amostras do branco, para eliminação de contaminação de solvente ou coluna. Os metabólitos de todos os cromatogramas foram anotados.

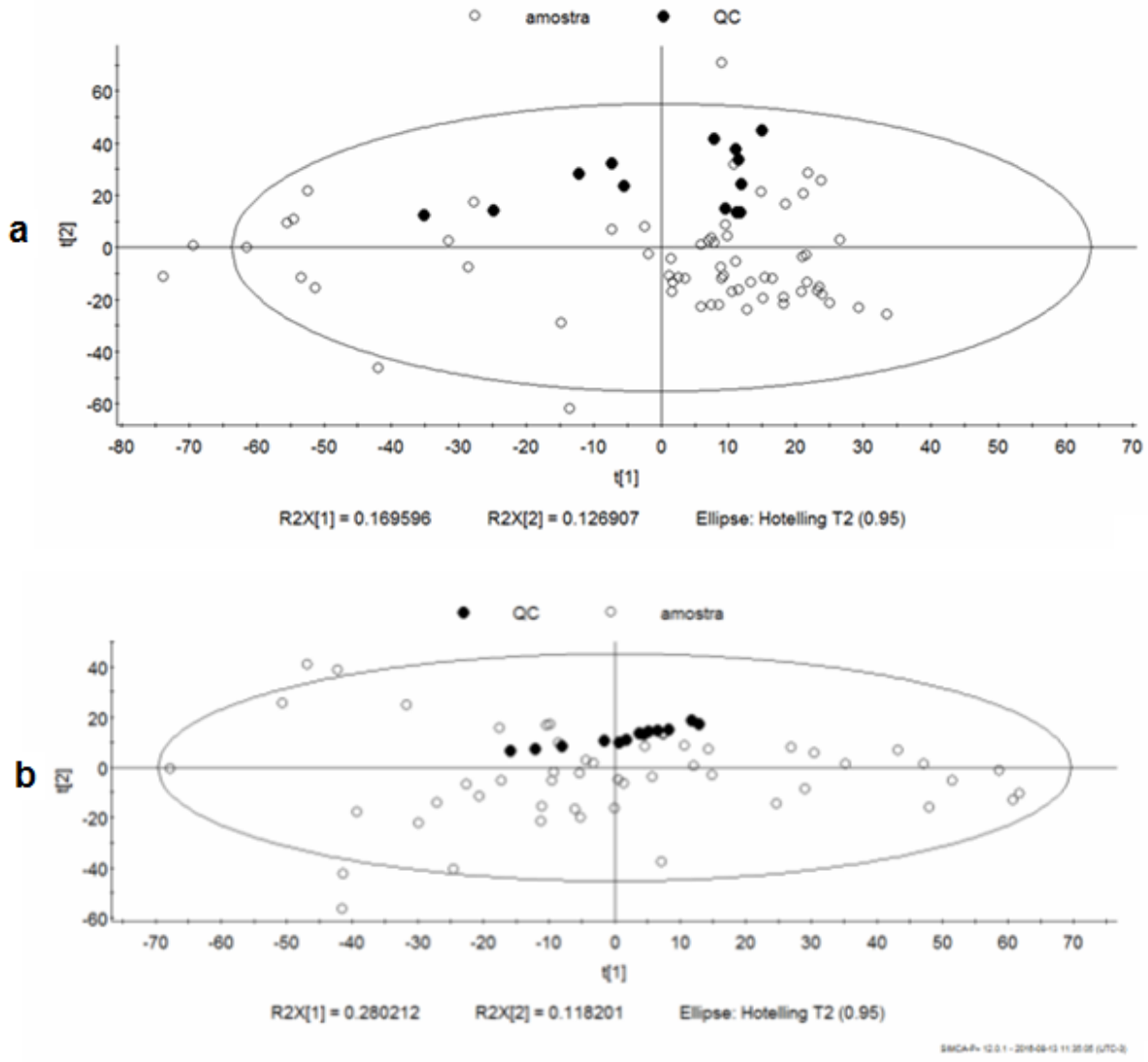


Figura 4.18. Gráfico de PCA de todas as amostras do Grupo 1. (a) com R^2: 0,30 e Q^2:0,20 e grupo 2 (b) com R^2: 0,40 e Q^2:0,32.

Outra maneira de avaliar a qualidade dos dados obtidos é utilizando um modelo de PLS-DA, construído a partir das amostras e prevendo a classe das amostras de QC. O comportamento dos QCs frente às amostras foi avaliado por meio de um gráfico de escores PLS-DA para a predição da classe das amostras de QC, Figura 4.19.

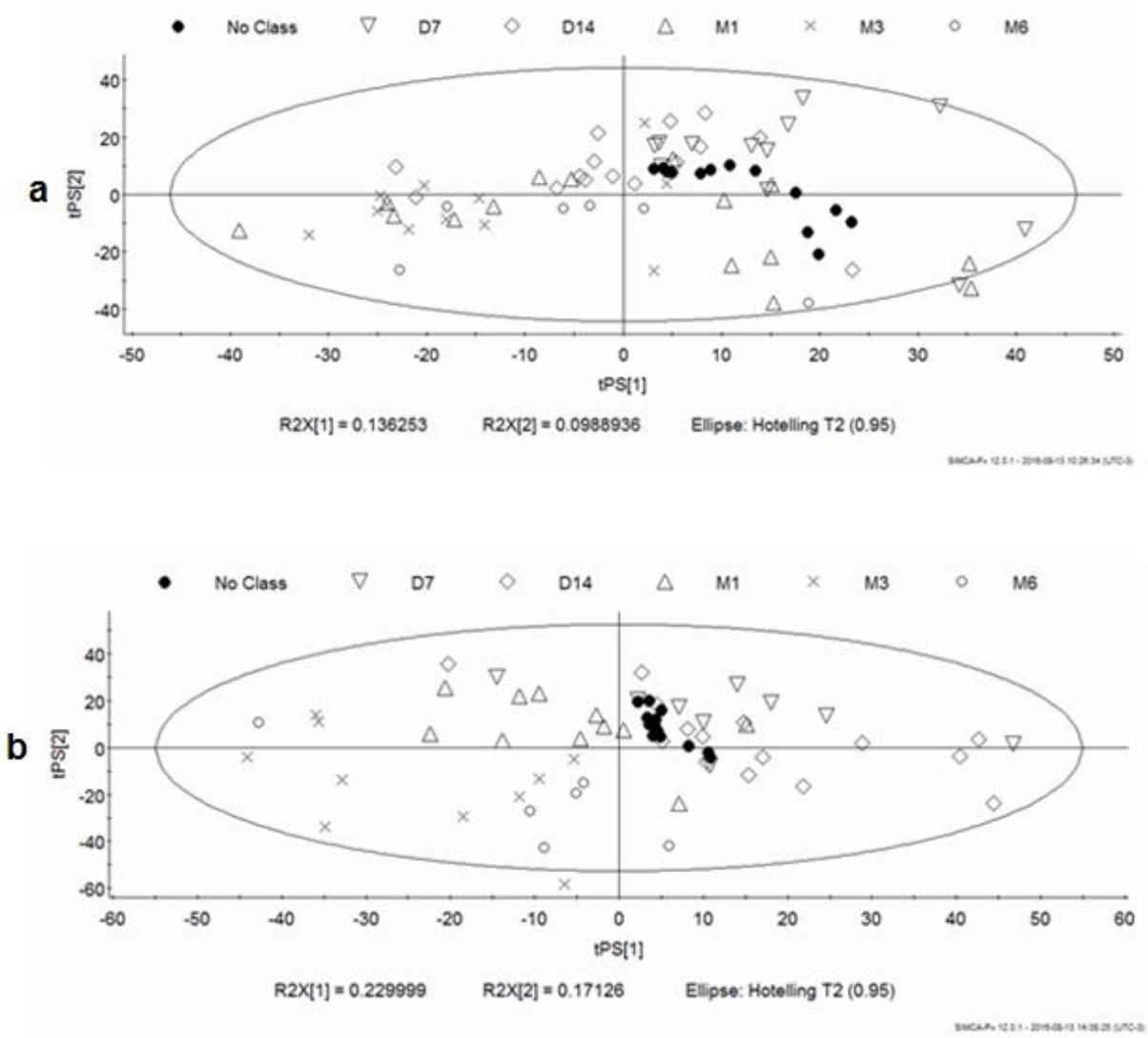


Figura 4.19. Modelo de PLS-DA construído com as todas as amostras, com predição das amostras de QC (●). a) Grupo 1. R^2: 0,16; Q^2 :0,00. b) Grupo 2, R^2: 0,23; Q^2: 0,13.

A abordagem do estudo dos dois grupos baseou-se inicialmente na comparação entre o dia 7 (D7) da terapia com os demais períodos, a saber: dia 14 (D14), mês 1 (M1), mês 3 (M3) e mês 6 (M6), com o objetivo de avaliar temporalmente a evolução dos metabólitos discriminantes. Adicionalmente, pretendeu-se comparar cada período adjacente de modo a compreender as diferenças entre dia 7 e dia 14, dia 14 e mês 1, mês 1 com mês 3, e mês 3 com mês 6. Finalmente, avaliar os metabólitos discriminantes de cada terapia nos dois grupos. Os dados foram reprocessados sem considerar as amostras de QC na etapa de alinhamento no programa XCMS.

No software AMDIS foi feita uma calibração para análise dos cromatogramas para deconvolução dos espectros. Os dados no formato

mzdata foram alinhados no programa R, utilizando o pacote XCMS. No final da análise, foi gerado um arquivo contendo os dados do alinhamento em uma tabela, com os valores de área correspondente a cada composto. Os valores obtidos pelos *molecular features* foram normalizados pela mediana. Todos os gráficos de análise multivariada estão no anexo desta Tese.

Inicialmente foi feita a comparação entre o dia 7 e o dia 14 do grupo 1 e grupo 2. A planilha com os valores foi analisada no software SIMCA. A análise não supervisionada (PCA) mostrou uma separação entre os dois grupos com valores de correlação (R^2) de 0,63 e predição (Q^2) de 0,52 para o grupo 1 e valores de correlação (R^2) de 0,56 e predição (Q^2) de 0,35 para o grupo 2. O modelo de PLS-DA, entretanto, teve valores de correlação (R^2) de 0,70 e predição (Q^2) de 0,44 para o grupo 1 e (R^2) de 0,78 e predição (Q^2) de 0,40 para o grupo 2, valores baixos para o modelo, o que significa sua pouca eficácia em diferenciar os dois grupos.

Comparando-se o dia 7 com mês 1, os valores de correlação e predição do modelo de PLS-DA também não foram satisfatórios na diferenciação dos dois grupos, de forma análoga à análise de D7xD14.

A partir do mês 3, para o grupo 1 o valor de correlação (R^2) foi de 0,81 e predição (Q^2) de 0,74; para o grupo 2 o valor de correlação (R^2) foi de 0,80 e predição (Q^2) de 0,70.

Como pode ser observado na Figura 4.20, o gráfico de escores de PCA mostra a separação entre o dia 7 e mês 6 do grupo 1. Apesar da dispersão das amostras do dia 7, o modelo é capaz de separar os dois grupos no gráfico.

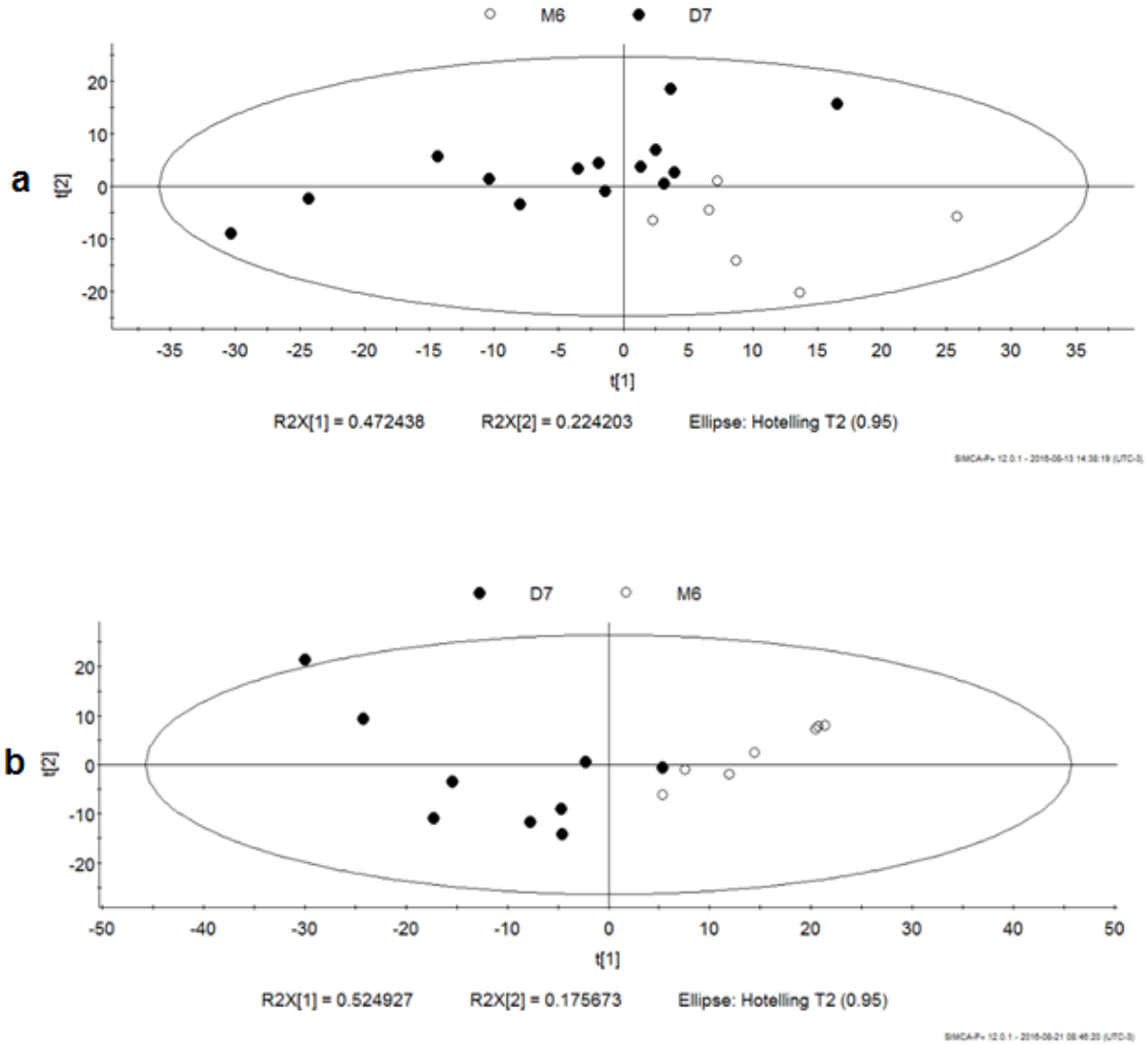


Figura 4.20. Gráficos de scores obtidos por PCA da comparação entre o Dia 7 e Mês 6. a) Grupo 1: R^2: 0,70; Q^2: 0,54. b) Grupo 2: R^2: 0,70 e Q^2: 0,58.

O gráfico de scores obtido por PLS-DA pode ser observado na Figura 4.21.

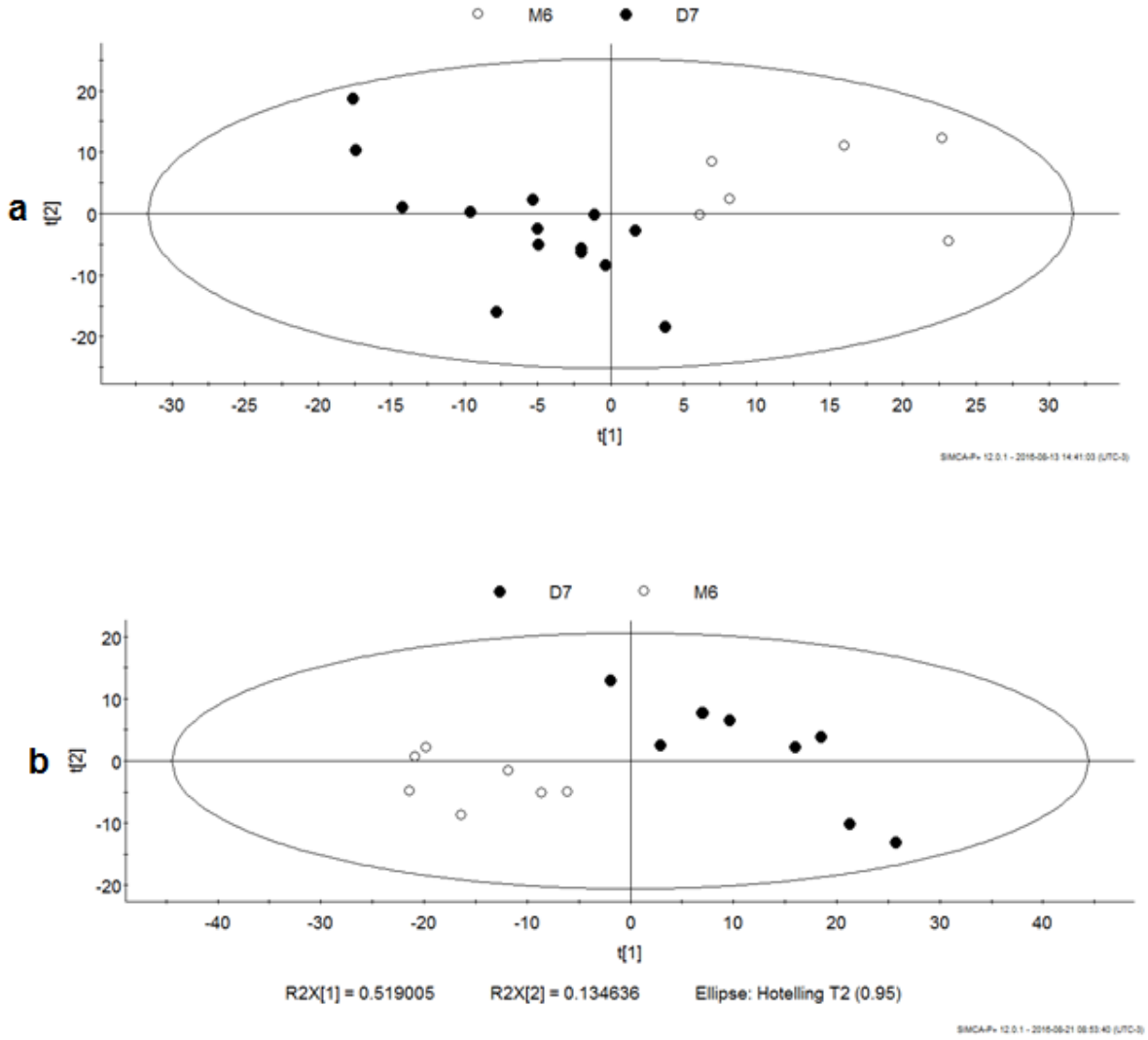


Figura 4.21. Gráfico de scores obtido por PLS-DA da comparação entre o dia 7 e mês 6. a) Grupo 1: R^2: 0,90; Q^2:0,77. b) Grupo 2: R^2: 0,90, Q^2: 0,80.

