

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

LUCAS HENRIQUE FERREIRA DA SILVA

**A abordagem metabolômica na indicação do
tratamento de estenose de junção ureteropélvica em
crianças**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890
O Original se encontra disponível na Secretária de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
22/02/2021

LUCAS HENRIQUE FERREIRA DA SILVA

**A abordagem metabolômica na indicação do
tratamento de estenose de junção ureteropélvica em
crianças**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Química).*

Orientador (a): Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

Co-orientador: Dr. Roberto Iglesias Lopes

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação
Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S586a Ferreira da Silva, Lucas Henrique
A abordagem metabolômica na indicação do tratamento de estenose de junção ureteropélvica em crianças / Lucas Henrique Ferreira da Silva. - São Paulo, 2021.
117 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi
Coorientador: Lopes, Roberto Iglesias

1. Metabolômica. 2. Estenose de Junção Ureteropélvica . 3. Cromatografia líquida. 4. Cromatografia gasosa. 5. Espectrometria de massas. I. T. II. Tavares, Marina Franco Maggi , orientador. III. Lopes, Roberto Iglesias, coorientador.

AGRADECIMENTOS

Quero primeiramente expressar meus agradecimentos aos meus pais, minha mãe que precisou trabalhar já na infância, abandonando os estudos e meu pai que na adolescência precisou virar um homem cuidando, sozinho, da minha bisavó, já muito doente. Ambos nunca entraram em uma universidade, mas os considero doutores na disciplina chamada vencer na vida. Obrigado por me ensinarem valores mais preciosos do que qualquer título. Por serem meu exemplo de vida e sempre me apoiarem, dedico a eles esse trabalho.

Agradeço também meus irmãos Luana, Bruno e Susana, por me aguentarem e fazer parte da minha família, principalmente minha irmã Luana, no qual, durante minha graduação me presenteou com uma cadeira ergonômica, o que aliviou minhas imensas horas de estudos.

Agradeço imensamente minha namorada Lídia, sempre presente. Obrigado pela paciência, conselhos, carinho, amor e pelos momentos de alegria proporcionados. Sua presença deixa a vida mais leve e divertida.

À Profa. Dra. Marina Tavares pela orientação, pela paciência e por depositar a confiança nesse projeto maravilhoso em alguém, até então desconhecido. Sua receptividade a um desconhecido nessa universidade foi fundamental para que eu pudesse me sentir bem nessa nova etapa da vida.

As colegas de laboratório Andréa, Ana Paula, Adriana, Carol, Rose, Rosinha. Conviver com vocês tornaram meus dias de trabalho mais prazerosos, divertidos e enriquecedores. Obrigado pelas discussões sobre metabólica, cromatografia e assuntos gerais sobre a vida. Ao especialista de laboratório Daniel, sempre sorridente e solícito. Ao Prof. Dr. João Pedro Simon Farah, pelos conselhos e orientações estatísticas. Ao Prof. Dr. Robert Ivan Schumacher sempre disposto a ensinar agregando mais valor à equipe.

Ao meu co-orientador Dr. Roberto Iglesias Lopes e ao Dr. Marcos Figueiredo Mello, ambos do Grupo de Urologia Infantil do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), pelo fornecimento de amostras e pela confiança.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, por disponibilizar os equipamentos de GC-MS para as análises metabolômicas. À Lydia Fumiko Yamaguchi pelo auxílio fundamental, sem o qual não seria possível a realização do presente trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira, por disponibilizar os equipamentos para as análises de LC-MS. Pela hospitalidade em Juiz de Fora. Ao Prof. Dr. Thiago Teixeira Tasso, por me acomodar em Juiz de Fora durante minha estadia na cidade.

A amiga Mariane Mirandola (palhaça Churaskinho), seu acolhimento a um forasteiro nessa cidade grande foi essencial no início do meu mestrado. Sem sua ajuda meus primeiros dias seriam muito mais sofridos. Um exemplo de coragem, alegria e perseverança, semelhante a Dona Maria Inez (*In memoriam*).

Aos meus amigos de graduação Amilton, Bruna, Camila, Carla, Giovanna e Vitor. É sempre muito bom poder estar com vocês.

À família da minha namorada, meus sogros Emília e Júlio, seus tios Anita e Ivan, e seu primo Pedro César por sempre me apoiarem.

Ao grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maria Julia Manso Alves, por disponibilizar instrumentos de preparo de amostra. Em especial a técnica Célia Aparecida Ludio Braga, pelo carinho, conselhos, auxílio e abraço de mãe. Impossível não sair feliz depois de 5 minutinhos de conversa com você.

Ao Serviço de Apoio ao Estudante (SAE) da Universidade Estadual de Campinas, por me oferecer todo apoio de permanência estudantil, sem o qual não conseguiria permanecer na graduação.

Ao Instituto de Química da USP pela estrutura, apoio e pelo programa de pós, que permitiu a realização desse projeto.

À CNPq pela concessão da bolsa de mestrado (133021/2018-1). Às agências FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

À todos que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste projeto.

*Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.*

Fernando Pessoa

Tabacaria - 1928

RESUMO

Silva, L.H.F. **A abordagem metabolômica na indicação do tratamento de estenose de junção ureteropélvica em crianças.** 2021. 117p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Estenose de Junção Ureteropélvica (JUP) é uma doença caracterizada pelo bloqueio do fluxo de urina da pelve renal (porção proximal do ureter no rim) ao ureter, tubo que liga o rim à bexiga. Essa formação congênita é uma das maiores causas de dilatação do rim (hidronefrose) em recém-nascidos e, em alguns casos, pode causar danos mais severos ao órgão.

A hidronefrose causada pela estenose de JUP pode desaparecer espontaneamente sem perda da função renal, entretanto, é preciso um acompanhamento clínico. Por outro lado, em casos mais severos, onde a dilatação pode causar danos maiores ao rim, um tratamento cirúrgico se faz necessário. Embora existam métodos para o diagnóstico da estenose de JUP, como ultrassonografia, tomografia computadorizada, ressonância e cintilografia, é um grande desafio diferenciar os pacientes que requerem um tratamento cirúrgico e os que necessitam apenas de um acompanhamento convencional.

A metabolômica global, que investiga de modo comparativo o conjunto de metabólitos de baixa massa molecular expressos em indivíduos em condições pré-selecionadas, tem o potencial de servir como ferramenta diagnóstica para os pacientes com estenose de JUP e, consequentemente, auxiliar na tomada de decisão entre um acompanhamento clínico ou tratamento cirúrgico. Assim sendo, no presente trabalho, três grupos de pacientes com estenose de JUP, pré-diagnosticados por métodos convencionais, foram investigados sob a perspectiva da metabolômica global, por meio de análises de urina, utilizando cromatografia gasosa e cromatografia líquida, ambas acoplada à espectrometria de massas (GC-MS e RPLC-

MS, respectivamente): pacientes que requerem tratamento cirúrgico (CIR), pacientes que requerem acompanhamento clínico (CLI), e indivíduos sãos (CON).

Os resultados mostram que é possível encontrar metabólitos discriminantes entre todas as comparações (CON x CLI, CON x CIR e CLI x CIR); os metabólitos encontrados nas análises multivariada e univariada foram utilizados para construção da curva ROC, para confirmar a possibilidade de utilização desses compostos como biomarcadores.

Foram observadas alterações em rotas metabólicas importantes para o bom funcionamento das funções renais, principalmente entre a comparação mais desafiadora (CLI x CIR), como o metabolismo da fenilalanina, da tirosina, da beta-alanina, dos aminoácidos e dos nucleotídeos. Há indícios de que o ciclo de Krebs também sofre alteração.

Os resultados obtidos podem servir como ponto de partida para uma futura análise alvo e validação biológica.

Palavras-chave: Metabolômica, Estenose de Junção Ureteropélvica, GC-MS, RPLC-MS.

ABSTRACT

Silva, L.H.F. **Metabolomics approach in the treatment of ureteropelvic junction stenosis in children.** 2021. 117p. Master Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ureteropelvic junction (UPJ) stenosis is a disease characterized by the interruption of the flow of urine from the renal pelvis (proximal part of ureter in the kidney) to the ureter, tube that links the kidney to bladder. That congenital formation is one of the main causes of kidney dilation (hydronephrosis) in newborns and, sometimes, can cause more serious damage to the organ.

The hydronephrosis caused by UPJ stenosis can disappear spontaneously without compromising renal function, although a clinical follow-up is required. On the other hand, in more serious cases, when dilation can induce larger damage to the kidney, surgery intervention is necessary. Although there are methods to diagnose UPJ stenosis, such as ultrasound, computed tomography, resonance and scintigraphy, it is still a great challenge to distinguish patients that require surgery from those whose a clinical follow-up suffices.

Global metabolomics, a method that investigates in a comparative manner the set of low molecular mass metabolites expressed by an individual in pre-selected conditions, has the potential to function as a diagnostic tool for patients with UPJ stenosis to support decisions about patient treatment, i.e., surgery versus clinical follow-up.

In this work, three groups of UPJ stenosis patients were investigated with the aid of global metabolomics using urine analysis by gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS and RPLC-MS, respectively): one group consisted of UPJ stenosis patients requiring clinical follow-up (CLI), other group UPJ stenosis patients requiring surgery intervention (CIR) and a third group comprising healthy individuals, the control group (CON).

The results show that it was possible to find discriminant metabolites among all pairwise comparisons (CON versus CLI, CON versus CIR and CLI versus CIR). The metabolites found by multivariate and univariate analyses were used to build ROC curves, to confirm whether it is possible to use them as biomarkers.

Alterations in metabolic pathways that are important for the good maintenance of kidney functions were found, especially in the most challenged comparison (CLI versus CIR), such as the metabolism of phenylalanine, tyrosine, beta-alanine, amino acids and nucleotides. There are evidences that Kreb's cycle was also impacted.

The results obtained here can serve as a starting point to future targeted analysis and biological validation.

Keywords: Metabolomics, Ureteropelvic junction stenosis, GC-MS, RPLC-MS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKI – *Acute Kidney Injury* (Lesão Renal Aguda)

ANOVA – Análise de Variância

AUC – *Area under curve* (Área sob a curva)

BSTFA – N,O-Bis(Trimetilsilil)trifluoroacetamida

bw – Largura de banda

CE-MS – *Capillary Electrophoresis coupled to Mass Spectrometry* (Eletroforese Capilar acoplada à Espectrometria de Massas)

CIR – Amostras de pacientes com estenose de JUP submetidos à pieloplastia

CLI – Amostras de pacientes com Estenose de JUP em acompanhamento clínico

CON – Amostras de pacientes sem patologias do trato urinário

CV – Coeficiente de Variação

CV-ANOVA – *Analysis of Variance of Cross-Validated predictive residuals* (Análise de Variância de resíduos preditivos da Validação Cruzada)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

EI – *Electron impact* (Impacto de Elétrons)

ESI – *Electrospray Ionization* (Ionização por Eletrospray)

F – Coeficiente de Fisher

FAME – Fatty Acid Methyl Ester (Éster metílico de ácido graxo)

FDA – *Food and Drug Administration*

fwhm – Largura de pico tomada na base do pico

GC-MS – *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry* (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas)

GSEA – *Gene Set Enrichment Analysis* (Análise de enriquecimento de um conjunto de genes)

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HILIC-MS – *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*

(Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica acoplada à Espectrometria de Massas)

HMDB – *Human Metabolome Database* (Banco de Dados do Metaboloma Humano)

JUP – Junção Ureteropélvica

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Enciclopédia de genes e genomas de Kyoto)

LC-MS – *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas)

LRA – Lesão Renal Aguda

m/z – Relação massa/carga

max – Número Máximo de Picos por Cromatograma de íon Extraído

MetPA – *Metabolomics Pathway Analysis* (Análise de via metabolômica)

Minfrac – Fração Mínima de Amostras

miRNAs – *Micro Ribonucleic Acids* (ácidos micro Ribonucleicos)

mRNA – *Messenger Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico mensageiro)

MS – Espectrometria de Massas

MS-Dial – *Mass Spectrometry–Data Independent AnaLysis*

mzXML – *Extensible Markup Language*

mzwid – Largura de Sobreposição de Faixas de m/z 's

NetCDF – *Network Common Data Form*

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

NMR – *Nuclear Magnetic Resonance* (Ressonância Magnética Nuclear)

NP – *Normal Phase* (Fase Normal)

PCA – *Principal Component Analysis* (Análise de Componentes Principais)

Peakwidth – Largura de Pico Cromatográfico

PFP – Pentafluorophenyl (Pentafluorofenil)

PGH – Projeto Genoma Humano

PLS-DA – *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais).

Q^2 – Previsibilidade do Modelo

QC – *Quality Control samples* (Amostras de Controle de Qualidade)

Q-TOF – Quadrupole – Time-of-Flight (Quadrupolo - tempo de voo)

R^2 – Variância Explicada pelo modelo

ROC – *Receiver Operating Characteristic* (Características operacionais do receptor)

RPLC-MS – *Reversed-Phase Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida de Fase Reversa acoplada à Espectrometria de Massas)

snthresh – Relação sinal/ruído threshold

TIC – Total Ion Chromatogram (Cromatograma de Íons Totais)

TMCS – Trimetil Cloro silano

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UUO – *Unilateral Ureteral Obstruction* (Obstrução Ureteral Unilateral)