Com o objetivo de validar o modelo de PLS-DA, foram realizadas 100 permutações após as quais se tem um valor estimado de R^2 e Q^2 que indicarão se a diferença entre dois grupos é significativa. Nesta validação a matriz de dados X é fixa, permutando os elementos da matriz resposta Y 100 vezes. Em cada permutação é gerado um modelo de PLS. Para este caso o valor estimado deve ser menor quando comparado com o valor do modelo. No gráfico gerado, o eixo vertical fornece os valores de R^2 e Q^2 de cada modelo gerado nas permutações. O eixo horizontal fornece informações da correlação entre o modelo sem modificar, ou seja, sem permutar e o modelo permutado.

Como pode ser observado pela Figura 4.22, os valores são menores, validando o modelo para os dois grupos[121].

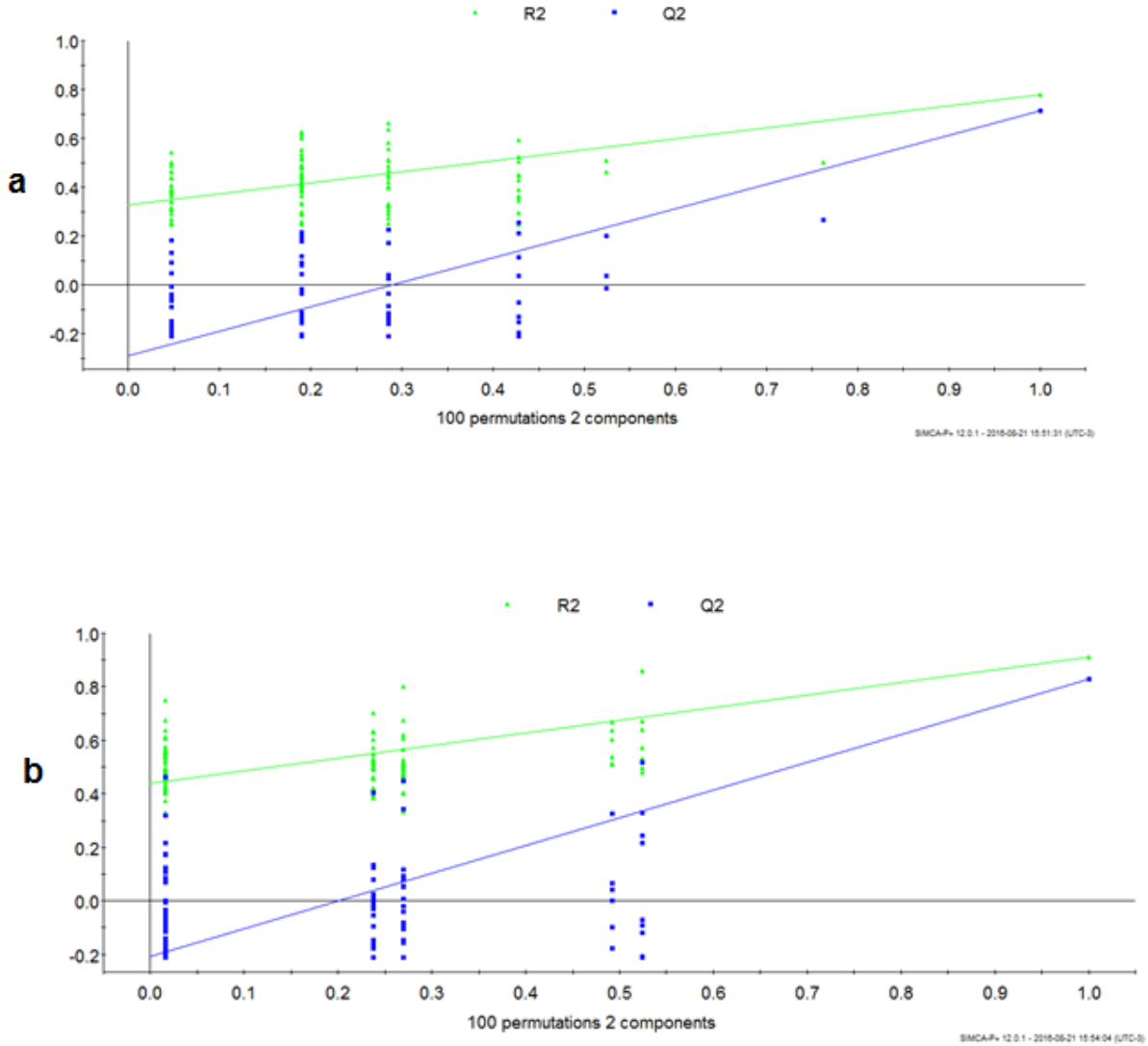


Figura 4.22. Gráfico da validação do modelo de PLS-DA pelo teste de permutação (100 permutações). R2(▲) e Q2 (■). a. Grupo1; b. Grupo 2.

O modelo foi também avaliado pelo CV-ANOVA no programa SIMCA, a partir do qual realiza-se o teste F e obtém-se *p*-valor. Pelo teste F pode-se avaliar se o modelo possui resíduos preditivos menores que a variação global em torno da média. O *p*-valor corrobora com o teste F indicando que este é um resultado do acaso, sendo mais um indicativo de que o modelo de PLS-DA é

[121] Eriksson, L.; Trygg, J.; Wold, S.; *J. Chemom.*; **2008**, 22, 594.

válido. Os valores estão descritos na Tabela 4.8 para o grupo 1 e Tabela 4.9 para o grupo 2.

Tabela 4.8. CV-ANOVA para o modelo PLS-DA obtido a partir do SIMCA para o grupo 1

	Soma dos quadrados dos resíduos	Graus de liberdade	Variância	F	p	desvio padrão
Correlação total	19	19	1,00			1
Regressão	13,99	4	3,50	10,48	$2{,}96.10^{-4}$	1,87
Residual	5,01	15	0,33			0,58

Tabela 4.9. CV-ANOVA para o modelo PLS-DA obtido a partir do SIMCA para o grupo 2

	Soma dos quadrados dos resíduos	Graus de liberdade	Variância	F	p	desvio padrão
Correlação total	15	15	1			1
Regressão	12,28	4	3,07	12,42	$4{,}6.\ 10^{-4}$	1,75
Residual	2,72	11	0,25			0,50

Também foi construído um modelo de OPLS-DA para avaliar mais facilmente as variáveis responsáveis pela separação dos grupos do dia 7 e mês 6 dos Grupos 1 e 2. No entanto, poucos discriminantes com valores significativos foram encontrados. Deste modo, optou-se por retirar os discriminantes pelos valores de VIP que demonstram o quanto uma variável, neste caso *molecular features*, influencia no modelo. Valores de VIP maior que 1,0 foram considerados significativos[122].

Na Tabela 4.10 é possível visualizar os gráficos de escores de PLS-DA em cada período, tendo como referência o dia 7. Os metabólitos discriminantes entre os grupos foram extraídos pelo modelo de PLS-DA com valores de VIP superiores a 1,0.

A partir do mês 3, já é possível discriminar os grupos, sendo a partir da comparação entre os dias 7 com mês 3 e mês 6 que serão feitas as avaliações dos metabólitos discriminantes.

[122] Li, Y.; Wang, Y.; Su, L.; Li, L.; Zhang, Y.; *Chem. Cent. J.;* **2013**, *7*, 36.

A comparação temporal do Grupo 2 pode ser visualizada na Tabela 4.11. Entre os períodos não foram obtidos valores de significativos (p-valor e teste F), o que demonstra que não houve uma evolução clara de um período a outro a ponto de discriminar os grupos.

Tabela 4.10. *Gráficos de scores de PLS-DA dos grupos 1 e 2 de todos os períodos comparados com o Dia 7*

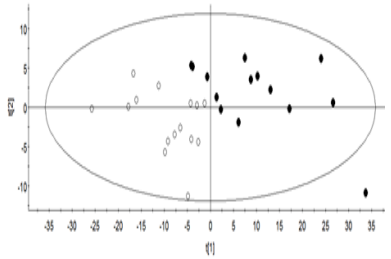
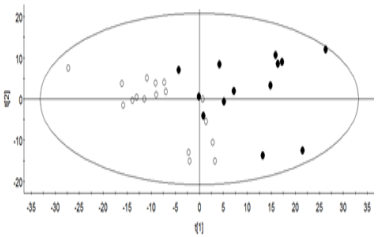
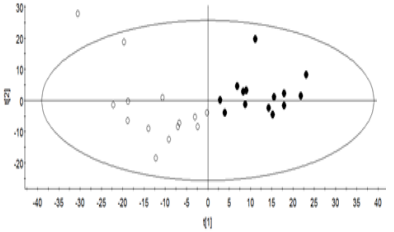
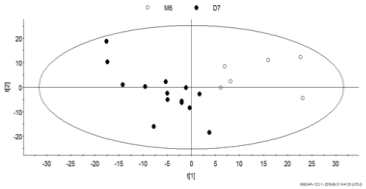
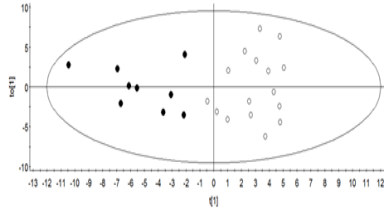
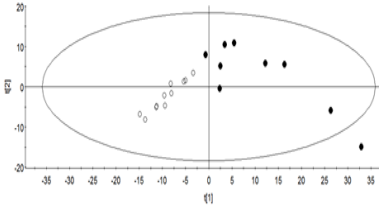
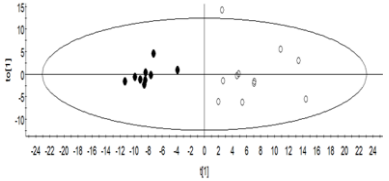
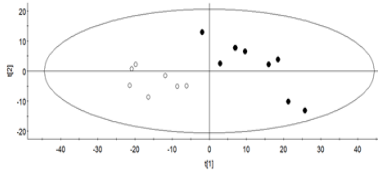
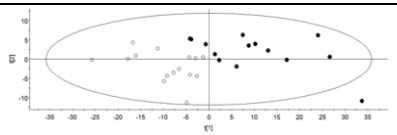
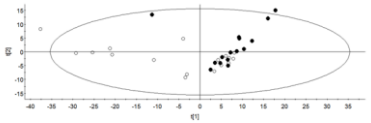
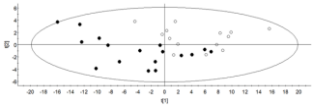
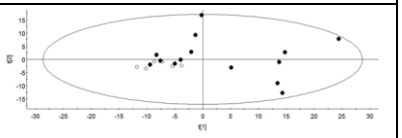
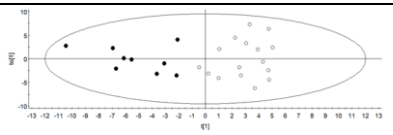
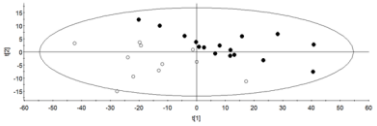
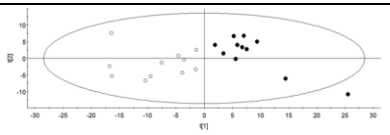
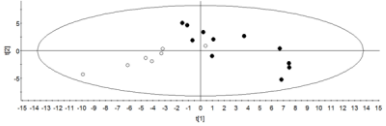
Grupo		D7xD14	D7XM1	D7XM3	D7XM6
Grupo 1	PLS-DA				
	R^2	0,70	0,63	0,81	0,90
	Q^2	0,44	0,50	0,74	0,77
Grupo 2	PLS-DA				
	R^2	0,78	0,78	0,80	0,90
	Q^2	0,40	0,67	0,70	0,80

Tabela 4.11. *Gráficos scores de PLS-DA dos grupos 1 e 2 de comparação temporal*

Grupo		D7xD14	D14XM1	M1XM3	M3XM6
Grupo 1	PLS-DA				
	R^2	0,70	0,38	0,55	0,49
	Q^2	0,44	0,27	0,27	0,23
Grupo 2	PLS-DA				
	R2	0,78	0,61	0,78	0,67
	Q2	0,40	0,34	0,66	0,53

A interpretação dos resultados obtidos dos metabólitos discriminantes foi baseada nos bancos de dados HMDB e KEGG e as respectivas funções biológicas foram inseridas nas Tabelas 4.12 a 4.15. Para identificação dos metabólitos no AMDIS foram utilizadas as bibliotecas da NIST e Fiehnlib. Para a biblioteca Fiehnlib, foram seguidos os seguintes critérios de identificação: mínimo match factor = 60, NET > 80 e Weighted > 80. A identificação dos metabólitos foi limitada às bibliotecas disponíveis. Portanto, muitos metabólitos discriminantes não foram identificados.

Foi também calculado o *fold change* a partir da relação entre as médias das intensidades normalizadas[123] entre os dois grupos comparados (Tabelas 4.12 e 4.13).

No grupo 1, foram obtidos 22 picos discriminantes na comparação entre o dia 7 e mês 3, dos quais foi possível identificar 9 compostos. Na comparação entre o dia 7 e mês 6 foram obtidos 29 picos discriminantes, sendo possível identificar 7 compostos.

No grupo 2, os metabólitos discriminantes foram evidenciados a partir do mês 3. Foram identificados 4 na comparação entre o dia 7 e mês 3. Na comparação com o mês 6, foram obtidos 28 discriminantes, sendo identificados 13 metabólitos.

[123] Reinke, S.N.; Gallart-Ayala, H.; Gómez, C.; Checa, A.; Fauland, A.; Naz, S.; Kamleh, M.A.; Djukanović, R.; Hinks, T.S.; Wheelock, C.E.; *Eur. Respir. J.*; **2017**, 29; 49.

Tabela 4.12. *Metabólitos discriminantes do Grupo 1 do dia 7 comparado ao mês 3*

Molecular feature (*m/z/RT*)	**Identificação**	**VIP score**	***p*-value**	***Fold change***	**Via metabólica ou metabolismo**
202/1136	*N*-acetil-*D*-manosamina	1,4	$2,0.10^{-4}$	+2,52	• Aminoaçúcares • Nucleotídeos
116/590	glicerol	1,3	$1,2.10^{-3}$	+2,78	• Pentose • Galactose • Glicerolipídeo • Regulação de lipólise em adipócitos
239/608	catecol	1,3	$2,9.10^{-4}$	+4,18	• Degradação de benzoato • Degradação de compostos aromáticos
177/533	ácido succínico	1,2	$2,9.10^{-3}$	+4,7	• Ciclo de Krebs • Alanina, aspartato, glutamato, tirosina, fenilalanina • Piruvato • Glioxalato e dicarboxilato
103/877	açúcar não especificado	1,2	$1,3.10^{-3}$	+2,33	• Carboidrato
217/764	poliol não especificado	1,2	$3,3.10^{-3}$	+1,99	• Carboidrato
335/1006	ácido quínico	1,1	$1,1.10^{-2}$	+2,92	• Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano
205/397	ácido glicólico	1,0	$8,4.\ 10^{-3}$	+3,44	• Glioxalato e dicarboxilato
231/863	ácido fumárico	1,0	$1,1.10^{-2}$	+1,91	• Ciclo de Krebs • Biossíntese da arginina, alanina, aspartato, glutamato, tirosina, fenilalanina.

Tabela 4.13. *Metabólitos discriminantes do Grupo 2 do dia 7 comparado ao mês 3*

Molecular feature (*m/z/RT*)	**Identificação**	**VIP score**	***p-value***	**Fold change**	**Via metabólica ou metabolismo**
131/387	Ácido hidróxido butírico	1,2	$1,2.10^{-3}$	+3,68	• Síntese e degradação de corpos cetônicos • Butanoato
117/590	Glicerol	1,0	$1,2.10^{-3}$	+2,51	• Pentose • Galactose • Glicerolipídeo • Regulação de lipólise em adipócitos
297/981	Ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico	1,0	$1,6.10^{-3}$	+2,71	• Tirosina
103/877	Açúcar não especificado	1,0	$7,1.10^{-4}$	+3,39	• Carboidrato

Tabela 4.14. *Metabólitos discriminantes do Grupo 1 do dia 7 comparado ao mês 6*

Molecular feature (*m/z/RT*)	**Identificação**	**VIP score**	***p-value***	**Fold change**	**Via metabólica ou metabolismo**
251/674	Hidroquinona	1,4	$1,0.10^{-3}$	-3,35	• Tirosina • Degradação do benzoato • Degradação de aminobenzoato • Metabolismo da riboflavina
116/590	Glicerol	1,4	$1,6.10^{-2}$	+2,65	• Pentose • Galactose • Glicerolipídeo • Regulação de lipólise em adipócitos
202/1136	*N*-acetil-*D*-manosamina	1,3	$2,8.10^{-2}$	+2,32	• Aminoaçúcares • Nucleotídeos
231/863	Ácido fumárico	1,2	$1,3.10^{-2}$	+1,86	• Ciclo de Krebs • Biossíntese da arginina, alanina, aspartato, glutamato, tirosina, fenilalanina.
160/1019	Açúcar não identificado	1,2	$3,0.10^{-2}$	+1,64	• Carboidrato
335/1006	Ácido quínico	1,1	$4,0.10^{-2}$	+2,26	• Biossíntese de

					fenilalanina, tirosina e triptofano
177/533	Ácido succínico	1,0	$3{,}0.10^{-3}$	+2,3	• Ciclo de Krebs • Alanina, aspartato, glutamato, tirosina, fenilalanina • Piruvato • Glioxalato e dicarboxilato

Tabela 4.15. *Metabólitos discriminantes do Grupo 2 do dia 7 comparado ao mês 6*

Molecular feature (*m/z/RT*)	**Identificação**	**VIP score**	***p-value***	**Fold change**	**Via metabólica ou metabolismo**
147/396	Ácido glicólico	1,3	$4{,}3.10^{-3}$	+4,78	• Glioxalato e dicarboxilato
179/546	Benzoato	1,3	$3{,}2.10^{-2}$	+1,85	• Metabolismo da fenilalanina
131/387	Ácido hidroxibutírico	1,2	$2{,}2.10^{-3}$	+4,03	• Síntese e degradação de corpos cetônicos • Metabolismo do butanoato
103/877	Açúcar não especificado	1,2	$1{,}8.10^{-4}$	+2,75	• Carboidratos
117/590	Glicerol	1,2	$2{,}6.10^{-3}$	+3,10	• Pentose • Galactose • Glicerolipídeo • Regulação de lipólise em adipócitos
202/1136	*N*-acetil-*D*-manosamina	1,1	$2{,}1.10^{-3}$	+2,43	• Aminoaçúcares • Nucleotídeos
179/978	Hipurato	1,1	$1{,}2.10^{-2}$	+2,20	• Metabolismo da fenilalanina
204/901	Lactona do ácido glicônico	1,1	$2{,}0.10^{-2}$	+2,65	• Via das pentose fosfato
147/473	Ácido malônico	1,1	$1{,}5.10^{-3}$	+2,62	• Pirimidina
113/748	Ácido acetamido butírico	1,1	$1{,}3.10^{-2}$	+3,29	• Metabolismo de arginina e prolina
103/1013	Açúcar não especificado	1,0	$2{,}0.10^{-2}$	+3,10	• carboidrato
255/1006	Ácido quínico	1,0	$3{,}2.10^{-2}$	+2,88	• biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano

4.3 Metabólitos e vias metabólicas afetadas

4.3.1 Metabolismo de carboidratos

Tanto no grupo 1 quanto no grupo 2 foram observadas perturbações no metabolismo energético. Foram encontradas quantidades superiores de glicerol nas amostras coletadas após 3 e 6 meses de tratamento quando comparadas ao dia 7. No grupo 1, o valor aumentado não difere significativamente entre os meses 3 e 6, diferente do grupo 2, cujo valor aumentado foi de 2,3 vezes no mês 3 para 3,1 vezes no mês 6. O glicerol atua como precursor do glicerol-3-fosfato, forma fosforilada desta molécula pela enzima glicerol quinase, fornecendo sua estrutura na gliconeogênese como bloco construtor, além da possibilidade de ser esterificado na biossíntese de triglicerídeos. Durante a lipólise, é liberado junto com os ácidos graxos na corrente sanguínea como fonte de energia[124].