UV – Unidade de Variância

VIP – *Variable Importance in the Projection* (Importância da Variável na Projeção)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Sistema urinário saudável e com estenose de JUP (Modificado de http://uroclinicadabahia.com/pieloplastia-entenda-melhor-o-procedimento-cirurgico-para-tratar-estenose-de-jup/ , acessado em 18/01/2020).	29
Figura 2:	Estrutura da fase estacionária Phenomenex Kinetex [®] PFP (Modificado de https://www.phenomenex.com/info/page/f5 , acessado em 20/12/2020).	44
Figura 3:	Cromatograma do íon extraído do padrão p-fluorofenilalanina de todas as amostras de urina analisadas em RPLC-MS.	45
Figura 4:	<i>Score Plot</i> do modelo de PCA com todas as amostras analisadas por RPLC-MS. As amostras de QC estão destacadas em vermelho. $R^2=0,629$, $Q^2=0,128$.	47
Figura 5:	<i>Score Plot</i> do modelo de PCA com todas as amostras analisadas por RPLC-MS. $R^2=0,580$, $Q^2=0,241$.	48
Figura 6:	<i>Scores plot</i> dos modelos PLS-DA para amostras de urinas, com todas as idades, analisadas por RPLC-MS. Legenda: a) Comparação Controle (CON) vs Clínico (CLI), b) Comparação Controle (CON) vs Cirúrgico (CIR) e c) Comparação Clínico (CLI) vs Cirúrgico (CIR).	49
Figura 7:	<i>Scores plot</i> dos modelos PLS-DA para amostras de urinas de pacientes com estenose de JUP entre 2-12 anos, analisadas por RPLC-MS. Legenda: a) Comparação Controle (CON) vs Clínico (CLI), b) Comparação Controle (CON) vs Cirúrgico (CIR) e c) Comparação Clínico (CLI) vs Cirúrgico (CIR).	51
Figura 8:	Teste de 200 permutações dos modelos de PLS-DA da análise metabolômica por RPLC-MS.	53
Figura 9:	Comparação de diferentes modelos baseados nas curvas ROC. Para a comparação CON X CLI e CON X CIR foram gerados 6 modelos, e para a comparação CIR X CLI, 8 modelos do conjunto de <i>molecular features</i> foram gerados. Todos os modelos foram criados utilizando o PLS-DA <i>built-in</i> . A legenda mostra o número de <i>molecular feature</i> e a AUCs de cada modelo.	54
Figura 10:	Fluxograma da tomada de decisões para a análise univariada.	56
Figura 11:	Cromatograma das amostras com tratamento de urease (vermelho) e sem urease (preto).	60
Figura 12:	Análise de urina por GC-MS. Legenda: a) TIC de uma amostra de urina com tratamento de Urease, b) Espectro de massas do pico em 9.7 min, c) Resultado da comparação de espectro realizando a biblioteca NIST.	61
Figura 13:	Cromatograma de Ions Totais (TIC) do branco sem o tratamento com urease e do branco com tratamento de urease.	62
Figura 14:	TIC de uma mesma amostra de urina tratadas com diferentes concentrações de urease.	63
Figura 15:	Cromatograma com amostra de urina tratada com urease, programando o método para desligar o detector entre 9.6 e 9.8 min.	64

Figura 16:	Exemplificação do mecanismo de reação de metoximação.	66
Figura 17:	Exemplificação do mecanismo de reação de silição.	66
Figura 18:	Cromatograma ilustrando os intervalos de tempo para cada classe de metabólito analisado em GC-MS.	69
Figura 19:	Gráfico da média das intensidades para os três metabólitos selecionados para classes dos açúcares, ácidos carboxílicos, aminoácidos e ácidos graxos.	71
Figura 20:	Fluxograma para preparo de amostra: etapa de remoção da ureia.	72
Figura 21:	Fluxograma para preparo de amostra: etapa de derivatização.	72
Figura 22:	Cromatograma do íon extraído do padrão C13 metil tridecanoato de todas as amostras de urina analisadas em GC-MS.	73
Figura 23:	<i>Score Plot</i> do modelo de PCA com todas as amostras analisadas por GC-MS. As amostras de QC estão destacadas em vermelho. $R^2=0.670$, $Q^2=0,237$.	74
Figura 24:	<i>Score Plot</i> do modelo de PCA com todas as amostras analisadas por GC-MS. $R^2=0.645$, $Q^2=0,247$.	75
Figura 25:	Representação da deconvolução de 2 espectros (verde e laranja) a partir de um cromatograma de íons totais (TIC, em preto).	76
Figura 26:	<i>Scores plot</i> dos modelos PLS-DA para amostras de urinas analisadas por GC-MS. Legenda: a) Comparação Controle (CON) vs Cirúrgico (CIR) e b) Comparação Clínico (CLI) vs Cirúrgico (CIR).	77
Figura 27:	Teste de 200 permutações dos modelos PLS-DA da análise metabolômica por GC-MS.	77
Figura 28:	Comparação dos seis modelos de conjuntos de molecular feature para as comparações baseados nas curvas ROC. Todos os modelos foram criados utilizando o PLS-DA <i>built-in</i> . A legenda mostra o número de <i>molecular feature</i> e a AUCs de cada modelo.	78
Figura 29:	Diagrama de Venn para comparação de número de metabólitos significativos encontrados nas técnicas GC-MS e RPLC-MS.	80
Figura 30:	Diagrama de Venn para comparação de número de metabólitos significativos encontrados nas abordagens univariada e multivariada.	81
Figura 31:	Mapa de visualização das vias metabólicas relevantes para a comparação CON x CIR. As cores variam do amarelo para o vermelho conforme diferentes níveis de significância para a análise de enriquecimento.	94
Figura 32:	Mapa de visualização das vias metabólicas relevantes para a comparação CON x CLI. As cores variam do amarelo para o vermelho conforme diferentes níveis de significância para a análise de enriquecimento.	95
Figura 33:	Mapa de visualização das vias metabólicas relevantes para a comparação CLI x CIR. As cores variam do amarelo para o vermelho conforme diferentes	95

níveis de significância para a análise de enriquecimento.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Comparação dos parâmetros obtidos nos modelos PLS-DA, sem e com a classificação por faixa etária.	52
Tabela 2:	Parâmetros p-valores e AUC para curva ROC dos <i>molecular features</i> encontrados com significância estatística utilizando a abordagem univariada, para análise em RPLC-MS.	58
Tabela 3:	Condições de tempo e temperatura para as duas etapas de derivatização experimentais.	67
Tabela 4:	Número de compostos identificados com scores >80 e CV <30% para as condições as diferentes condições de derivatização.	68
Tabela 5:	Metabólitos selecionados para a avaliação de intensidade nas condições com mais metabólitos identificados (5, 8 e 9) do estudo fatorial de otimização das condições de derivatização de urina.	70
Tabela 6:	Parâmetros p-valores e AUC para curva ROC dos metabólitos identificados com significância estatística utilizando a abordagem univariada, para análise GC-MS.	79
Tabela 7:	Metabólitos discriminantes entre os grupos CON x CLI e suas características obtidas na avaliação metabolômica global por GC-MS e RPLC-MS.	82
Tabela 8:	Metabólitos discriminantes entre os grupos CON x CIR e suas características obtidas na avaliação metabolômica global por GC-MS e RPLC-MS.	85
Tabela 9:	Metabólitos discriminantes entre os grupos CLI x CIR e suas características obtidas na avaliação metabolômica global por GC-MS e RPLC-MS.	89

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	20
1.1. Metabolômica.	21
1.1.1. Análise Instrumental.	25
1.2. Estenose de Junção Ureteropélvica.	28
2- OBJETIVOS	33
3- PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1. Materiais e reagentes.	36
3.2. Coleta de amostra.	36
3.3. Preparo de amostra.	37
3.3.1. RPLC-MS.	37
3.3.2. GC-MS.	37
3.4. Análise Instrumental.	38
3.4.1. Análise por RPLC-MS.	38
3.4.2. Análise por GC-MS.	39
3.5. Tratamento de dados.	40
4- RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
4.1. Análise metabolômica por RPLC-MS.	44
4.1.1. Abordagem multivariada RPLC-MS.	46
4.1.2. Abordagem univariada RPLC-MS.	55
4.1.3. Identificação dos <i>molecular features</i> .	59
4.2. Análise metabolômica por GC-MS.	60
4.2.1. Tratamento com urease.	60
4.2.2. Otimização das condições de derivatização.	64
4.2.3. Abordagem multivariada GC-MS.	73
4.2.4. Abordagem univariada GC-MS.	78
4.2.5. Identificação.	80
4.3. Metabólitos.	80
5- INTERPRETAÇÃO BIOLÓGICA	92
5.1. Análise de via metabólica.	93
5.1.1. Metabolismo da tirosina e fenilalanina.	96
5.1.2. Ciclo de Krebs.	97
5.1.3. Metabolismo dos aminoaçúcares e nucleotídeos	98
5.1.4. Metabolismo da beta-alanina.	99
5.1.5. Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato.	99
6- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	100
6.1. Conclusões.	101
6.2. Perspectivas.	102
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
SÚMULA CURRICULAR	117
ANEXOS	A

Capítulo 1 - Introdução

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Metabolômica

Em 1990 foi criado o Projeto Genoma Humano (PGH) sob a direção de James Watson, um dos responsáveis pela descrição da estrutura da molécula de DNA e ganhador do Nobel de fisiologia ou medicina em 1962^{1,2}. Tal projeto impulsionou a genômica (o estudo do genoma de um organismo) e logo notou-se a necessidade de novas áreas de estudo, como a proteômica (o estudo abrangente do conjunto de proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo) e a transcriptômica (o estudo do RNA dentro de uma célula ou organismo), com o objetivo de entender melhor os mecanismos de funcionamento da célula em nível molecular^{3,4}.

Mesmo com todos os esforços, não foi possível a elucidação completa de todos os mecanismos moleculares de uma célula, pois muitas vezes as alterações observadas em transcriptômica e proteômica podem não ser manifestadas pelos fenótipos bioquímicos⁵. O estudo da metabolômica, portanto, preenche esse *gap* auxiliando em um maior entendimento do mecanismo de funcionamento da célula em nível molecular.

A metabolômica surgiu para auxiliar na compreensão da origem e destino dos produtos de baixa massa molecular sintetizados pelos organismos (metabólitos), bem como suas alterações devido a patologias ou modificações genéticas. Em 1998, Stephen Oliver apresentou o termo metaboloma pela primeira vez, para indicar o conjunto de todos os compostos de baixa massa molecular sintetizados pelo organismo. Em 1999, Jeremy Nicholson *et al.* definiram metabonômica como “Análise quantitativa da medida da resposta dinâmica e multiparamétrica de sistemas vivos a estímulos patofisiológicos ou à modificação genética”⁶. E em 2002, Oliver Fiehn *et al.* publicaram um review sobre análises do metaboloma, e introduzindo a palavra metabolômica, para designar a análise geral e

quantitativa do metaboloma (conjunto de todos os metabólitos de um organismo) do sistema biológico em estudo⁷.

A metabolômica pode ser dividida em metabolômica alvo (*targeted metabolomics*) e metabolômica global ou não direcionada (*untargeted metabolomics*). A primeira se refere à análise quantitativa ou semiquantitativa de metabólitos pré-determinados, e a segunda como sendo a análise global dos metabólitos, qualitativa ou semiquantitativa, por uma determinada técnica analítica⁸. É possível encontrar em estudos relacionados à metabolômica outros tipos de definições, como perfil metabólico (análise de metabólitos previamente selecionados de rotas bioquímicas específicas), *footprinting* metabólico (metabólitos excretados por uma célula em condições controladas) e *fingerprinting* metabólico (metabólitos internos da célula)⁹.

A abordagem metabolômica, geralmente, traça um comparativo entre o metaboloma de um grupo não alterado (controle) e o metaboloma de grupo sujeito a alterações (teste), seja por meio de uma doença, dieta específica, uso de drogas, mutações genéticas, ou mudanças ambientais, entre outras⁹. O conjunto complexo de metabólitos com diferentes propriedades químicas, estruturais e funcionais, além da variabilidade de seus níveis de concentrações de amostras biológicas, torna a análise metabolômica dificultosa, e impossibilita a existência de um único método analítico, que seja eficaz para detectar todos os compostos em uma única análise. Sendo assim, a análise metabolômica apresenta-se como um grande desafio analítico^{9,10}. Os avanços tecnológicos na área da química analítica, e o surgimento de softwares capazes de processar dados de forma rápida, tem se tornado grandes aliados na busca por métodos analíticos que detectam o maior número possível de metabólitos com precisão e sensibilidade. As técnicas mais comumente usadas são a ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectrometria de massas (MS), em geral acoplada a uma técnica de

separação, como cromatografia gasosa (GC-MS), cromatografia líquida (LC-MS) ou eletroforese capilar (CE-MS).

Tais técnicas têm permitido a identificação de centenas de metabólitos, onde alterações de metabólitos endógenos (possíveis candidatos a biomarcadores) são detectadas, ao verificar-se a variação de concentração de metabólitos candidatos a biomarcadores entre um grupo teste e um controle¹¹. Com base nos biomarcadores encontrados é possível realizar prognósticos, diagnósticos¹², selecionar terapias e monitorar a progressão de doenças¹³. Tudo isso corrobora para que a metabolômica possa ser utilizada como uma poderosa ferramenta em aplicações clínicas¹⁴.

Há aplicações clínicas da metabolômica em neurologia^{15,16}, oncologia^{17,18}, gastroenterologia¹⁹, nefrologia^{20,21}, ginecologia²², entre outras.

Embora a metabolômica seja uma ciência relativamente nova, sua utilização vem crescendo ano após ano, e um fluxo de trabalho, muito utilizado nos trabalhos de metabolômica, vem sendo amplamente aplicado. Tal fluxo de trabalho consiste em etapas bem definidas e interligadas que visam garantir, além da qualidade dos estudos, uma padronização dos trabalhos relacionados à metabolômica. Basicamente, o fluxo de trabalho em análises metabolômicas (seja alvo ou global)²³ envolve as seguintes etapas:

- Problema biológico: A primeira etapa para o desenvolvimento de estudos metabolômicos consiste na elaboração do problema biológico o qual se pretende estudar. Nessa etapa também é definida a opção por uma abordagem alvo ou global.
- Desenho Experimental: Definido o problema biológico, um desenho experimental deve ser cuidadosamente pensado, para que as informações desejadas na etapa anterior sejam encontradas ao término do estudo. Pensando nisso, nessa etapa é necessário estabelecer as

condições experimentais adequadas, por exemplo, qual o melhor tipo de amostra, o tipo de organismo e quais serão as exigências dos grupos teste e controle.