Teores alterados de glicerol 3-fosfato foram relatados em lesão de isquemia- reperfusão hepática em modelos de ratos[125]. Em outro trabalho, observou-se que ratos com sepse severa possuíam teores diminuídos de glicerol na urina em relação a ratos saudáveis[126]. A maior parte dos estudos metabolômicos de lesão de isquemia-reperfusão tem se baseado na utilização de modelos animais (principalmente ratos) usando RMN^{1}H[127,128,129]. Estes estudos têm demonstrando níveis elevados de citrato, dimetilamina, lactato e acetato na urina e níveis aumentados de 50 a 100 vezes do normal de alantoína e trimetilamina-*N*-óxido (TMAO) no sangue.

Diferente do grupo 1, no grupo 2 foi observado um aumento da lactona do ácido glicônico no mês 6, composto pertencente à via das pentose fosfato e formado a partir da oxidação da glicose e posterior esterificação.

---

124 Nelson, J.L.; Harmon, M.E.; Robergs, R.A.; *J. Anal. Toxicol.*; **2011**, 35, 617.

125 Chen, L.; Luo, Z.; Fu, W.; Liao, X.; Cui, Z.; Zhou, J.; *Disease Markers*; **2013**, 35, 345.

126 Wang, Z.; Wu, B.; Weng; J.; Sun, F.; Zeng, M.; Cherukury, H.; Wang, X.; Wen, C.; Chen, C.; *Int.J. Clin. Exp. Med.*; **2016**, 9, 6551.

127 Serkova, N.; Fuller, T.F.; Klawitter, J.; Freise, C.E.; Niemann, C.U.; *Kidney Int.*; **2005**, 67, 1142.

128 Fuller, T.F.; Serkova, N.; Niemann, C.U.; Freise, C.E.; *J. Urol.*; **2004**, 171, 1296.

129 Hauet, T.; Baumert, H.; Gibelin, H.; Hameury, F.; Goujon, J.M.; Carretier, M.; Eugene, M.; *Criobiol.*; **2000**, 41, 280.

Nos dois grupos também foram encontrados um ou mais açúcares da classe das aldoses ou hexoses a partir do mês 3, quando comparado com o dia 7, que por serem moléculas com estruturas muito semelhantes não puderam ser diferenciadas por seu espectro de massa, tendo sido fornecida pela biblioteca mais de um composto possível para um mesmo *molecular feature*. Porém, pode ser sugerido que a via metabólica envolvida é também relacionada com o metabolismo energético. A presença de açúcares na urina, em pessoas que não possuem problemas renais pode estar associada com o desenvolvimento de diabetes. No entanto, em caso de nefrotoxicidade, devido à perturbação dos túbulos renais, pode ocorrer a excreção desta classe de compostos[130].

Também houve um aumento de *N*-acetil-*D*-mannosamina na população do grupo 1 nos meses 3 e 6, sendo constante nos dois períodos (aumento de 2,5 no mês 3 e 2,3 no mês 6). No grupo 2, este metabólito é encontrado em condições aumentadas apenas no mês 6 em 2,4 vezes. Este metabólito é um precursor do ácido neuramínico, substrato da síntese do ácido siálico. Na literatura, esta mudança metabólica pode ser explicada pela atividade da enzima GNE na via desialilação no tecido renal, cuja atividade reduzida pode causar doenças renais [131].

4.3.2 Polióis

Assim como na identificação de açúcares, não foi possível discriminar o poliol por meio do espectro de massas, por ter sido sugerido mais de um composto nas bibliotecas de identificação. Essa classe de metabólitos foi discriminante apenas no grupo 1, quando comparado o dia 7 com mês 3, que teve seu valor aumentado aproximadamente 2 vezes. No entanto, este metabólito não é mais discriminante no mês 6, sugerindo que o quadro metabólico destes pacientes tenha se estabilizado para este tipo de composto.

130 Ghiculescu, R.A.; Kubler, P.A.; *Am. J. Kidney Dis.*; **2006**, 48, e89.

131 Galeano, B.; Klootwijk, R.; Manoli, I.; Sun, M.; Ciccone, C.; Darvish, D.; Starost, M.; Zerfas, P.; Hoffmann, V.; Hoogstraten-Miller, S.; Krasnewich, D.; Gahl, W.; Huizing, M.; *J. Clin. Invest.*; **2007**, 117, 1585.

Em uma referência, a alteração de polióis na literatura foi relatada em crianças com doença renal crônica[132].

4.3.3 Ciclo de Krebs

Este ciclo foi afetado no grupo 1, pela observação do fumarato, que teve seu teor aumentado aproximadamente 1,9 vezes nos meses 3 e 6. O fumarato teve sua concentração aumentada 4,7 vezes no mês 3 e 2,3 vezes no mês 6.

4.3.4 Corpos cetônicos

Em estudo elaborado por Serkova e Christians[133] foram investigados os efeitos metabólicos da ciclosporina sozinha e em combinação com sirolimo ou everolimo, para determinar se a combinação terapêutica alterou os efeitos nefrotóxicos da ciclosporina em ratos. A análise dos dados espectrais de RMN^{1}H derivados do sangue mostrou que o tratamento apenas com ciclosporina resultou em um aumento dos níveis de glicose, hidroxibutirato, creatina, creatinina, TMAO, colesterol e uma diminuição da concentração de glutationa.

O grupo 2 também apresentou como metabólito discriminante, diferente do grupo 1, o ácido hidroxibutírico, assim como no estudo de Serkova. Os níveis deste metabólito apresentaram-se aumentados 3,7 vezes no mês 3 e 4 vezes no mês 6. O hidroxibutirato é um corpo cetônico, que juntamente com o acetoacetato, é transportado aos tecidos e convertido em acetil CoA, sendo oxidado no ciclo de Krebs.

4.3.5 Metabolismo de aminoácidos

Em outro estudo com ciclosporina, Lenz *et al*. (2004)[134] analisaram amostras de urina e detectaram metabólitos em concentrações elevadas de glicose, acetato, succinato, trimetilamina e quantidades reduzidas de TMAO usando RMN^{1}H. Por HPLC-MS foram detectados ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiônico, ácido hipúrico e indicana.

---

132 Vanlede, K.; Leo, A. J.; Kluijtmans, M.L.; Levtchenko, E.; *Pediatric Nephrol.*; **2015**, 30, 1537.

133 Serkova, N.J.; Christians, U.; *Ther. Drug. Monit.*; **2005**, 27, 733.

134 Lenz, E.M.; Bright, J.; Knight, R.; Wilson, I.D.; Major, H.; *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*; **2004**, 35, 599.

No grupo 2 foi observado um aumento do ácido hipúrico (2,2 vezes), ácido acetamido butírico (3,3 vezes) e ácido benzóico (1,9 vezes) no mês 6 em relação ao dia 7. O ácido hipúrico é formado pela conversão do benzoato em complexo benzoila-Coa, que se liga com a glicina para formar o hipurato. O ácido hipúrico tem sido associado na literatura com exposição a compostos aromáticos, degradação de proteínas ingeridas ou metabolização pela flora intestinal do ácido quínico, metabólito alterado nos dois grupos (aumentado em 2,9 vezes nos meses 3 e 6 no grupo 1 e 2,9 vezes no mês 6 do grupo 2), sendo sua presença na urina, derivado de um metabolismo endógeno ou exógeno. Outro metabólito associado à exposição a compostos aromáticos é o catecol[135], que se apresentou em teor aumentado no mês 3 em comparação ao mês 6 do grupo 1.

O ácido quínico é um ciclitol envolvido na biossíntese de aminoácidos essenciais como triptofano, fenilalanina e tirosina, sendo a microflora intestinal responsável pelo metabolismo deste ácido em ácido hipúrico. O ácido quínico foi observado também em pacientes com câncer de próstata[136].

O ácido vanilil mandélico (4-hydroxy-3-methoxy-mandelic acid) também está envolvido no metabolismo da tirosina, sendo um derivado da epinefrina e norepinefrina[137]. Este metabólito aparece em teor aumentado no grupo 2, na comparação entre o dia 7 e mês 3, não sendo mais discriminante no mês 6.

4.3.6 Metabolismo do glioxalato e degradação da glicina

O ácido glicólico, junto com o ácido ascórbico e glioxílico são precursores do ácido oxálico[138], sendo o glicolato descrito na literatura relacionado com o possível diagnóstico de hiperoxaluria tipo 1 (produção aumentada de ácido oxálico) em pacientes em diálise[139]. No grupo 1 este

135 Snyder, R.; Hedli, C.C.; *Environ. Health Perspect.*; **1996**, 104, 1165.

136 Sreekumar, A., Poisson, L.M.; Rajendiran, T.M.; Khan, A.P.; Cao, Q.; Yu, J.; Laxman, B.; Mehra, R.; Lonigro, R.J.; Li, Y.; Nyati, M.K.; Ahsan, A.; Kalyana-Sundaram, S.; Han, B.; Cao, X.; Byun, J.; Omenn, G.S.; Ghosh, D.; Pennathur, S.; Alexander, D.C.; Berger, A.; Shuster, J.R.; Wei, J.T.; Varambally, S.; Beecher, C.; Chinnaiyan, A.M.; *Nature*; **2009**, 12, 910.

137 Magera, M.J.; Thompson, A.L.; Matern, D.; Rinaldo, P.; *Clin. Chem.*; **2003**, 49, 825.

138 Ogawa, Y.; Machida, N.; Jahana, M.; Gakiya, M.; Chinen, Y.; Oda, M.; Makoto, M.; Sugaya, K.; *Front. Biosc*.; 2004, 9,2901.

139 Marangella, M.; Petrarulo, M.; Bianco, O.; Vitale, C.; Finocchiar, P.; Linari; F.; *Kidney Intern.*; **1991**, 39, 149.

metabólito teve sua intensidade aumentada no mês 3. Porém, no mês 6 não foi um metabólito discriminante. No grupo 2, o ácido glicólico aparece aumentado em aproximadamente 4,8 vezes no mês 6.

4.3.7 Metabolismo de xenobióticos

O catecol foi encontrado no grupo 1 como metabólito discriminante apenas na comparação entre o dia 7 e mês 3. Este composto é descrito na literatura como metabólito proveniente da metabolização do benzeno[140]. Outro metabólito discriminante pertencente ao grupo 1 e, envolvido no metabolismo de fenilalanina e tirosina, foi a hidroquinona.

4.3.8 Visão geral dos metabólitos discriminantes

Os metabólitos afetados nos dois grupos de estudo podem ser visualizados na Figura 4.23, que mostra as diferenças e similaridades entre os grupos.

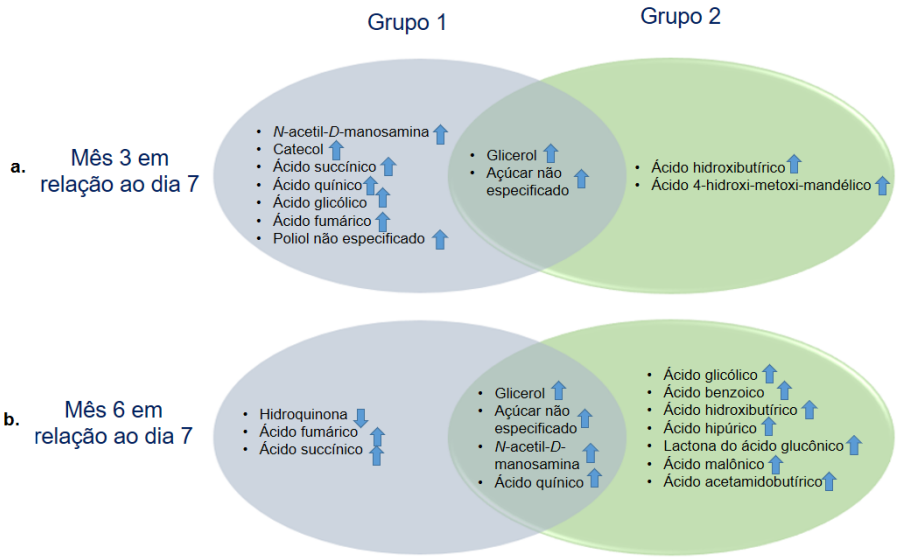


Figura 4.23. Visão geral das diferenças entre os metabólitos do grupo 1 (em azul) e grupo 2 (em verde) na comparação entre o dia 7 e mês 3 (a) e dia 7 e mês 6.

140 Rappaport, S.M.; Kim, S.; Lan, Q.; Vermeulen, R.; Waidyanatha, S.; Zhang, L.; Li, G.; Yin, S.; Hayes, R.B.; Rothman, N.; Smith, M.T.; *Environ. Health Perspect.*; **2009**, 117, 946.

Uma comparação com a literatura pode ser visualizada na Tabela 4.16.

Tabela 4.16. *Comparação com estudos publicados na literatura*

Metabólito	Modelo	Biofluido	Estudo	Técnica	Este estudo	Referência
glicerol	humanos	urina	sepse severa	GC-MS	grupos 1 e 2	126
hidróxi-butirato	humanos	sangue	efeito da ciclosporina	RMN-H^1	grupo 2	133
ácido quínico	humanos	plasma	câncer de próstata	GC-MS	grupos 1 e 2	136
açúcares, inositol, ácido hipúrico	humanos	urina	efeito da ciclosporina e tacrolimo	GC-MS	açúcares: grupos 1 e 2 inositol: grupo 1 (hipótese) ácido hipúrico: grupo 2	100

5. Conclusões e perspectivas

Neste trabalho, foi realizada uma avaliação de duas terapias de regimes imunossupressores utilizando a metabolômica como ferramenta para identificação de metabólitos discriminantes, que descrevessem o quadro metabólico dos pacientes no estudo. A abordagem *untargeted* foi selecionada por permitir identificar a maior quantidade possível de metabólitos. A técnica analítica selecionada, GC-MS, mostrou ser eficaz na identificação dos compostos presentes na urina, através da utilização de uma biblioteca específica para determinação de metabólitos, isentando a necessidade do uso de padrões ou um analisador de massas de alta resolução. Para viabilizar a análise das amostras de urina destes pacientes, foi necessário desenvolver métodos de preparo de amostras que garantissem a confiabilidade dos resultados adquiridos. Com base em relatos da literatura, foram otimizadas algumas variáveis que potencialmente interferem na interpretação dos resultados. Foi possível identificar as condições ótimas de urease a ser adicionada, melhor solvente para a precipitação de proteínas, melhor forma de derivatização a fim de identificar a maior quantidade possível de metabólitos da urina e finalmente uma otimização do tratamento de dados no XCMS, cujos parâmetros foram essenciais para obtenção de dados com boa qualidade. Alguns desses parâmetros utilizados são pouco discutidos na literatura, principalmente a otimização dos parâmetros usados do XCMS (fwhm=5, bw=2, treshold=5) específico para a técnica de cromatografia gasosa. De posse da otimização do preparo de amostras, seguiu-se para a análise metabolômica, que viabilizou o estudo comparativo dos dois regimes de tratamento. Este foi um estudo piloto, no qual foram encontrados metabólitos discriminantes na comparação da progressão temporal das terapias estudadas, mostrando algumas vias metabólicas que são perturbadas até o sexto mês do tratamento.

Observou-se uma perturbação no metabolismo energético nos dois grupos, assim como o metabolismo de alguns aminoácidos. No entanto, foram

observados metabólitos discriminantes do grupo 1 (Everolimo/Prednisona/Tacrolimo) que pertencem ao ciclo de Krebs, como ácido succínico e fumárico. Apesar de não ser possível discriminar o tipo de poliol, esta classe de compostos foi discriminante apenas no grupo 1. O catecol e a hidroquinona foram metabólitos discriminantes e estão envolvidos no metabolismo de xenobioticos.

O grupo 2 (Micofenolato mofetil/Prednisona/Tacrolimo) apresentou alguns metabólitos discriminantes distintos do grupo 1, como o ácido hidróxi butirico, um corpo cetônico, o ácido benzóico, hipúrico, ácido malônico e acetamido butírico.

Com isso, mais estudos devem ser conduzidos para identificação dos metabólitos discriminantes que não foram identificados neste trabalho, como por exemplo, o emprego de outras técnicas analíticas que possam complementar as informações aqui obtidas.

A realização de validação biológica também é importante para ratificar os compostos identificados como discriminantes. Uma abordagem targeted pode ser vislumbrada a fim de realizar quantificações de metabólitos específicos. Estes resultados demonstram o potencial da metabolômica para dar suporte à parte clínica na elaboração dos regimes de imunossupressores, bem como o acompanhamento médico dos pacientes.

6. Anexos

6.1 Gráficos

6.1.1 Gráficos do Grupo 1

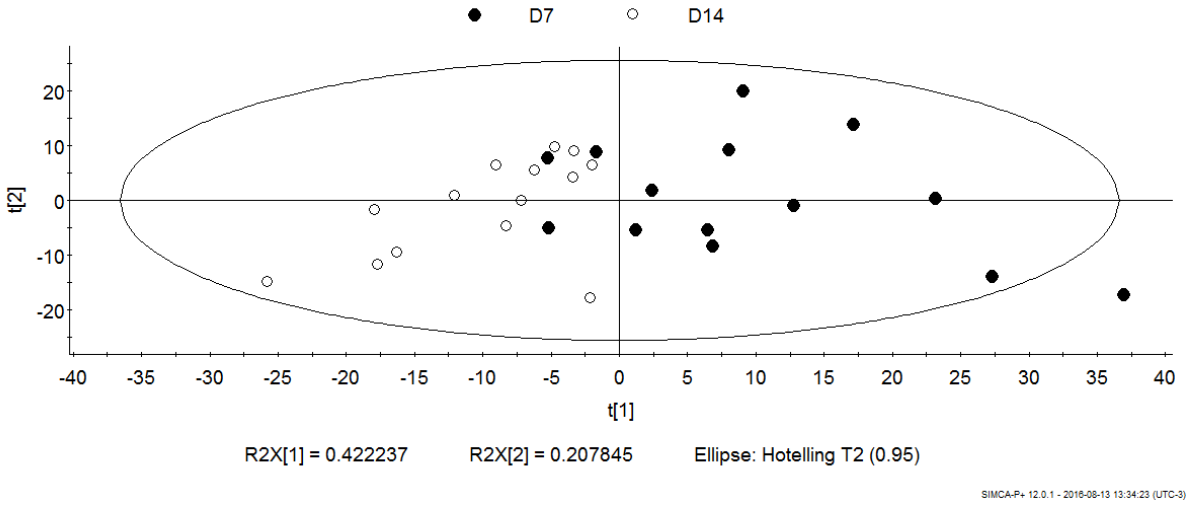


Gráfico de PCA dia 7 X dia 14. R^2: 0,63; Q^2: 0,52.