- Preparo de amostra: O preparo de amostra está vinculado ao tipo de amostra definido no desenho experimental e ao tipo de análise instrumental, etapa posterior. No caso de uma abordagem global é importante que o preparo de amostra consiga extrair o maior número de metabólitos possíveis de forma simples, e, no caso da metabolômica alvo, os metabólitos de interesse.
- Análise instrumental: Devido à grande variedade de metabólitos existentes, uma única técnica analítica não é capaz de detectar todos os metabólitos. Portanto, é necessário o planejamento prévio de qual técnica deve ser utilizada. Para análise global técnicas mais abrangentes são necessárias, e, no caso de análise alvo o mais adequado é a utilização de técnicas mais seletivas.
- Processamento de dados: Nessa etapa é realizado a extração dos *molecular features* (íon detectado, caracterizado pela combinação do m/z , intensidade e tempo de retenção), criação de uma matriz de dados que correlacione a resposta instrumental com os m/z extraídos, alinhamento, agrupamento e normalização dos dados.
- Análise estatística: Nesse momento do estudo, ocorre a investigação das variáveis (*molecular features*) que contribuem para a distinção entre o grupo submetido ao problema biológico (teste) e o grupo controle. Para encontrar tais variáveis a análise estatística pode ser feita pela perspectiva multivariada e/ou univariada. Na análise multivariada os dois métodos de análises mais populares são: PCA (do inglês *Principal Component Analysis*) e o PLS-DA (do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*). Esses dois métodos visam identificar classes diferentes de um conjunto de

dados multivariado. A análise univariada avalia as variáveis separadamente, sem considerar as relações entre as variáveis²⁴.

- Identificação dos *molecular features*: A identificação dos *molecular features* pode ser feita consultando banco de dados ou por meio de bibliotecas. Em LC-MS os valores de m/z obtidos são consultados em banco de dados como HMDB, KEGG e Metlin. Em GC-MS a identificação é feita comparando o espectro experimental obtido com o espectro em bibliotecas, as mais usadas são Fiehn e NIST.
- Interpretação biológica: A etapa final consiste em associar os metabólitos encontrados a rotas biológicas e a validação biológicas em estudos futuros.

1.1.1 – Análise instrumental

As técnicas analíticas mais utilizadas em metabolômica são a ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectrometria de massas (MS). NMR é altamente seletivo, não destrutivo²⁵ e pode fornecer informações estruturais de compostos desconhecidos, entretanto possui pouca sensibilidade e pode existir dificuldades de aquisição de dados quando o composto possui deficiência de prótons ou quando há interação do próton com o solvente²⁶. A análise por espectrometria de massas normalmente é utilizada em combinação com uma técnica de separação que pode ser cromatografia gasosa (GC-MS), cromatografia líquida (LC-MS) ou eletroforese capilar (CE-MS). A separação produz um dado adicional, o tempo de retenção (ou de migração) do metabólito, que pode ser utilizado também na determinação e comprovação estrutural de um metabólito²⁷.

Acoplar a espectrometria de massas a uma técnica de separação cromatográfica permite a soma das vantagens que cada técnica oferece produzindo alta seletividade, eficiência de separação e informações estruturais e de massa molar²⁸. GC-MS e LC-MS são as

técnicas de separação mais utilizadas em metabolômica, ambas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens, dependendo do tipo de amostra a ser analisada.

O princípio da separação por cromatografia gasosa (GC) é por diferença de distribuição dos componentes da amostra entre uma fase estacionária, que pode ser sólida ou líquida, e uma fase móvel, gasosa²⁹. Em GC a amostra precisa ser vaporizada e injetada na cabeça da coluna e um gás inerte tem finalidade de arrastar o analito através da coluna³⁰. Portanto, pressão de vapor também é importante para discriminar os componentes da amostra.

Em GC-MS a separação dos analitos ocorre em uma coluna cromatográfica que pode ser uma coluna capilar ou empacotadas. A coluna capilar é feita de sílica fundida e a coluna recheada pode ser feita de vidro, aço inox ou cobre²⁹. Em cromatógrafos com colunas capilares, é possível conectar a saída da coluna diretamente com a fonte do espectrômetro e para colunas recheadas deve-se diminuir a vazão antes da conexão com a fonte de ionização do espectrômetro²⁸.

Após a separação, a amostra é introduzida no espectrômetro de massas onde há uma fonte de ionização que transforma as moléculas da amostra em íons. A razão massa/carga do composto (m/z) é detectada pelo espectrômetro.

Em amostras com substâncias pouco voláteis e estáveis termicamente é necessário um pré-tratamento antes da injeção das amostras. A derivatização modifica os compostos tornando-os passíveis de separação por cromatografia gasosa. Esta técnica normalmente é empregada em compostos muito polares²⁹. A etapa de derivatização torna o preparo de amostra mais complexo e demorado, além de introduzir uma fonte de variação³¹.

A maior vantagem do GC-MS está na fácil identificação dos metabólitos, pois existem bibliotecas, com padrão de fragmentação, para vários metabólitos, aumentando a

confiabilidade dos resultados obtidos³². A biblioteca mais utilizada para identificação em estudos metabolômicos é a produzida pelo laboratório do professor Fiehn³³.

Em cromatografia líquida temos a separação de misturas, no qual seus componentes são distribuídos em duas fases, a fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária é a componente fixa e a fase móvel é um líquido que passa pela fase estacionária, competindo pelo analito através de interações químicas²⁹.

A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) possui grande versatilidade analítica devido à possibilidade de intercambiar a fase estacionária, aumentando a cobertura metabólica. Embora apresente alta robustez, sensibilidade e seletividade, sua resolução é menor quando comparada a GC-MS³⁴. Uma das inegáveis vantagens do LC-MS, é, na maioria dos casos, o simples preparo de amostra, não sendo necessário derivatizar a amostra, como na cromatografia gasosa. Geralmente, nos casos de metabolômica global, o preparo consiste apenas na simples remoção de proteínas. Para metabolômica alvo etapas, como extração líquido-líquido, podem ser utilizadas, visando a extração de metabólitos específicos. Em muitos casos, como em amostras de urina, ocorre a injeção direta da amostra diluída ou filtrada, sem muita manipulação da amostra³⁴.

A fase estacionária utilizada em LC-MS depende do tipo de amostra e das classes de metabólitos de interesse. A fase reversa (RPLC-MS) é utilizada para compostos apolares, como lipídeos e esteroides. Para metabólitos com alta polaridade o modo de interação hidrofílica (HILIC-MS) vem sendo largamente utilizado em estudos de metabolômica, principalmente quando a matriz biológica é a urina. Embora HILIC seja análoga à fase normal (NP) ao utilizar fase estacionária de composição similar, como sílica não derivatizada por exemplo, sua diferença consiste na utilização de solvente orgânico polar na fase móvel, como acetonitrila por exemplo, o que é característico de fase reversa (RP). No entanto, diferentemente de RP, em HILIC, o solvente forte é a água, e a eluição dos analitos é em geral

conduzida com quantidades crescentes de água na fase móvel. Essas características são compatíveis com o espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (ESI)³⁵. HILIC-MS permite uma boa separação de compostos polares e identificação putativa dos compostos através da busca em banco de dados, como *The Human Metabolome Database* (HMDB) que possui 41.000 metabólitos, utilizando massa exata³⁶.