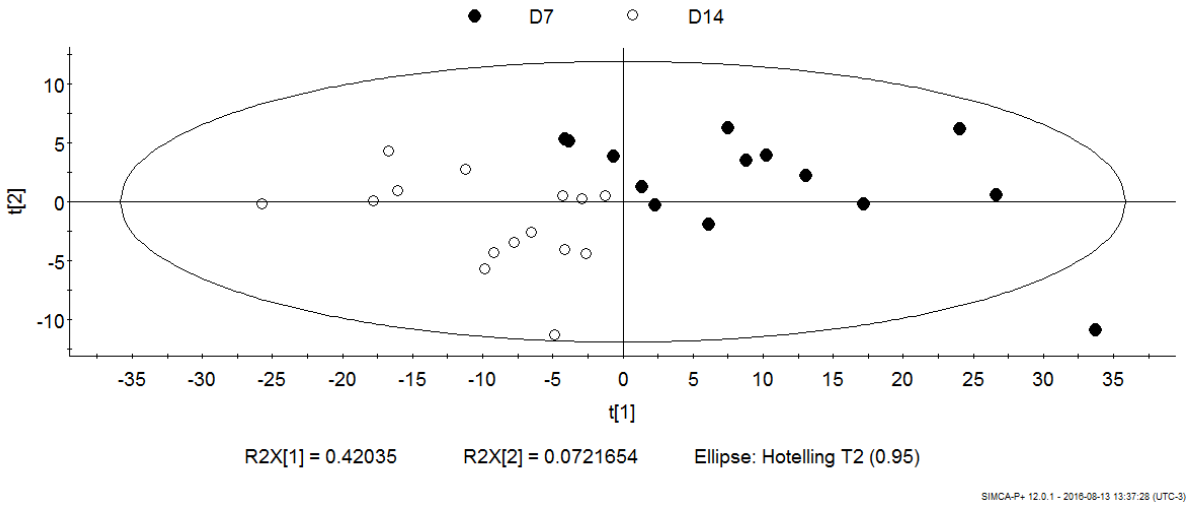


Gráfico de PLS-DA dia 7 X dia 14. R^2: 0,70; Q^2:0,44.

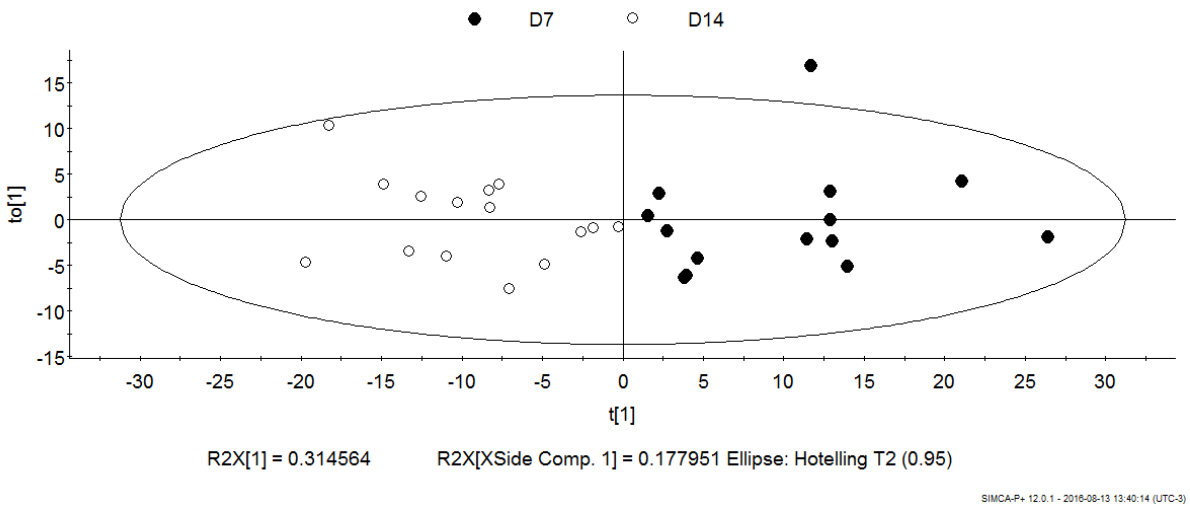


Gráfico de OPLS-DA dia 7 X dia 14. R^2: 0,70; Q^2: 0,40.

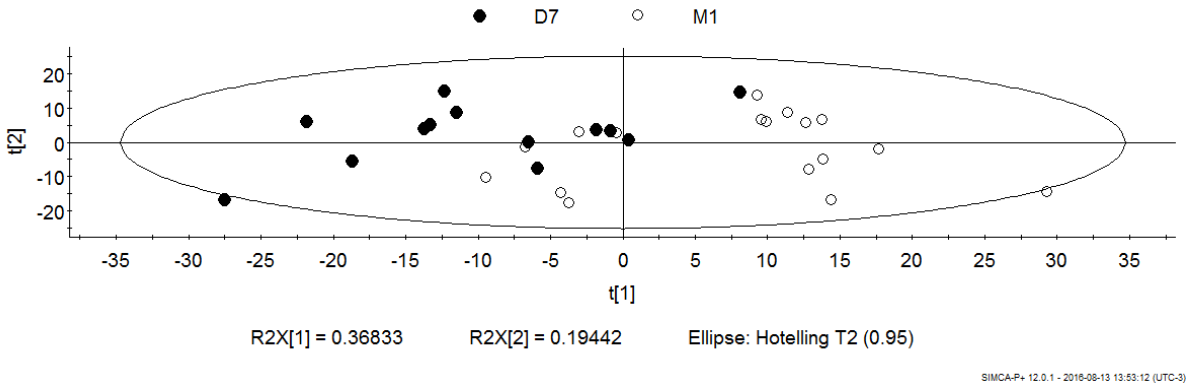


Gráfico de PCA dia 7 X mês 1. R^2:0,56; Q^2: 0,43.

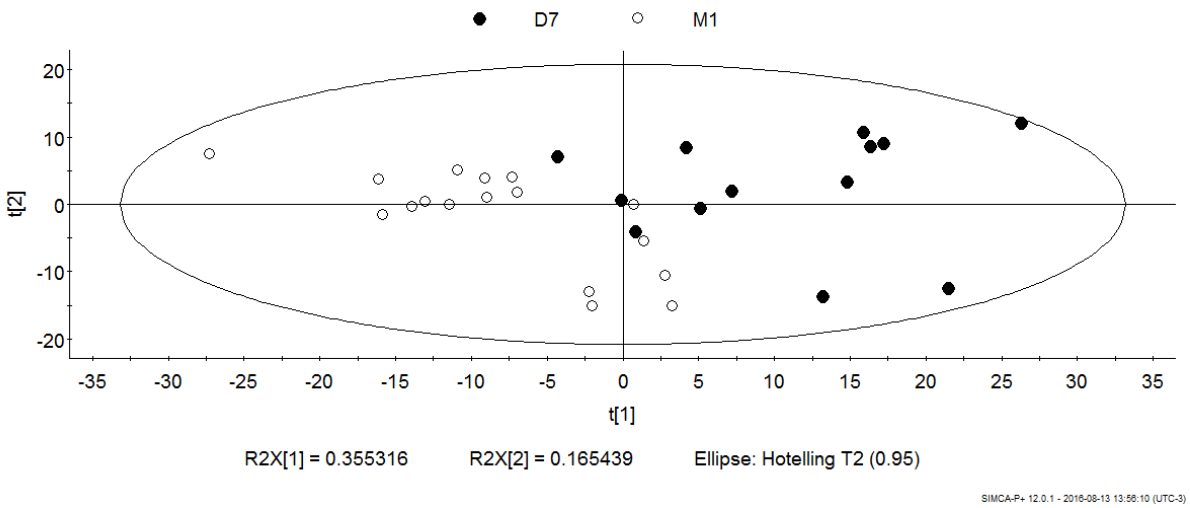


Gráfico de PLS-DA dia 7 X mês 1. R^2: 0,63; Q^2: 0,50.

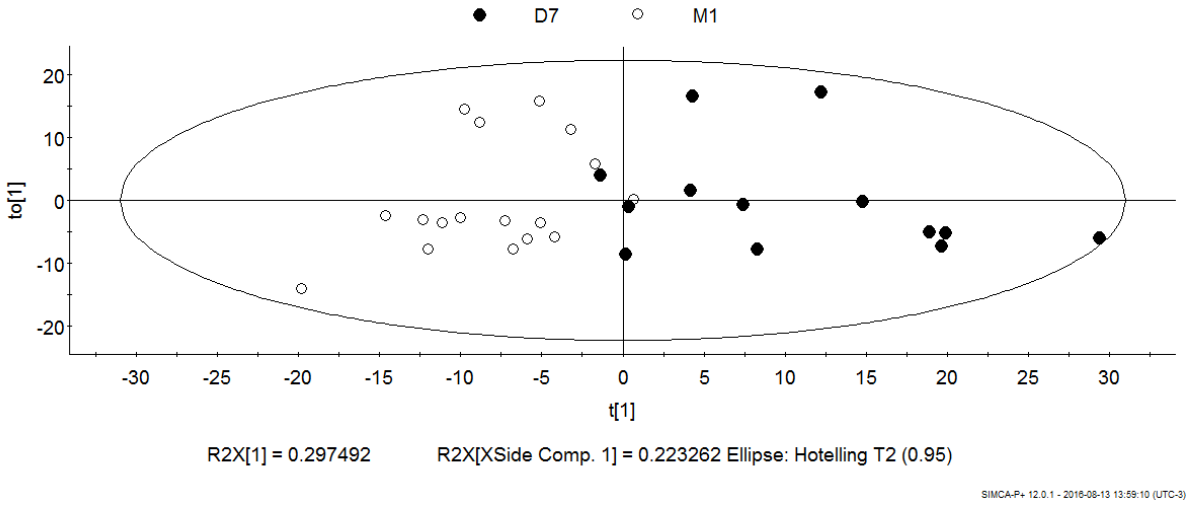


Gráfico de OPLS-DA dia 7 X mês 1. R^2: 0,63; Q^2: 0,49.

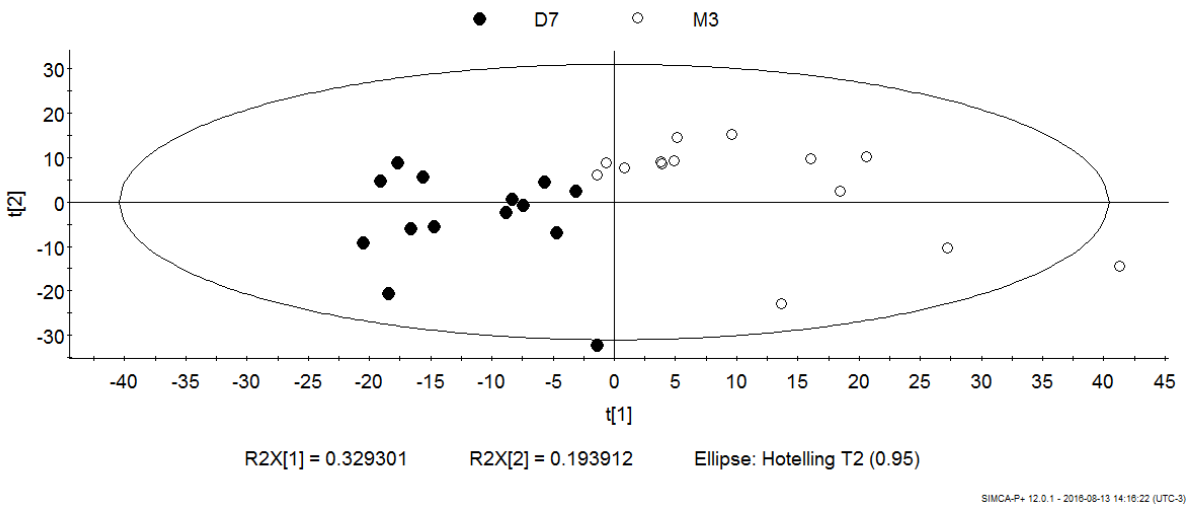


Gráfico de PCA dia 7 X mês 3. R^2: 0,52; Q^2:0,36.

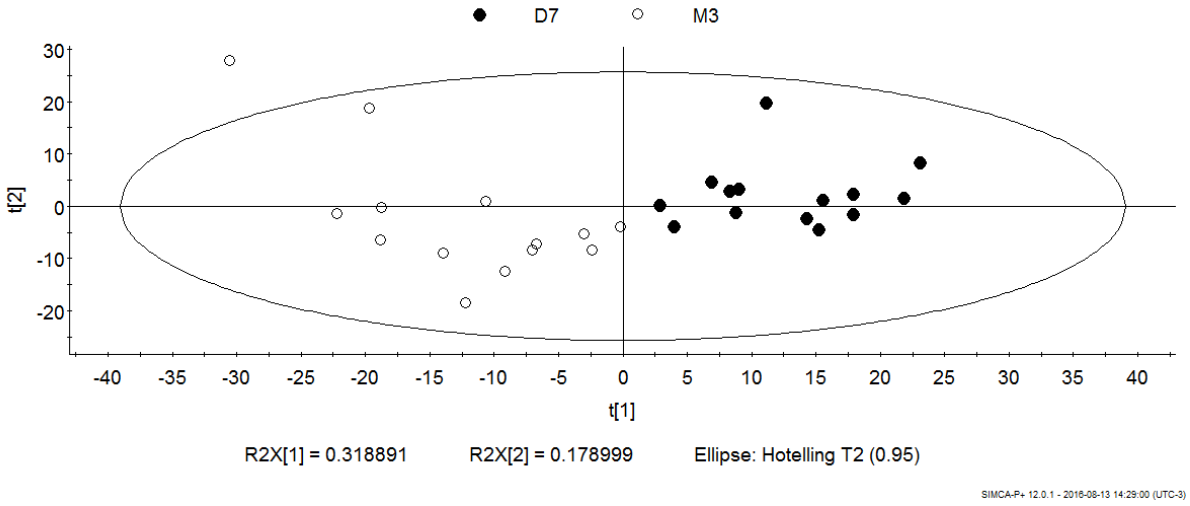


Gráfico de PLS-DA dia 7 X mês 3. R^2: 0,81; Q^2: 0,74.

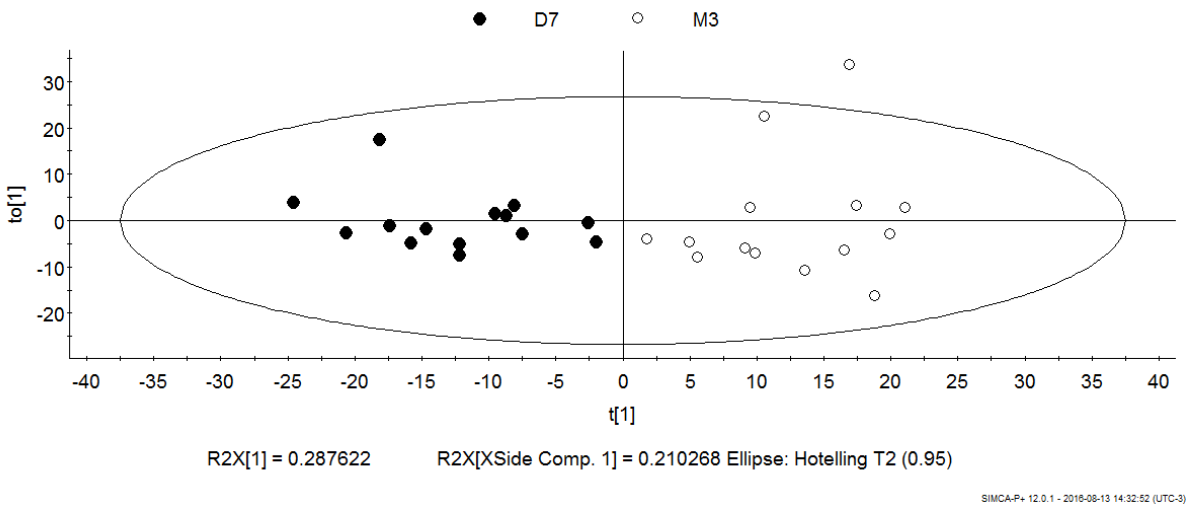


Gráfico de OPLS-DA dia 7 X mês 3. R^2: 0,81; Q^2: 0,74.

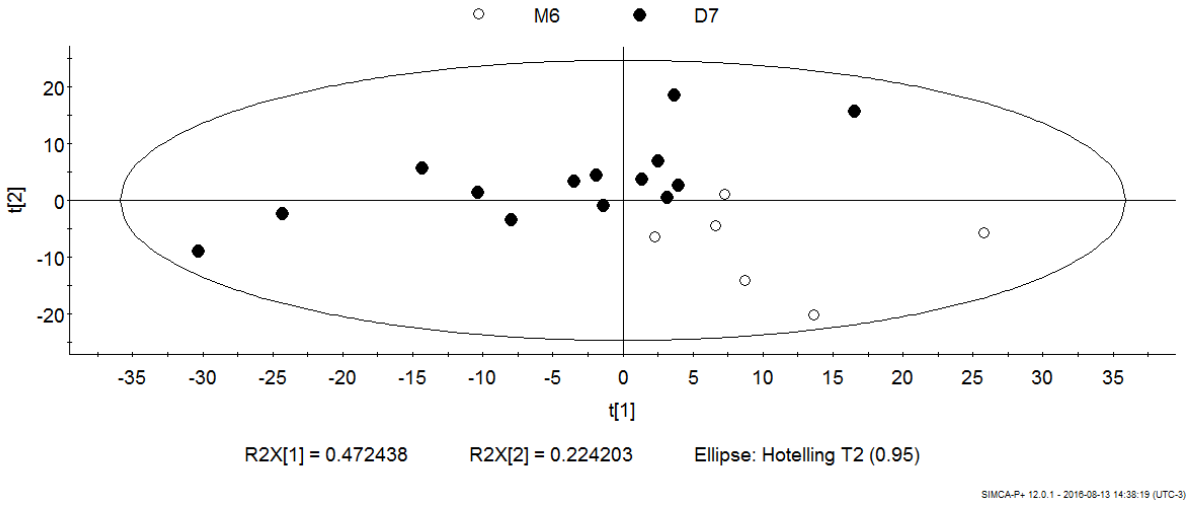


Gráfico de PCA dia 7 X mês 6. R^2: 0,70; Q^2: 0,54.

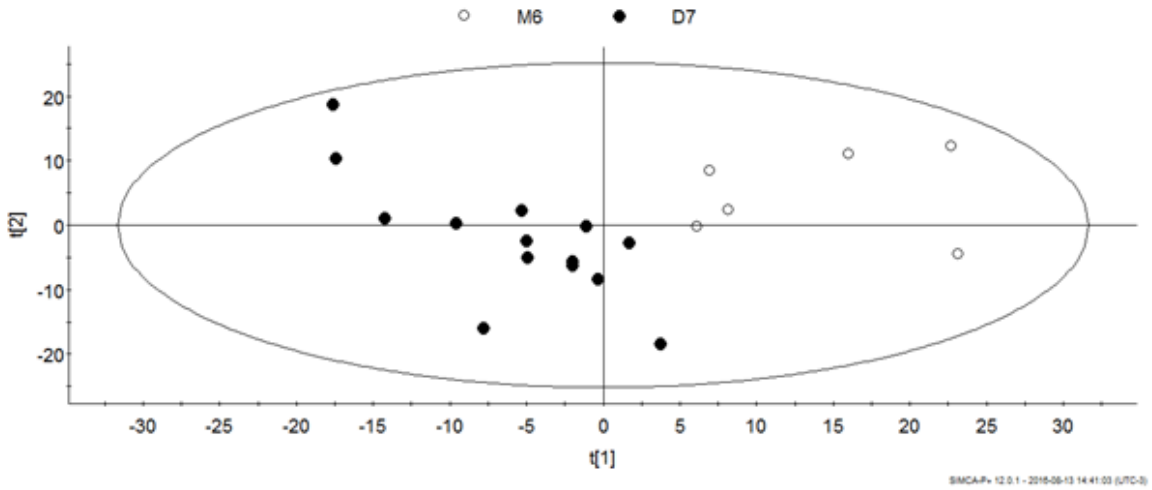


Gráfico de PLS-DA dia 7 X mês 6. R^2: 0,90; Q^2: 0,77.

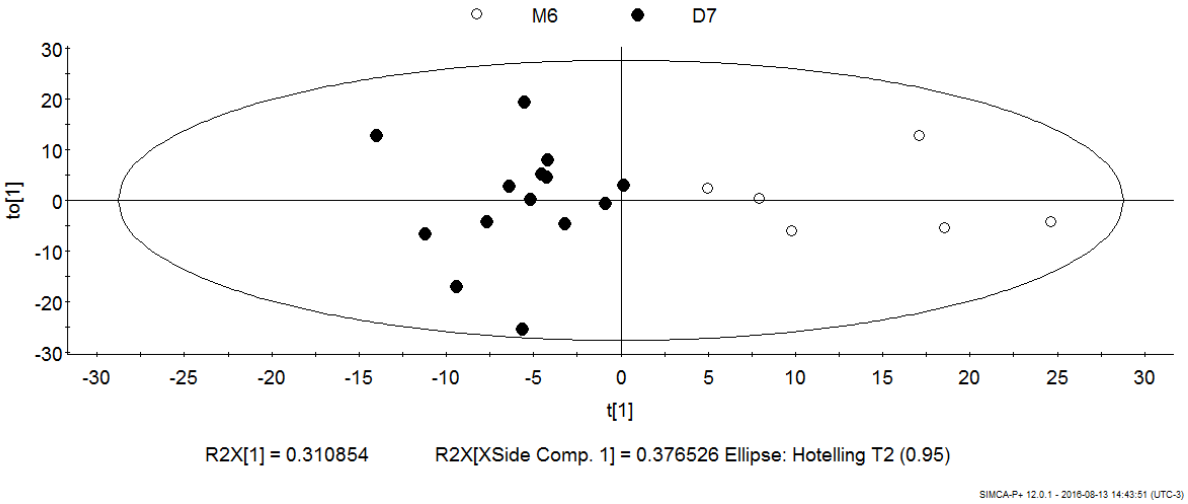


Gráfico de OPLS-DA dia 7 X mês 6. Q^2: 0,72.

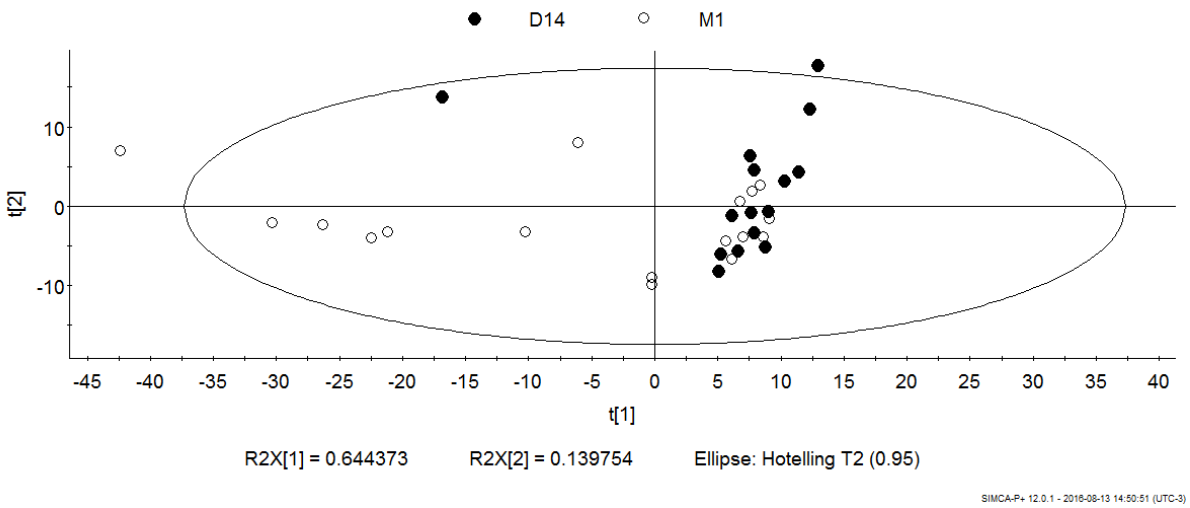


Gráfico de PCA dia 14 X mês 1. R^2:0,78; Q^2: 0,72.

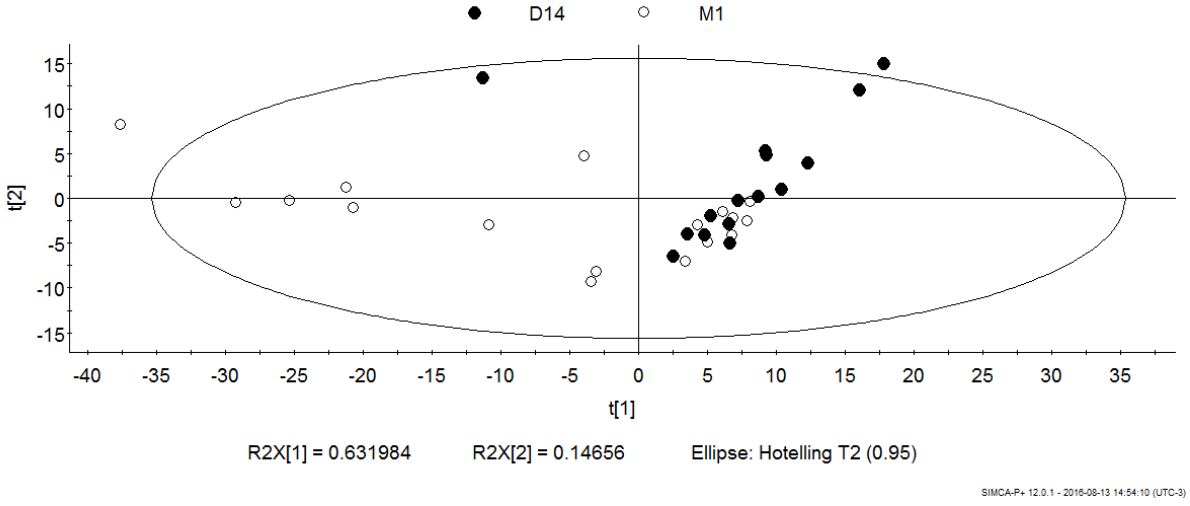


Gráfico de PLS-DA dia 14 X mês 1. R^2 0,38; Q^2: 0,27.

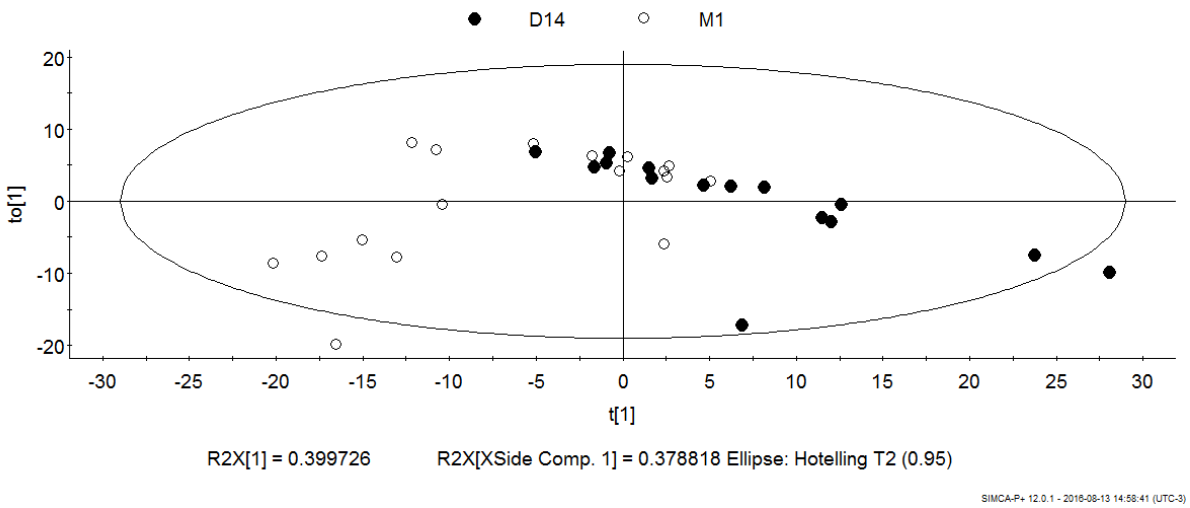


Gráfico de OPLS-DA dia 14 X mês 1. R^2 0,38; Q^2: 0,27.

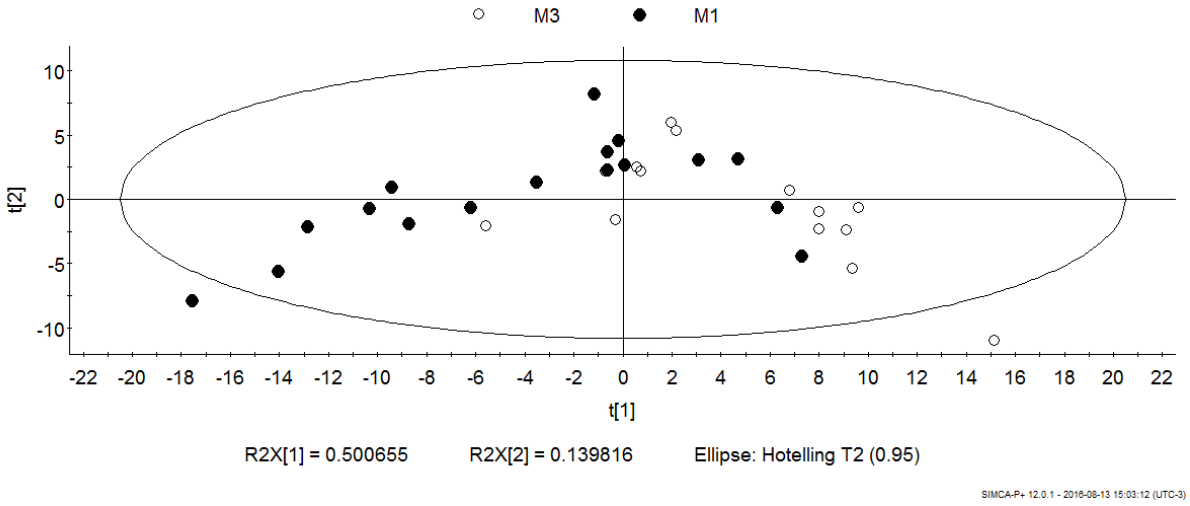


Gráfico de PCA mês 1 X mês 3. R^2:0,64; Q^2: 0,54.

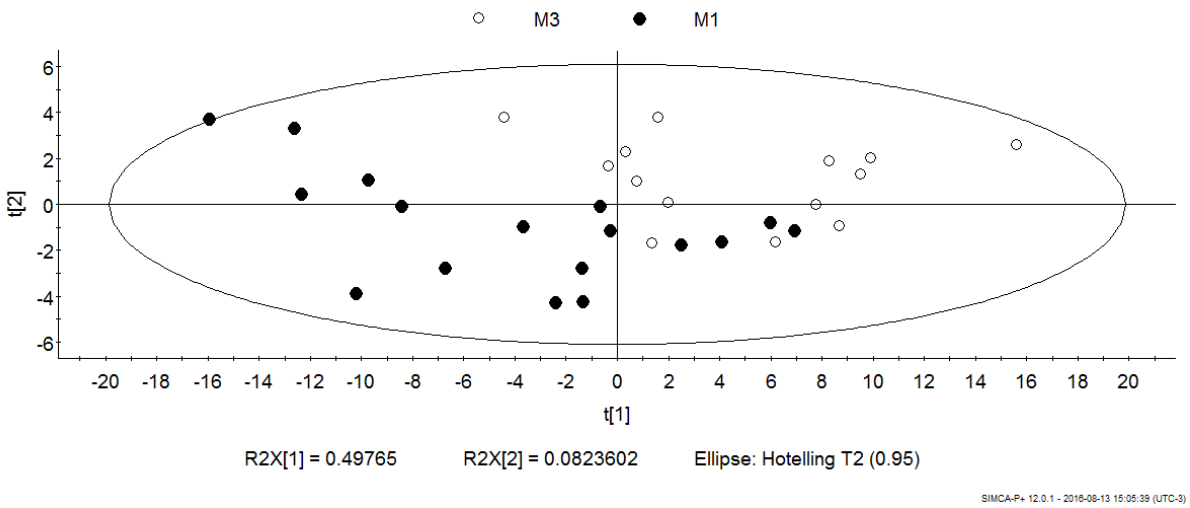


Gráfico de PLS-DA mês 1 X mês 3. R^2: 0,55; Q^2: 0,27.

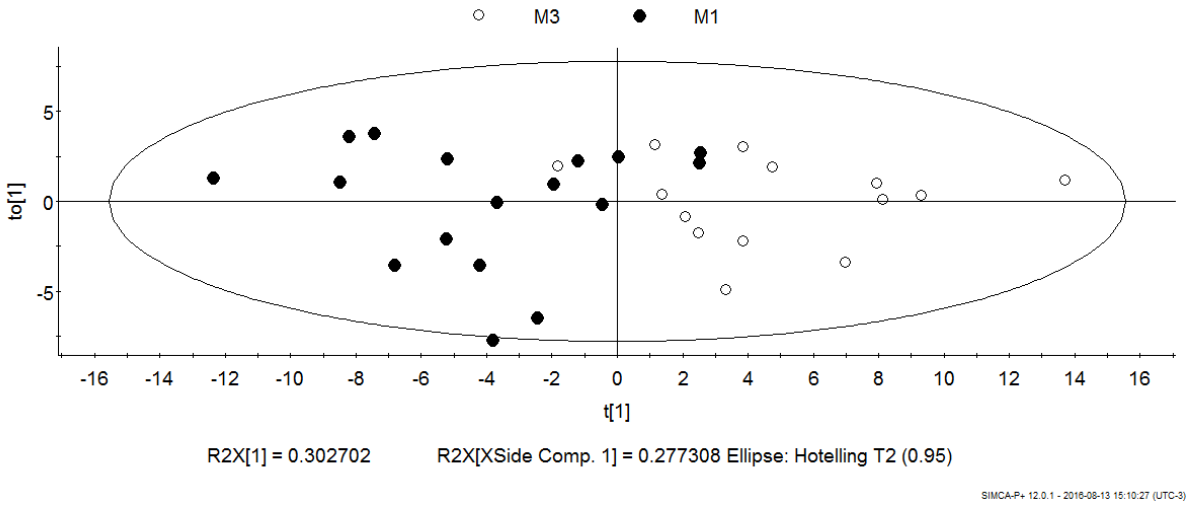


Gráfico de OPLS-DA mês 1 X mês 3. R^2: 0,55; Q^2: 0,29.

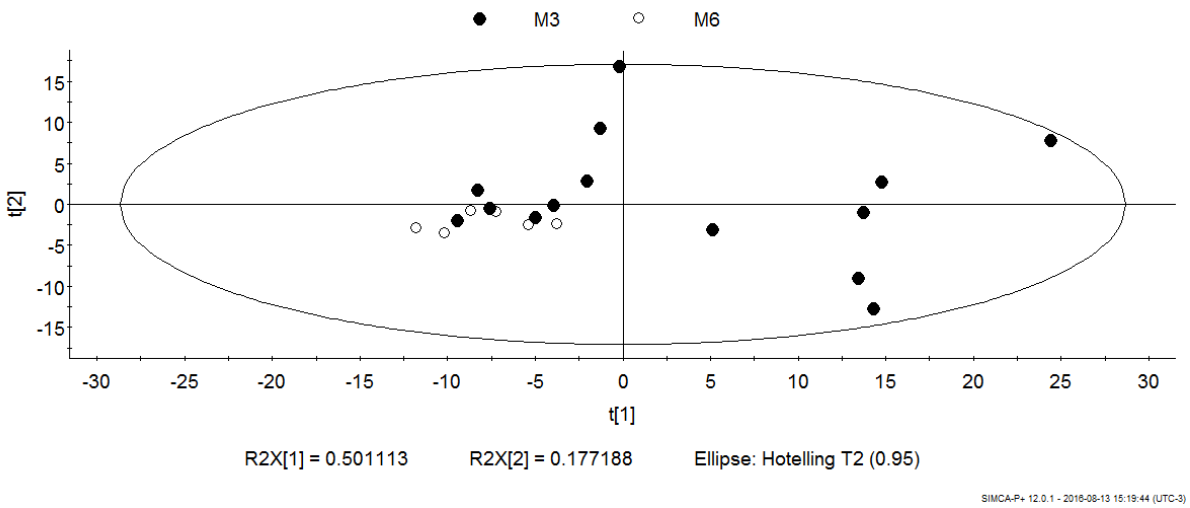


Gráfico de PCA mês 3 X mês 6. R^2:0,68 Q^2: 0,52.

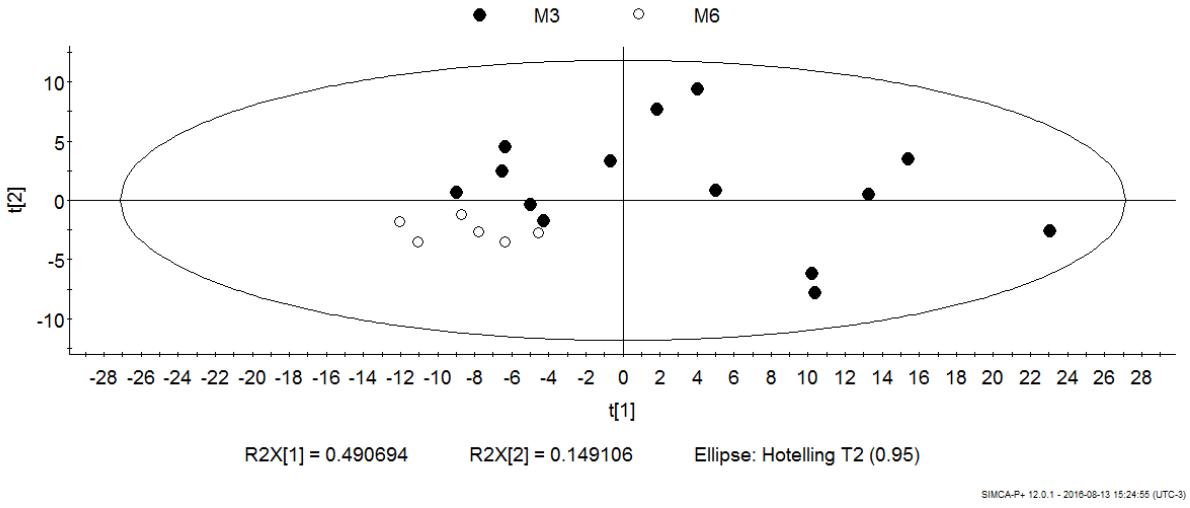


Gráfico de PLS-DA mês 3 X mês 6. R^2:0,49 Q^2: 0,23.