1.2 – Estenose de Junção Ureteropélvica

Nosso sistema urinário é formado pelos rins, ureteres, bexiga e uretra. Esse conjunto de órgãos tem a função de eliminar resíduos produzidos pelo nosso corpo. Entretanto, mais do que apenas função excretora, os rins possuem também algumas funções reguladoras muito importantes. Os rins regulam a osmolalidade (pressão osmótica) e os volumes dos líquidos corporais, o balanço eletrolítico (níveis de sais) e o balanço ácido-básico (controle de pH)³⁷.

A filtração do sangue, pelos rins, produz a urina, que contém sais, metabólitos e água que precisa ser filtrada para fora do sangue. Outra função importante da produção de urina é a de eliminação de substâncias estranhas, como drogas, pesticidas e outras substâncias químicas do organismo. A urina produzida é drenada para pelve renal, que representa a região superior e expandida do ureter, que leva a urina da pelve para a bexiga urinária.

As funções de regulação e de excreção são de extrema importância para a saúde, tanto que o renomado e pioneiro fisiologista americano Homer W. Smith disse “Basta que a composição do nosso ambiente interno se modifique, basta que nossos rins deixem de cumprir suas funções por um breve momento para que nossa integridade mental, ou nossa personalidade, seja destruída”³⁷.

Quando ocorre obstrução urinária entre a junção ureteropélvica (JUP), pode ocorrer dilatação (hidronefrose) e subsequentemente nefropatia³⁸.

A maior causa de hidronefrose infantil é a obstrução (ou estenose) de junção ureteropélvica³⁹. Estenose de JUP é caracterizada pelo bloqueio do fluxo de urina na pelve

renal (porção proximal do ureter no rim que é dilatada em forma de funil) ao ureter (tubo que liga o rim à bexiga). Esse estreitamento impede o esvaziamento adequado da pelve renal resultando em hidronefrose. Um em cada 1000 a 2000 recém-nascidos nasce com hidronefrose⁴⁰. E, por razões desconhecidas, afeta três vezes mais pacientes do sexo masculino, do que o feminino⁴¹. A obstrução urinária pode causar formação de cálculos, dor recorrente, infecções do trato urinário e sangramento⁴². A Figura 1 ilustra a comparação de um sistema urinário com e sem estenose de JUP, e a consequente hidronefrose no rim.

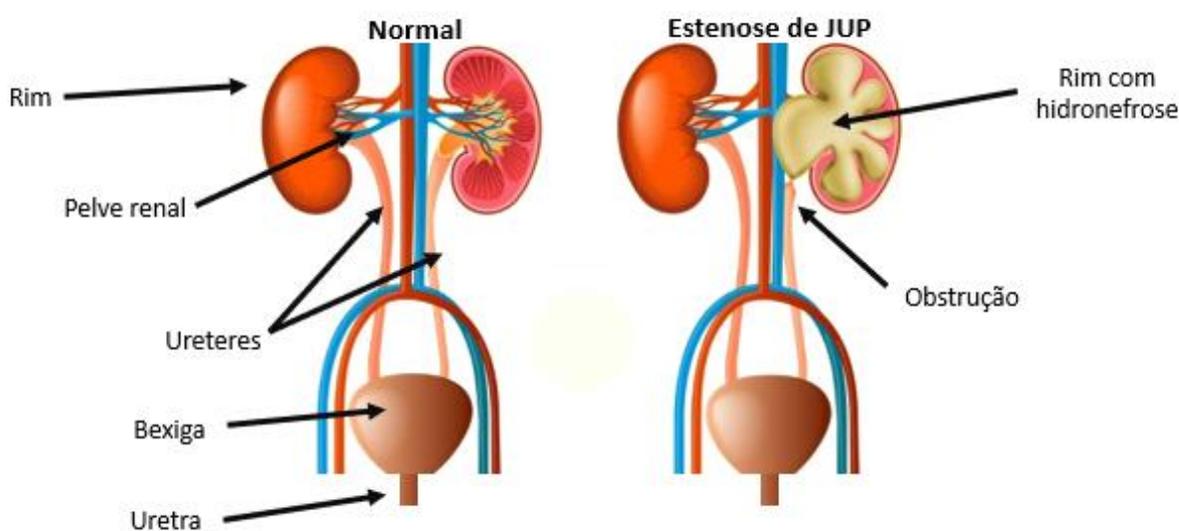


Figura 1: Sistema urinário saudável e com estenose de JUP (Modificado de <http://urocliniacadabahia.com/pieloplastia-entenda-melhor-o-procedimento-cirurgico-para-tratar-estenose-de-jup/>, acessado em 18/01/2020).

É possível diagnosticar a obstrução de JUP durante o pré-natal, e o método mais utilizado é a ultrassonografia⁴³. Em recém-nascidos com suspeita de hidronefrose, a ultrassonografia das vias urinárias é um exame complementar, sendo recomendada a realização do exame com sete dias de vida⁴⁴.

Após detectada a obstrução de JUP é preciso determinar se é necessário realizar uma cirurgia para corrigir a obstrução (pieloplastia), ou se apenas um acompanhamento médico precisa ser feito, pois em alguns casos a hidronefrose desaparece espontaneamente sem danos à função renal⁴⁵. Até o final dos anos 80, os recém-nascidos diagnosticado com hidronefrose, cuja suspeita da causa era a estenose de JUP, a intervenção cirúrgica era, predominantemente, a decisão adotada, devido à preocupação com a integridade das funções renais. Entretanto, como já citado, em alguns pacientes o quadro de hidronefrose era revertido, sem intervenção cirúrgica e sem danos às funções renais. Isso levou a controversas na comunidade médica, pois alguns defendiam a intervenção precoce, enquanto outros eram a favor de um acompanhamento rigoroso, sendo a cirurgia uma opção apenas quando detectado sinais de deterioração renal⁴⁵.

Atualmente a cirurgia é recomendada quando há uma significativa hidronefrose associada à perda da função renal⁴⁶. Durante o acompanhamento médico, exames periódicos podem ser realizados para acompanhar a evolução da hidronefrose. A realização de exames clínicos, que permitam diferenciar os pacientes que requerem um tratamento cirúrgico e os que apenas necessitam de um acompanhamento convencional, ainda é um grande desafio⁴², pois muitas vezes a urografia intravenosa ou o ultrassom comum não são capazes de definir o grau de obstrução⁴⁷.

Como não existe um padrão de referência para identificar a obstrução, o uso de investigações radiológicas, como ultrassonografia diurética, renografia, urografia excretora, e a utilização de radioisótopos são realizadas⁴⁷. Tais métodos são invasivos, pois esporadicamente é necessária a injeção de contrastes ou materiais radioisotópicos. Além de efeitos adversos da exposição da criança à radiação, a pouca idade dos pacientes pode dificultar ainda mais a realização desses exames. Atualmente alguns estudos têm procurado

identificar marcadores para a obstrução de JUP. Entretanto, em metabolômica, os marcadores já identificados ainda não foram validados para decisões de triagem clínica.