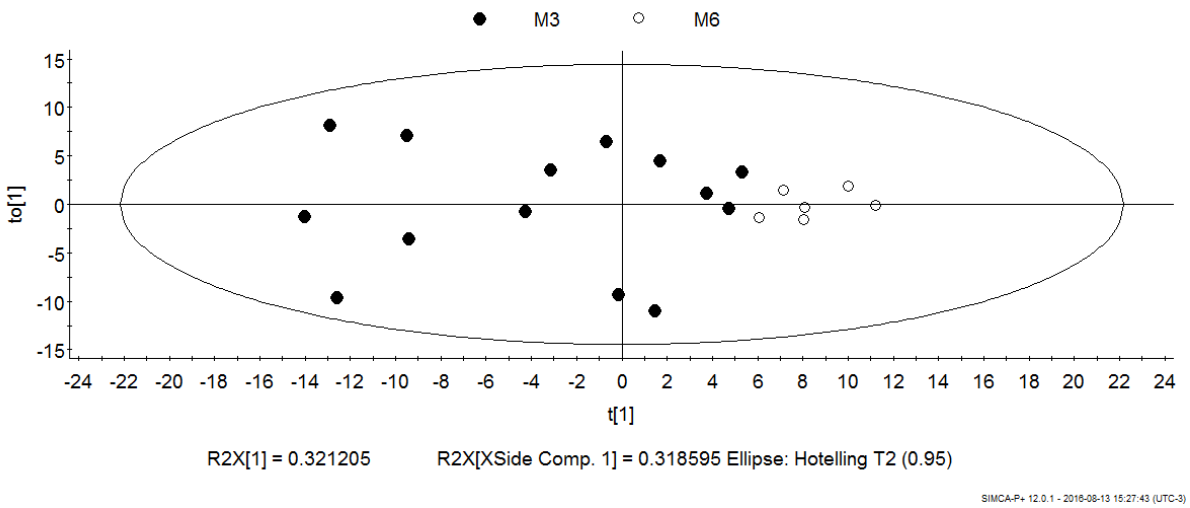


Gráfico de OPLS-DA mês 3 X mês 6. R^2:0,49; Q^2: 0,19.

6.1.2 Gráficos do Grupo 2

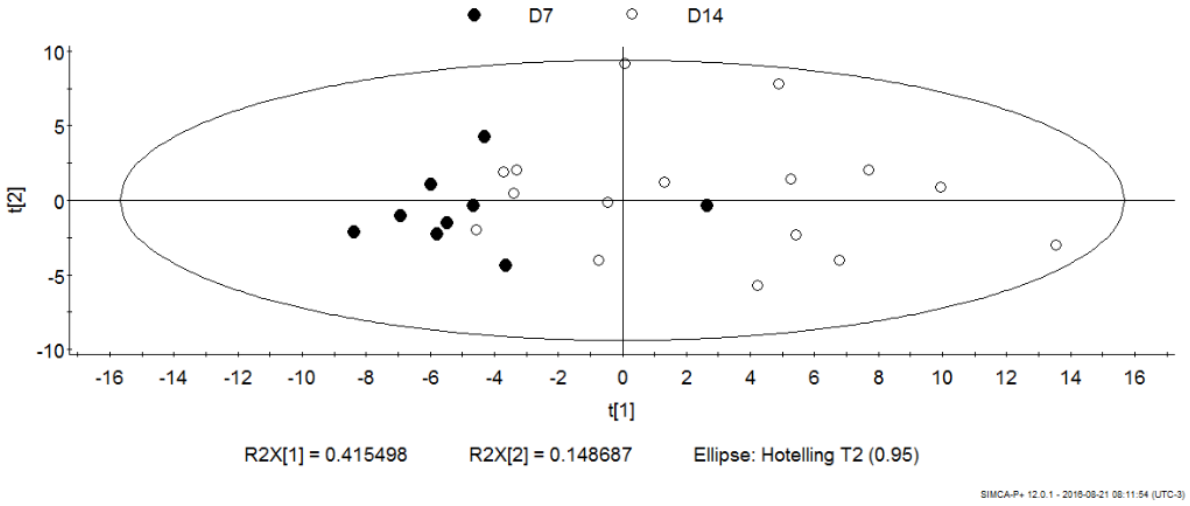


Gráfico de PCA dia 7 X dia 14. R^2: 0,56; Q^2: 0,35.

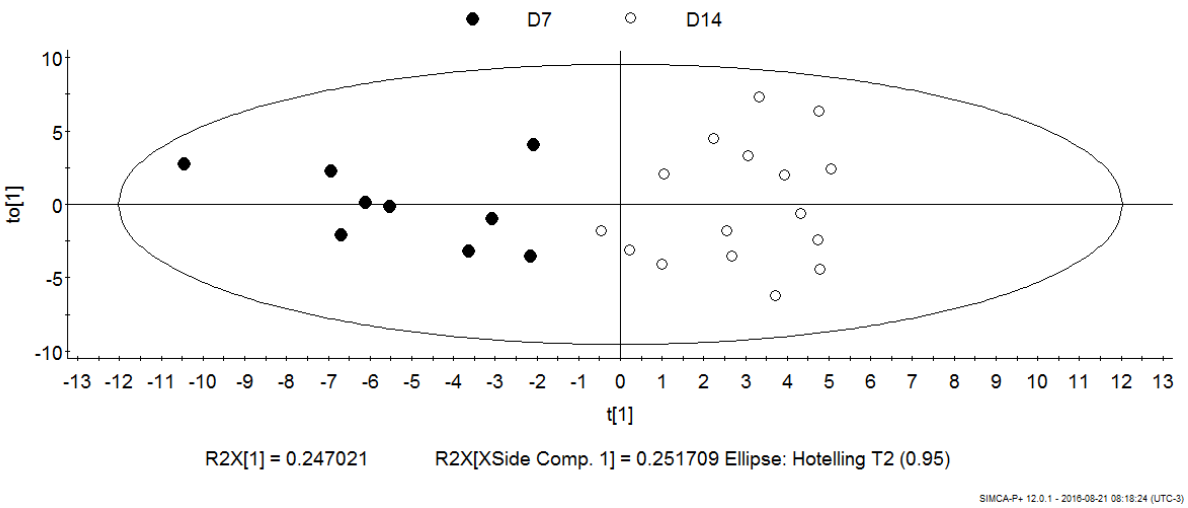


Gráfico de PLS-DA dia 7 X dia 14. R^2: 0,78; Q^2: 0,40.

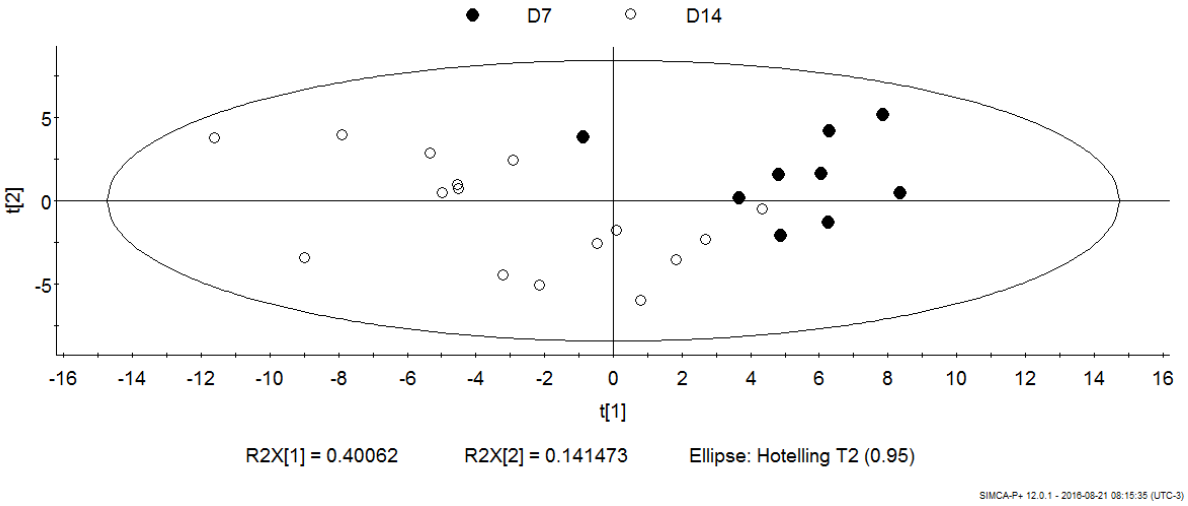


Gráfico de OPLS-DA dia 7 X dia 14. R^2: 0,67; Q^2: 0,53.

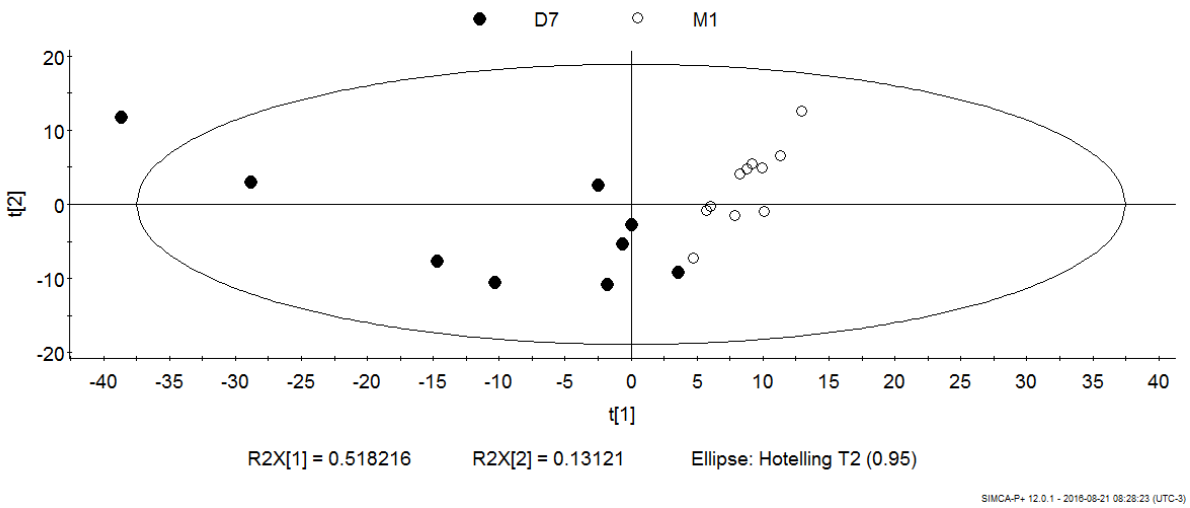


Gráfico de PCA dia 7 X mês 1. R^2: 0,65; Q^2: 0,46.

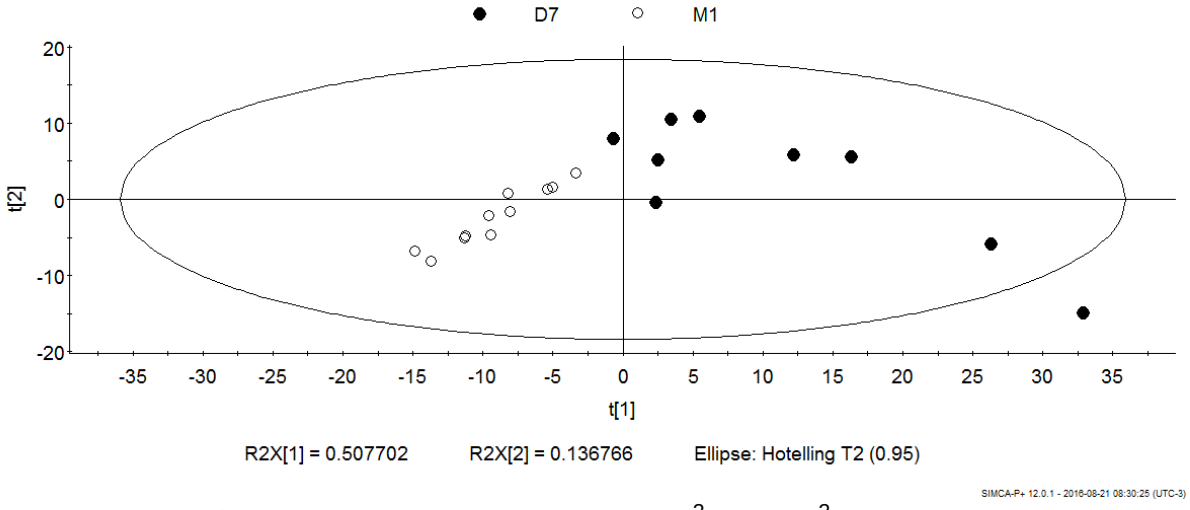


Gráfico de PLS-DA dia 7 X mês 1. R^2: 0,78 Q^2: 0,67.

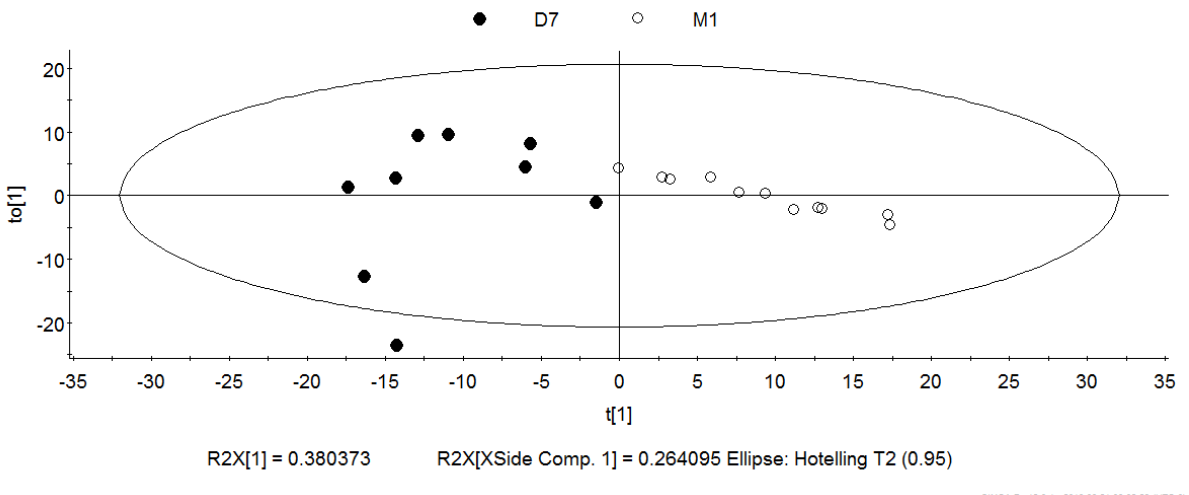


Gráfico de OPLS-DA dia 7 X mês 1. R^2: 0,78; Q^2: 0,70.

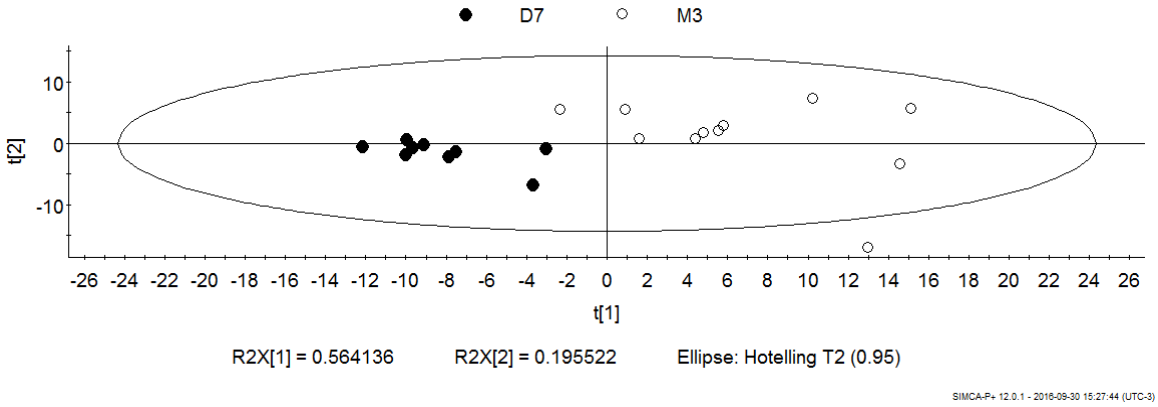


Gráfico de PCA dia 7 X mês 3:

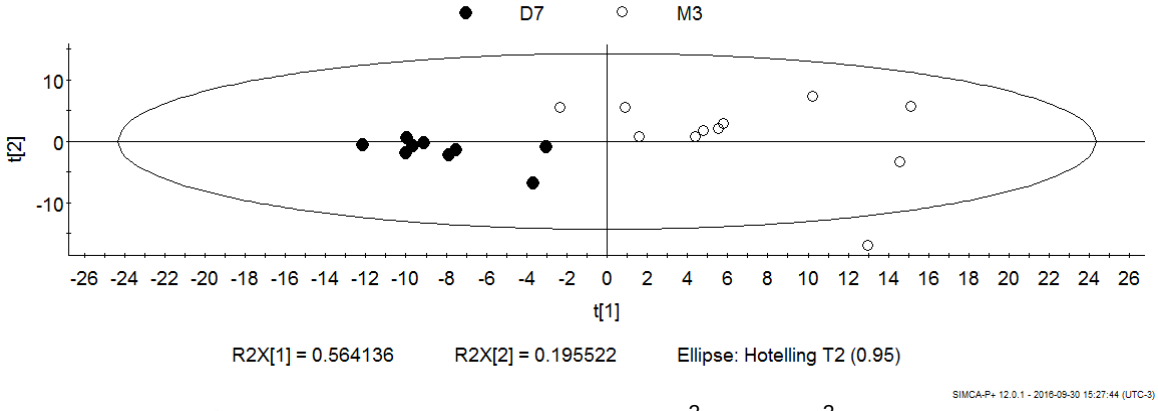


Gráfico de PLS-DA dia 7 X mês 3: R^2: 0,80; Q^2: 0,70.

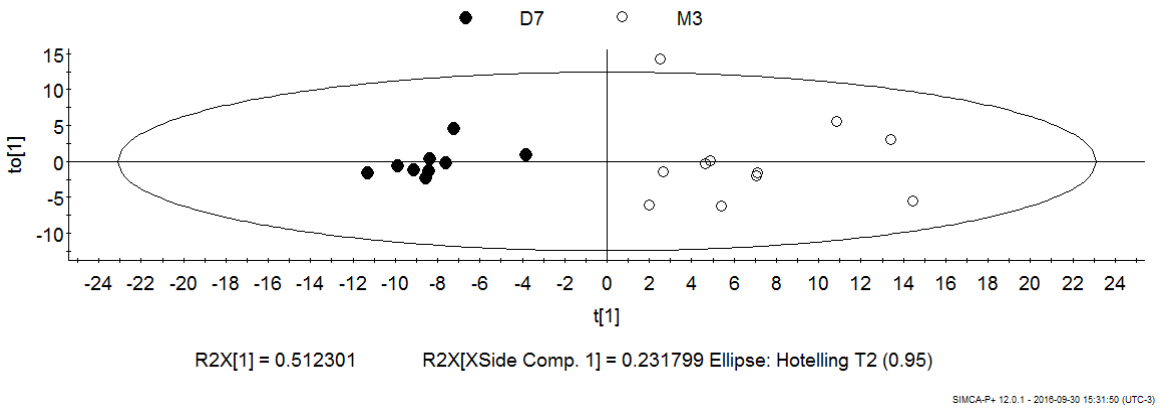


Gráfico de OPLS-DA dia 7 X mês 3:

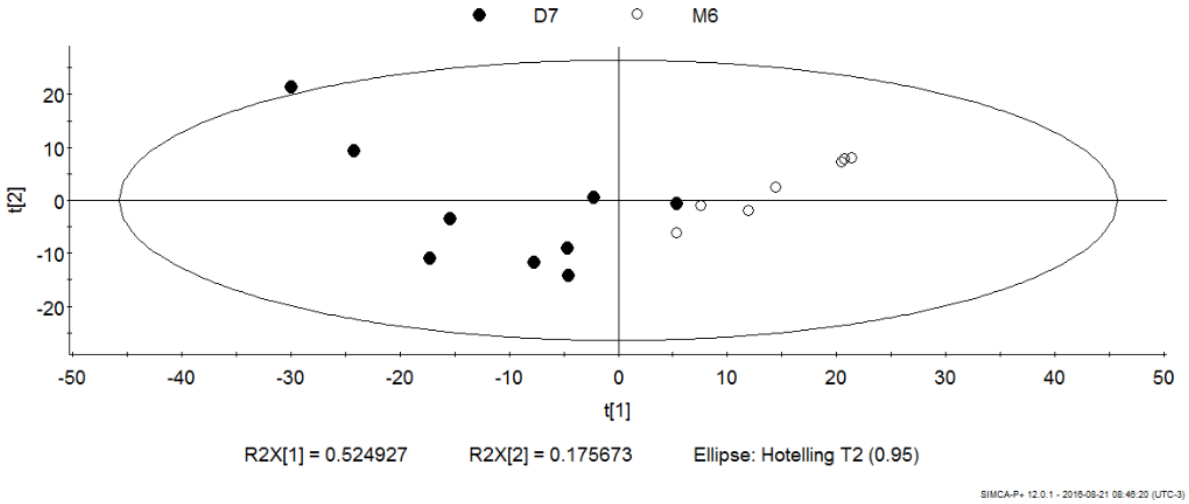


Gráfico de PCA dia 7 X mês 6. R^2: 0,70; Q^2: 0,58.

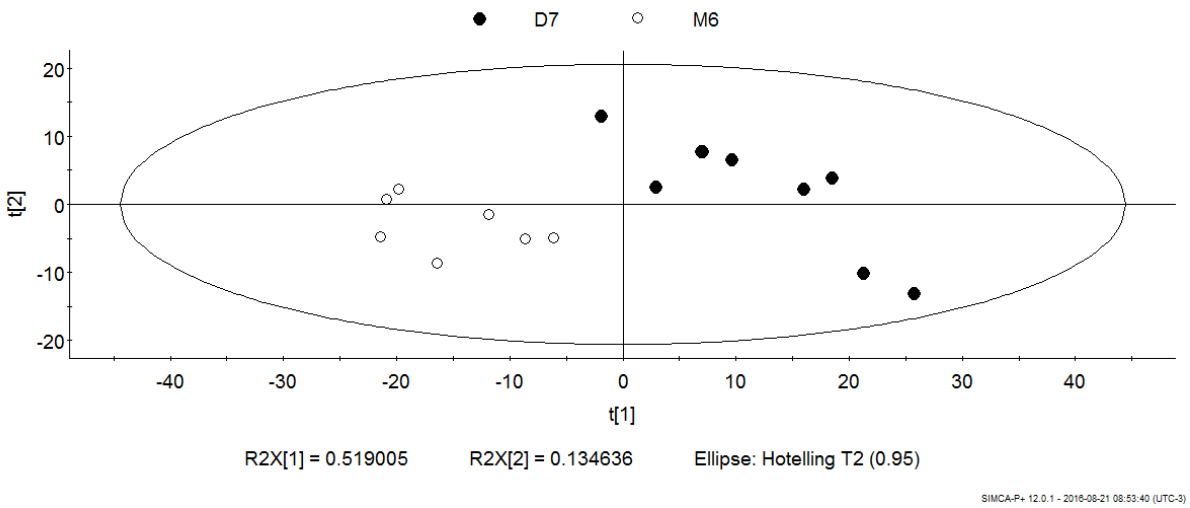


Gráfico de PLS-DA dia 7 X mês 6. R^2: 0,91; Q^2: 0,83.

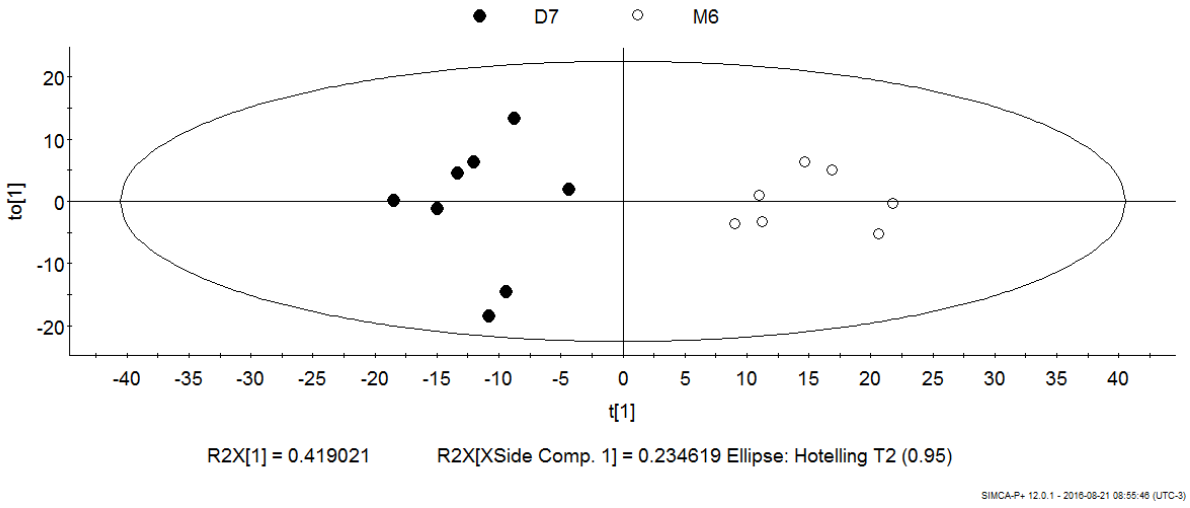


Gráfico de OPLS-DA dia 7 X mês 6. R^2: 0,91, Q^2: 0,82.

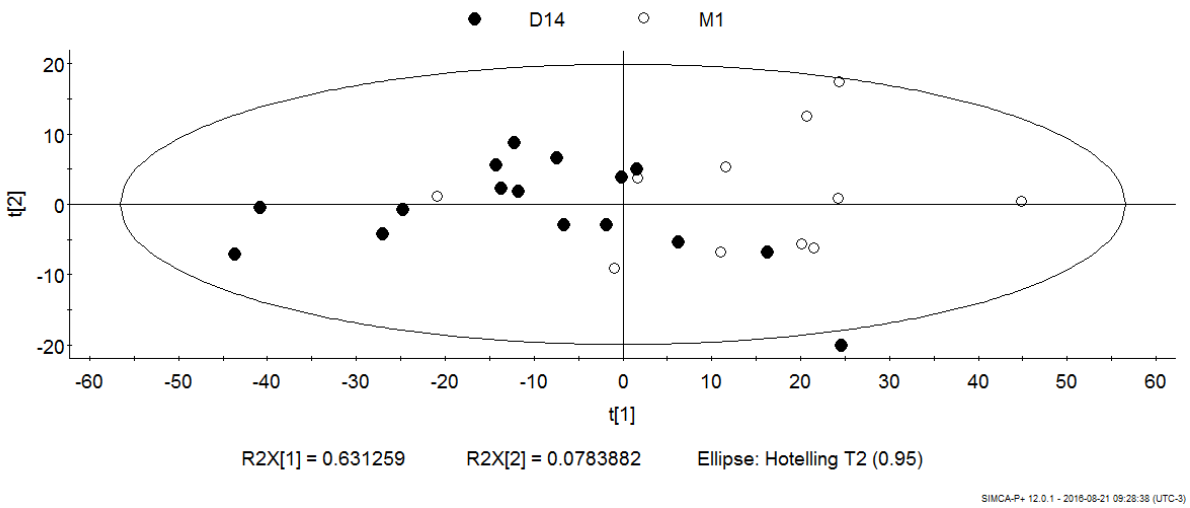


Gráfico de PCA dia 14 X mês 1. R^2: 0,71; Q^2: 0,60.

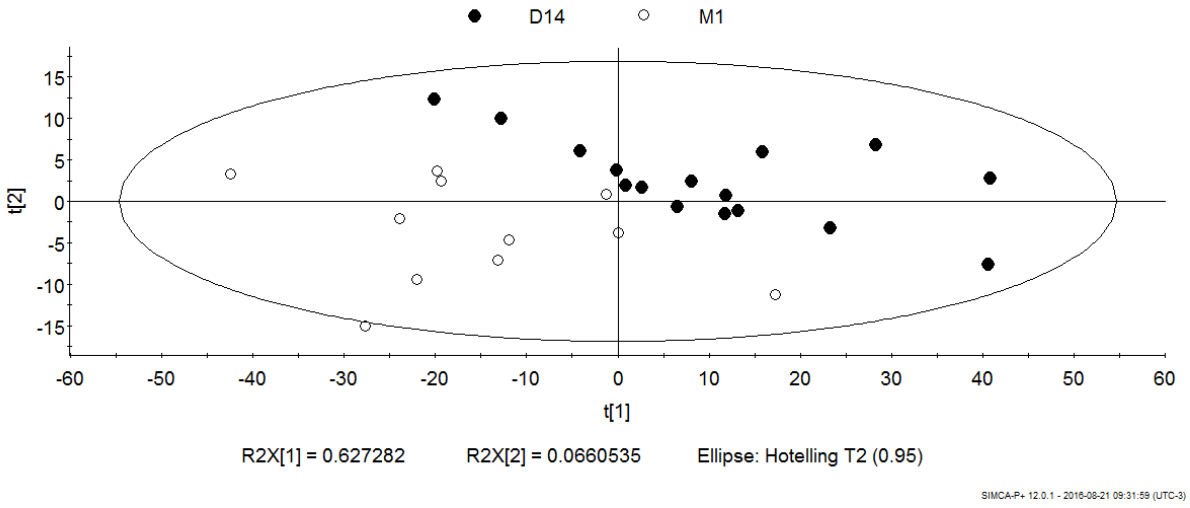


Gráfico de PLS-DA dia 14 X mês 1. R^2: 0,65; Q^2: 0,34.

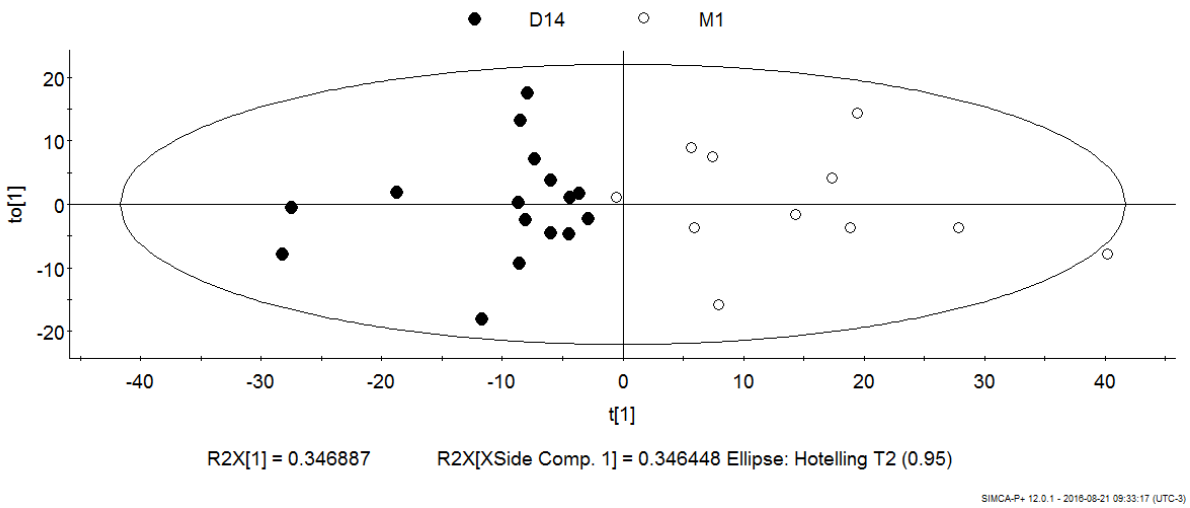


Gráfico de OPLS-DA dia 14 X mês 1. R^2: 0,65; Q^2: 0,32.

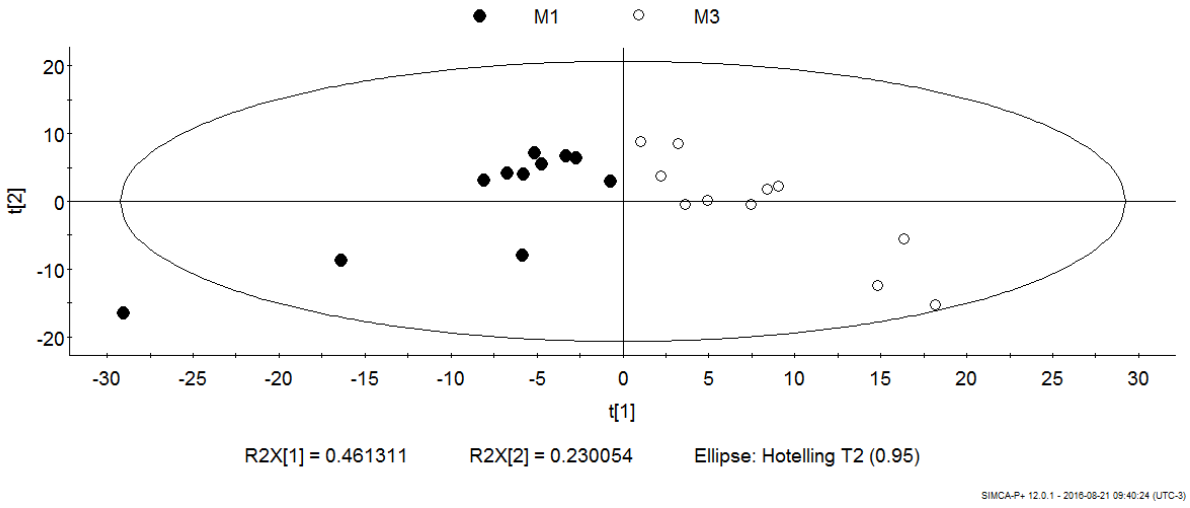


Gráfico de PCA mês 1 X mês 3. R^2: 0,69; Q^2: 0,44.

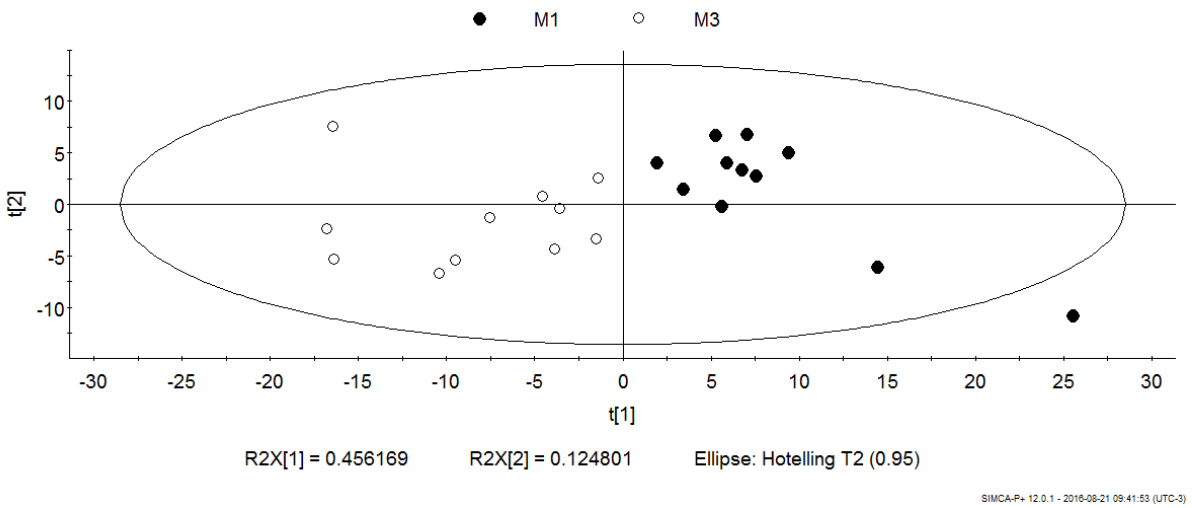


Gráfico de PLS-DA mês 1 X mês 3. R^2: 0,78; Q^2: 0,66.

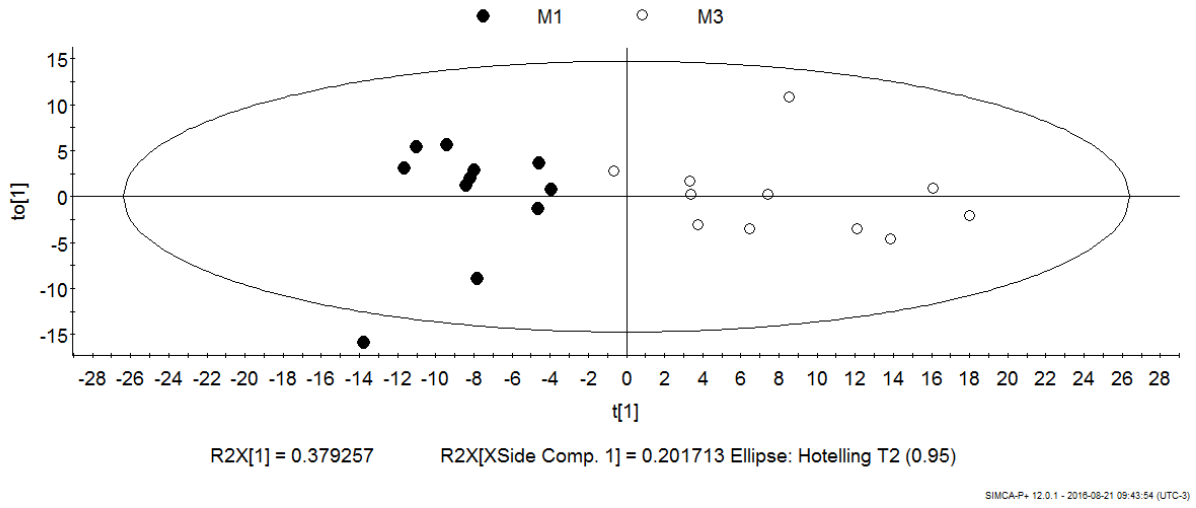


Gráfico de OPLS-DA mês 1 X mês 3. R^2:0,78; Q^2: 0,64.