Há trabalhos na literatura utilizando abordagens ômicas no estudo da estenose de JUP e outras doenças do trato urinário.

Em 2006, Schanstra e colaboradores analisaram polipeptídeos em recém-nascidos com obstrução de JUP. Com os resultados gerados, utilizando CE-MS, e um tratamento embasado na proteômica, concluíram que é possível, com vários meses de antecedência e com 94% de precisão, com base na evolução clínica de neonatos com obstrução de JUP, prever a necessidade de cirurgia⁴⁸.

Beger *et al.* estudaram, em 2008, o surgimento de lesão renal aguda, LRA, (do inglês, *acute kidney injury*, AKI) em crianças após cirurgia cardíaca, utilizando uma abordagem metabolômica. Dessa forma identificaram por espectrometria de massas, o ácido homovanílico sulfato (HVA-SO₄), um metabólito da dopamina, como um possível biomarcador para predizer antecipadamente a lesão renal aguda, após uma cirurgia cardíaca pediátrica⁴⁹.

Jens Drube *et al.* (2009) utilizaram o método descrito por Schanstra e colaboradores em 2006, e concluíram que o padrão de proteômica estabelecido só é eficiente, para prever a necessidade de cirurgia em crianças com obstrução de JUP, quando o paciente tem menos de 1 ano de idade⁵⁰.

Em 2010, Mesrobian e colaboradores, assim como Schanstra e colaboradores, encontraram biomarcadores proteicos presentes na urina, em crianças com obstrução de JUP, analisando amostras de urina por LC-MS e empregando uma abordagem proteômica⁵¹.

MacLellan *et al.* (2011) discriminaram metabólitos associados à obstrução do trato urinário em camundongos, utilizando NMR e uma abordagem metabolômica⁵².

Estudos realizados por Boizard *et al.* (2016) compararam o metaboloma urinário de 34 recém-nascidos com obstrução de JUP e 15 recém-nascidos saudáveis, utilizando CE-MS, e identificaram 32 compostos, com os quais conseguiram predizer, com 76% de sensibilidade e 86% de especificidade, a obstrução de JUP em um grupo de 24 indivíduos⁵³.

Klein *et al.* (2017) realizaram um estudo correlacionando a obstrução ureteral unilateral (unilateral ureteral obstruction, UUU, em inglês) em ratos e a obstrução de JUP em crianças. Combinando dados de miRNoma (definido como o espectro completo de miRNAs, pequenos RNAs não codificantes, expressos em um genoma) e transcriptoma, encontraram nas moléculas let-7a e miR-29b relação com o desenvolvimento de fibrose em obstrução de JUP⁵⁴.

Sumner e Brophy *et al.* (2017) concluíram, analisando amostras de urina de recém-nascidos com a técnica de NMR, e utilizando uma abordagem metabolômica, que é possível diferenciar recém-nascidos com e sem AKI⁵⁵.

Capítulo 2 - Objetivos

2 – OBJETIVOS

Analisar e comparar o metaboloma de crianças classificadas clinicamente em três grupos distintos, utilizando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (RPLC-MS e GC-MS):

1. Crianças com estenose de JUP submetidas a pieloplastia (CIR);
2. Crianças com Estenose de JUP em acompanhamento clínico (CLI);
3. Crianças sem patologias do trato urinário (CON), do ambulatório de puericultura.

E encontrar possíveis candidatos a biomarcadores, que discriminem os grupos com tratamento cirúrgico e clínico e permitam prever indicação cirúrgica ou seguimento clínico para os pacientes com estenose de JUP.

Capítulo 3 – Parte Experimental

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais e Reagentes

Isopropanol (Sigma-Aldrich, Alemanha), heptano (Sigma-Aldrich, Alemanha), C13 metil éster (Sigma-Aldrich, Alemanha), N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida – BSTFA com 1% trimetilclorosilano – TMCS (Sigma-Aldrich, Alemanha), piridina (Sigma-Aldrich, Alemanha), cloridrato de O-metoxiamina (Sigma-Aldrich, Alemanha), urease (Sigma-Aldrich, Alemanha) e FAME mix, (Sigma-Aldrich, Alemanha) foram adquiridos.

Como equipamentos de bancadas foram utilizados: vortex (Biomixer, Brasil) banho de ultrassom (Quimis, Brasil), banho termostatizado (LAUDA ECO RE 1225, Alemanha), SpeedVac (Eppendorf, Alemanha) e centrífuga (Sigma 1 – 14k, Sigma).

3.2 - Coleta de amostra

As amostras foram fornecidas pelo Dr. Marcos Figueiredo Mello, orientando Dr. Roberto Iglesias Lopes, ambos do Grupo de Urologia Infantil do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Pacientes com diagnóstico de estenose de JUP confirmado foram divididos em dois grupos. Um grupo consiste em pacientes com indicação cirúrgica (CIR), e o segundo grupo é formado por pacientes em observação clínica (CLI). As amostras do grupo CIR foram coletadas no pré-operatório e as amostras do grupo CLI foram fornecidas pelos pacientes em consultas de rotina. O grupo de crianças sem estenose de JUP (CON) é composto por crianças sem patologias, do ambulatório de puericultura.

Foram fornecidas 70 amostras, a saber:

- a. 23 amostras do grupo CIR;
- b. 24 amostras do grupo CLI;

c. 23 amostras do grupo CON.

3.3 – Preparo de amostra

3.3.1 – RPLC-MS

Para o preparo de amostra foi adicionada, em 100 μL de urina, uma alíquota de 300 μL de metanol gelado contendo 66,67 $\mu\text{mol/L}$ de p-fluorofenilalanina como padrão interno, resultando na concentração final de 50 $\mu\text{mol/L}$ de padrão interno. As amostras foram agitadas em vortex e colocadas em freezer por 30 min. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm durante 10 min. Foram retirados 100 μL do sobrenadante e transferidos para *inserts*, colocados em *vials*, e submetidos à injeção no cromatógrafo. Quatro amostras contendo apenas água foram igualmente preparadas para serem analisadas como branco de preparo.

Para verificar a estabilidade instrumental durante a corrida analítica, uma amostra de controle de qualidade (QC) foi preparada utilizando 15 μL de todas as amostras utilizadas no estudo.

3.3.2 – GC-MS

3.3.2.1- Tratamento com urease

As amostras foram descongeladas em gelo e homogeneizadas em um vortex. Uma alíquota de 100 μL foi retirada e transferida para um tubo eppendorf. Foi realizado um tratamento com uma solução de urease na concentração final 10 mg/mL e o tubo levado a um banho termostático a 37°C por 1 h.

Após o tratamento com urease, foi adicionado isopropanol (-20 °C), na proporção urina:isopropanol 1:6, para precipitação de proteínas. As amostras foram agitadas em vortex e colocadas em freezer (-20 °C), pelo período de 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 10 min a uma temperatura de 4 °C. Foram retirados 200 μL do sobrenadante e transferidos para *inserts* e evaporados no *Concentrator plus*.