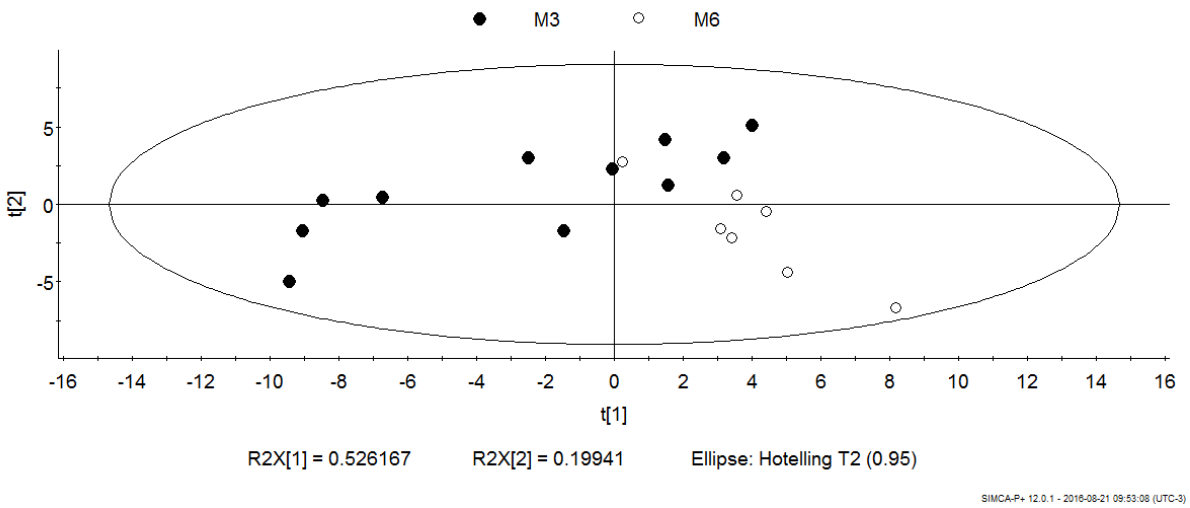


Gráfico de PCA mês 3 X mês 6. R^2: 0,73; Q^2: 0,60.

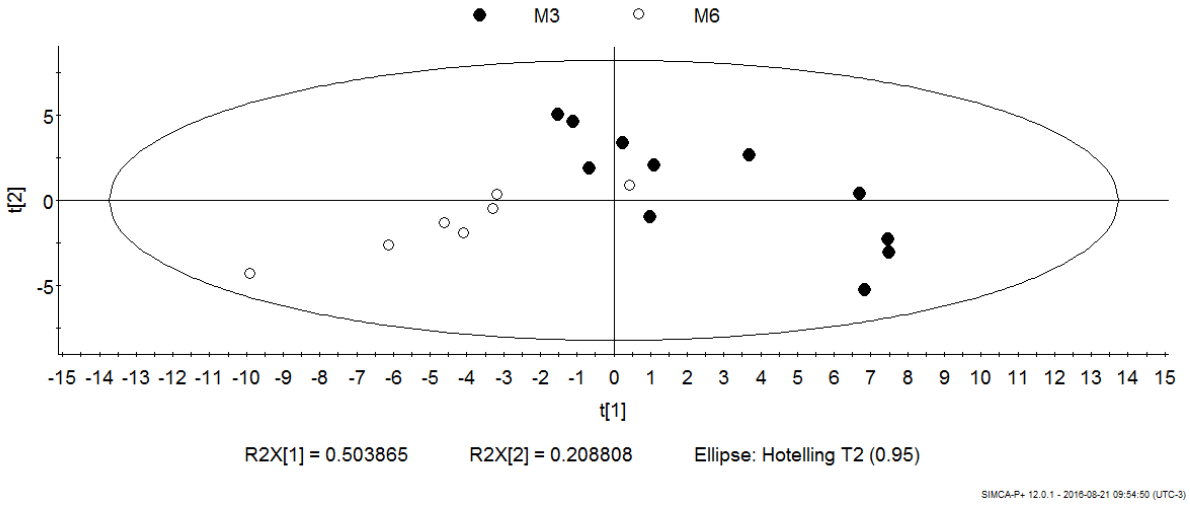


Gráfico de PLS-DA mês 3 X mês 6. R^2:0,67; Q^2: 0,53.

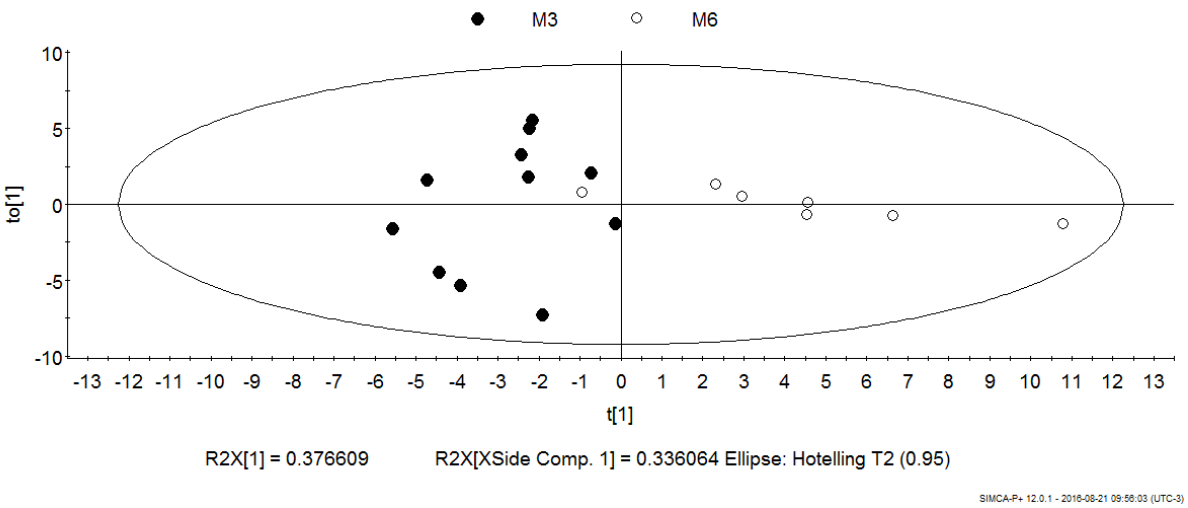


Gráfico de OPLS-DA mês 3 X mês 6. R^2: 0,67; Q^2: 0,48.

6.2 Folha de rosto

PlataForma Brasil MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Avaliação de terapias imunossupressoras em transplantes renais com uma abordagem metabolômica	2. Número de Sujeitos de Pesquisa: 30
3. Área Temática:	
4. Área do Conhecimento: Grande Área 1. Ciências Exatas e da Terra	

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

5. Nome: Pedro Luis Rocha da Cruz			
6. CPF: 306.119.368-52	7. Endereço (Rua, n.º): PADRE DONIZETTI TAVARES DE LIMA SANTANA SAO PAULO SAO PAULO 02404100		
8. Nacionalidade: BRASILEIRA	9. Telefone: (11) 2976-5173	10. Outro Telefone:	11. Email: pedrocz@hotmail.com
12. Cargo: Aluno de doutorado			

Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.

Data: 19 / 08 / 2013

Assinatura

INSTITUIÇÃO PROPONENTE

13. Nome: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO	14. CNPJ: 63.025.530/0009-61	15. Unidade/Órgão:
16. Telefone: (11) 3091-3839	17. Outro Telefone:	

Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.

Responsável: _____ CPF: 605.961.988-68

Cargo/Função: Prof. Dr. Fernando R. Ornellas Diretor

Data: 19 / agosto / 2013

Assinatura

PATROCINADOR PRINCIPAL

6.3 Parecer Consubstanciado

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP/ HOSPITAL SÃO PAULO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de terapias imunossupressoras em transplantes renais com uma abordagem metabolômica

Pesquisador: Pedro Luis Rocha da Cruz

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 17423413.5.0000.5505

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 767.864

Data da Relatoria: 27/08/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda com nova versão de TCLE -

O Projeto teve mudança da equipe. Foram incluidos os pesquisadores Dr. Pedro Guilherme Coelho Hannun e Dra. Nagilla Ione Oliveira e o Dr. Glaucio Spinelli não faz mais parte do projeto. Portanto, foi excluido na realização desta emenda. Por causa da mudança da equipe, o TCLE foi atualizado e submetido com as devidas substituições de nome.

Objetivo da Pesquisa:

Emenda para alteração administrativa do TCLE com inclusão de nome na equipe da pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

sem riscos associados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Protocolo inicial já aprovado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

nova versão de TCLE apresentada

Recomendações:

sem recomendações

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendencias adicionais

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

o parecer do relator foi acatado pelo colegiado

SAO PAULO, 27 de Agosto de 2014

Assinado por:
José Osmar Medina Pestana
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

6.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estudo metabolômico sobre a influência de duas diferentes terapias imunossupressoras durante o primeiro ano de transplante renal

Antes da sua cirurgia do transplante de rim, você aceitou participar de uma pesquisa que compara 2 combinações de medicamentos para evitar a rejeição do rim transplantado ("Comparação entre dois regimes imunossupressores baseados em tacrolimo e indução com Timoglobulina em transplantes renais com doadores falecidos de critérios expandidos" - CEP # 18075213.8.0000.5505).

Estamos propondo aos pacientes que aceitaram participar dessa pesquisa, a realização de coletas de urina nas visitas de estudo pré-transplante (se possível), Dias 7 e 14 e meses 3, 6, 9, e 12 após o transplante.

A realização destas coletas de urina tem por objetivo identificar, através da análise por espectrometria de massa (técnica específica de dosagem), novas rotas metabólicas e novos biomarcadores secundários ao uso dos imunossupressores, ou seja, estudaremos de maneira mais detalhada o efeito da combinação de medicamentos para evitar a rejeição do rim transplantado no seu organismo durante o primeiro ano de transplante.

Serão convidados a participar dessa pesquisa, que tem duração de 12 meses, os 30 pacientes transplantados e participantes do projeto principal (divididos em 2 grupos de 15) no Hospital do Rim. Para tanto, você seguirá a programação hospitalar e ambulatorial do tratamento do transplante, não tendo que vir mais vezes só por conta da pesquisa. Coletas de sangue e urina (aproximadamente 10 mL de cada) serão realizadas nas visitas de estudo. Essas coletas serão realizadas no 2º andar do Hospital do Rim, no setor de pesquisa clínica, e as análises serão realizadas através de diferentes metodologias nos laboratórios do Instituto de química da UNIFESP/Diadema e da USP/SP. Todas as amostras obtidas serão utilizadas apenas para o propósito desta pesquisa e serão descartadas após a sua utilização.

Todos os pacientes deverão fazer uso de contraceptivos. Métodos contraceptivos adequados serão fornecidos gratuitamente. Caso decidam engravidar deverão discutir o assunto com seu médico. Em caso de gravidez

acidental, as pacientes ou parceiras de pacientes serão acompanhadas durante o pré-natal e após o nascimento da criança.

Não existe benefício adicional na sua participação nessa pesquisa. O responsável pela pesquisa, Dr. Gláucio Spinelli, será responsável por assegurar o sigilo de seus registros médicos. Qualquer nova informação importante será comunicada aos participantes da pesquisa. Se você tiver qualquer dúvida, precisar de mais informações ou achar que sofreu algum dano relacionado à pesquisa, entre em contato com o Dr. Gláucio Spinelli, no telefone (11) 5087-8113. Se você tiver qualquer pergunta em relação aos seus direitos como participante neste estudo, você deve entrar em contato com um representante imparcial no Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP para quem você pode comunicar qualquer queixa e fazer qualquer pergunta no telefone (11) 5539-7162 ou na Rua Botucatu, 572 – 4º andar – conj. 41.

Sua participação nesta pesquisa é inteiramente voluntária. Você pode recusar-se a participar nesta pesquisa ou poderá desistir de sua participação em qualquer momento. Sua decisão será respeitada e não afetará seu tratamento médico no hospital. Existem outros tratamentos alternativos caso não queira participar desse estudo. Suas informações serão mantidas em confidencialidade e os dados obtidos serão utilizados somente para esta pesquisa.

CONSENTIMENTO

Li (ou foram lidas para mim) as informações acima, entendi o que foi explicado e tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas. Assinando este termo, eu forneço meu consentimento informado e voluntário para participar deste estudo e ficarei com uma via assinada pelo (paciente e pesquisador/responsável) deste documento.

_____

Nome do paciente

_____ Data:_____/_____/_____

Assinatura

_____

Nome da testemunha*

_____ Data:_____/_____/_____

Assinatura

**Para pacientes analfabetos ou semi-analfabetos ou com deficiências auditivas ou visuais.*

_____

Nome da pessoa que obteve o consentimento

_____ Data:_____/_____/_____

Assinatura

6.5 TCLE saudáveis

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo metabolômico sobre a influência de duas diferentes terapias imunossupressoras durante o primeiro ano de transplante renal

Estamos propondo um estudo em uma pesquisa que compara 2 combinações de medicamentos para evitar a rejeição do rim transplantado ("Avaliação de terapias imunossupressoras em transplantes renais com uma abordagem metabolômica" - CAAE: 17423413.5.0000.5505).

Os pacientes aceitaram participar dessa pesquisa, coletando amostras de urina nas visitas de estudo. A realização destas coletas tem por objetivo avaliar por uma abordagem metabolômica as mudanças metabólicas ocorridas após o transplante de rim em pacientes sob duas terapias diferentes e estabelecer qual combinação de imunossupressores promove o menor efeito nefrotóxico, e consequentemente o menor de índice de rejeição.

No entanto, necessitamos de voluntários saudáveis para ajudar na comparação com os grupos participantes da pesquisa para compreender melhor as diferenças entre pessoas saudáveis e pacientes sob tratamento. Serão convidados a participar dessa pesquisa, 15 voluntários estudantes do curso de pós-graduação do Instituto de Química da USP. Coletas de urina (aproximadamente 10 mL de cada) serão realizadas nas visitas de estudo**.** As análises serão realizadas através de diferentes metodologias nos laboratórios do Instituto de química da UNIFESP/Diadema e da USP/SP. Todas as amostras obtidas serão utilizadas apenas para o propósito desta pesquisa que incluem otimização e validação de métodos analíticos e serão descartadas após a sua utilização.

Não existe benefício adicional na sua participação nessa pesquisa. O responsável pela pesquisa, Pedro Luis Rocha da Cruz, será responsável por assegurar o sigilo de seus registros médicos. Qualquer nova informação importante será comunicada aos participantes da pesquisa. Se você tiver qualquer dúvida, precisar de mais informações ou achar que sofreu algum dano relacionado à pesquisa, entre em contato com o Pedro Luis Rocha da Cruz , no telefone (11) 3091-1143 , das 08:00 às 17:00h. Se você tiver qualquer pergunta em relação aos seus direitos como participante neste estudo, você deve entrar em contato com um representante

imparcial no Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP para quem você pode comunicar qualquer queixa e fazer qualquer pergunta no telefone (11) 5539-7162 ou na Rua Botucatu, 572 – 4º andar – conj. 41, das 09:00 às 13:00h.

Sua participação nesta pesquisa é inteiramente voluntária. Você pode recusar-se a participar nesta pesquisa ou poderá desistir de sua participação em qualquer momento. Sua decisão será respeitada e não afetará seu tratamento médico no hospital. Suas informações serão mantidas em confidencialidade e os dados obtidos serão utilizados somente para esta pesquisa.

CONSENTIMENTO

Li (ou foram lidas para mim) as informações acima, entendi o que foi explicado e tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas. Assinando este termo, eu forneço meu consentimento informado e voluntário para participar deste estudo e ficarei com uma via assinada pelo paciente e pesquisador/responsável deste documento.

_____
Nome do paciente

_____ Data:_____/_____/_____
Assinatura

_____
Nome da testemunha*

_____
Data:_____/_____/_____
Assinatura

**Para pacientes analfabetos ou semi-analfabetos ou com deficiências auditivas ou visuais.*

_____
Nome da pessoa que obteve o consentimento

_____ Data:_____/_____/_____
Assinatura

Curriculum vitae

1. Formação acadêmica

1998-2001 Curso técnico em química. Colégio Oswaldo Cruz
2004-2008 Bacharelado em Química com atribuições tecnológicas, UNICAMP

04/2005- 09/2006 Projeto de iniciação científica: "A subunidade γ do fator de transcrição TFIIA em cana de açúcar: caracterização da expressão e ensaios estruturais"

01/2007-06/2008 Departamento de Química Orgânica Projeto de iniciação científica: "Caracterização de acil-homosserina lactonas produzidas por *Methylobacterium mesophilicum* em meio de cultura contendo glucose"

2009-2011 Mestrado em Química com ênfase em química ogânica, UNICAMP. Título da dissertação: "Mapeamento do Potencial Biossintético em linhagens de *Streptomyces*"

2013-atual Doutorado em Ciências com ênfase em química analítica, USP

2. Formação complementar

2013 Curso de Formação de Peritos (Carga horária: 15h)
Associação dos Peritos Judiciais do Estado de São Paulo
2012 Entendendo a Responsabilidade Técnica (Carga horária: 7h)
Conselho Regional de Química IV Região
2009 Transition metal catalysis in organic synthesis. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.
2009 Técnicas Microbiológicas. (Carga horária: 6h). Instituto de Química (UNICAMP).
2006 Amostragem e Validação do método analítico. (Carga horária: 8h). Instituto de Química (UNICAMP).

3. Atuação profissional

2015-atual Clariant
Cargo: Químico

4. Artigos completos publicados em periódicos

1. Genome Mining of Endophytic Streptomyces wadayamensis Reveals High Antibiotic Production Capability. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Online), 2016.
2. Gisele A B Canuto, Pedro L R da Cruz, Andrea T Faccio, Aline Klassen, Marina F M Tavares; Neglected diseases prioritized in brazil under the perspective of metabolomics. A Review. ; Electrophoresis, v.10, p. ; 2015
3. Cruz, Pedro P.L.R. Da ; Giarola, Leila R. ; Moraes, Suellen da Silva ; Silva, Déborah Ellen s. G. Da ; Marcon, Joelma ; Azevedo, João l. ; Araújo, Welington l. ; Oliveira, Luciana G. de . Metabolic screening for pks and nrps in endophytic actinobacteria from Citrus reticulata. Química Nova (Impresso), v. 38, p. 333-341, 2015.
4. Cabeça, L.F. ; Pomini, Armando M.; Cruz, Pedro L. R. ; Marsaioli, Anita J.; Binding Events of (S)-N -(3-Oxo-octanoyl)-homoserine Lactone with *Agrobacterium tumefaciens* Mutant Cells Studied by Saturation Transfer Difference NMR. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Online), v. 22, p. 702-708, 2011
5. Gentile, Agustina; Cruz, Pedro ; Tavares, Rafael G. ; Krug-Baldacin, Maria Graziela ; Menossi, Marcelo . Molecular characterization of ScTFIIA□, encoding the putative TFIIA small subunit from sugarcane. *Plant Cell Reports* (Print) v. 29, p. 857-864, 2010.
6. Pomini, Armando M. ; Cruz, P. L. R. ; Gai, Cláudia ; Araújo, Welington L. ; Marsaioli, Anita J. . Long-Chain Acyl-Homoserine Lactones from Synthesis and Absolute Configuration. Journal of Natural Products (Print), v. 72, p. 2125-2129, 2009

5. Capítulos de livros publicados

1. Klassen, Aline ; Faccio, Andréa Tedesco ; Canuto, Gisele André Baptista ; da Cruz, Pedro Luis Rocha ; Ribeiro, Henrique Caracho ; Tavares, Marina Franco Maggi; Sussulini, Alessandra . Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology. 1ed.: Springer International Publishing, 2017, v. , p. 3-17.

6. Outros

1. Manuscrito em preparação: Evaluating kidney post-transplant therapeutical regimens from a metabolomics perspective

2. Trabalho a ser apresentado no PBA 2017, 28th Pharmaceutical and Biomedical Analysis Conference, 2-5.7.2017, Madrid, Spain