3.3.2.2- Derivatização

Para a etapa de metoximação foram adicionados 20 μL de cloridrato de metoxiamina em piridina (15 mg/mL) em cada *insert* contendo a urina tratada com urease (amostra seca). Os *inserts* foram colocados em *vials* e agitados em vortex e colocado em ultrassom por 10 s. Os *vials* foram cobertos com papel alumínio e permaneceram durante 16 h à temperatura ambiente e protegidos da luz.

Após o período de 16 h foram adicionados 20 μL de BSTFA com 1 % TMCS em cada amostra, e com o auxílio de um vortex e ultrassom (10 s), as amostras foram homogeneizadas e levadas ao banho a 70 °C por 1 h.

Em seguida, as amostras foram diluídas em 100 μL de heptano e analisadas por GC-MS.

Para o preparo das amostras QC, foram utilizados 20 μL de todas as amostras utilizadas no estudo. Três amostras contendo apenas água passaram pelo tratamento de urease e pelas etapas de derivatização para serem analisadas como branco de preparo.

3.4 – Análise Instrumental

3.4.1 – Análise por RPLC-MS

As análises por RPLC-MS foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a líquido Agilent 1260 *Infinity* II, acoplado a um espectrômetro de massas com analisador quadrupolo tempo-de-voo (Q-TOF) Agilent 6530. Um volume de 0,50 μL de amostra foi injetado na coluna Phenomenex (Torrance, CA, EUA) Kinetex[®] PFP (150 \times 2,1 mm, 2,6 μm) conectada a uma pré-coluna Phenomenex PFP (2,1 mm) mantida a 40 °C. A fase móvel A consistiu em 0,10 % v/v ácido fórmico em água e a fase B, de 0,10% v/v ácido fórmico em metanol. A bandeja de amostra foi mantida a 4 °C durante as análises. O gradiente

utilizado foi: 0-1 min (0% B), 1-2,5 min (0-25% B), 2,5-3 min (25-90% B), 3-5 min (90-100% B), 5-8 min (100% B), 8-8,1 min (100-0% B), 8,1-17,5 min (0% B). A espectrometria de massas foi feita na faixa de m/z de 75-1200 a uma velocidade de 1 spectra/s. A voltagem do capilar foi de 3500 V, do fragmentor 125 V, do Skimmer 65 V, do Nozzle de 1000 V e do octopolo 750 V. Para o ESI, a pressão do nebulizador foi de 30 psi, a temperatura do gás de secagem foi de 250 °C a uma vazão de 8 L/min. Para o gás de impulsão (*sheath gas*) do sistema de Jet Stream, a temperatura foi de 350 °C a uma vazão de 11 L/min. Uma solução com massas de referência (purina 5 µmol/L, HP-0921 2,5 µmol/L) era continuamente analisada para correção de m/z . Após 8,5 min de análise, o fluxo proveniente da cromatografia líquida era desviado do espectrômetro de massas para o rejeito.

3.4.2 – Análise por GC-MS

As análises por GC-MS foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, do Instituto de Química – USP.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (SHIMAZU GC-2010 Plus). Um volume de 1 µL das amostras derivatizadas foram injetadas na coluna Agilent J&W GC (Agilent Technologies) HP5-MS (30 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro interno, filme de 0,25 µm com 95% dimetilpolisiloxano e 5% fenil). Para a fase móvel foi utilizado gás Hélio de alta pureza em uma vazão de 1 mL/min e a temperatura do injetor foi de 250 °C. A razão do *split* foi de 1:10 a 10 mL min⁻¹. O tempo total da análise foi de 25 min para cada amostra.

Um gradiente de temperatura foi aplicado nas seguintes condições: temperatura inicial do forno a 60 °C mantida por 1 min, aumentando para 300 °C na taxa de 10 °C min⁻¹. A temperatura da linha de transferência do detector foi de 290 °C, do filamento de 230 °C e do quadrupolo, 150 °C. A fonte por impacto de elétrons utilizada foi de 70 eV e o espectrômetro de massas foi operado em modo scan na faixa de 50-600 m/z .

Para omitir o registro do sinal do fosfato, foi adicionado ao método uma programação do detector, que realizava *turn off* em 9,6 min e *turn on* 9,8 min da corrida cromatográfica.

As análises por GC-MS foram realizadas utilizando as condições descritas por Fiehn *et al.*, para que fosse possível a identificação dos metabólitos utilizando a biblioteca Fiehn e, sendo complementada posteriormente pela biblioteca NIST⁵⁶.

3.5 – Tratamento de dados

Os dados gerados nas análises por GC-MS foram convertidos para o formato NetCDF, utilizando o software *Data analysis* versão 4.3 (Bruker) e os dados gerados no LC-MS foram convertidos para mzMXL usando software MSconvert (ProteoWizard). Foi necessário converter os arquivos para que fosse possível o processamento de dados usando o software de acesso livre R versão 3.6.1 (R Development Core Team) e o pacote XCMS⁵⁷.

Os dados de LC-MS foram processados com o método “*centWave*” e os parâmetros utilizados para a extração dos picos foram: largura do pico ($\text{peakwidth} = c(3, 30)$), o desvio máximo permitido de m/z ($\text{ppm} = 50$), mínima diferença entre os m/z ($\text{mzdiff} = 0.01$), mínima intensidade para não ser considerado ruído ($\text{noise} = 500$), e a razão sinal/ruído ($\text{snthresh} = 12$). Para o agrupamento foi utilizado algoritmo density e os parâmetros foram: a fração mínima de amostras necessárias em pelo menos um grupo ($\text{minFraction} = 0.7$), largura de banda ($\text{bw} = 3$).

Para os dados adquiridos por GC-MS foi utilizado o método “*matched filter*” e os parâmetros utilizados para extração dos picos foram: largura de pico ($\text{fwhm} = 4$), relação sinal/ruído ($\text{snthresh} = 2$), mínima diferença entre os m/z ($\text{mzdiff} = 0.01$), número máximo de picos por cromatograma de íon extraído ($\text{max} = 30$). Para o agrupamento com correção de largura de banda ($\text{bw} = 2$), largura de faixas sobrepostas de m/z ($\text{mzwid} = 0.5$), a fração mínima de amostras necessárias em pelo menos um grupo ($\text{minfrac} = 0.7$). E o tempo de retenção foi corrigido pelo algoritmo *retcor* ($\text{Family} = \text{gaussian}$).

Tanto nos dados de GC-MS quanto de RPLC-MS, foram utilizados o algoritmo *fillpeaks* para o preenchimento de valores de intensidade de picos não encontrados em algumas amostras.

Os *molecular features* detectados em 4 ou 3 amostras dos brancos de preparo foram removidos. *Molecular features* que apresentaram um coeficiente de variação (CV) maior que 30 % foram removidos.

Os dados fornecidos pelo *XCMS* foram submetidos à normalização pela mediana, escalonados pela Unidade de Variância (UV), e ainda foi feita uma transformação logarítmica dos dados. Em seguida, os dados foram analisados no software *SIMCA P+12.0.1* (Umetrics), utilizando análise de componentes principais, PCA, que consiste em uma manipulação matemática da matriz contendo os dados originais, a fim de reduzir a dimensionalidade original da matriz; essa manipulação está fundamentada na correlação entre as variáveis e permite verificar a existência de separação espontânea dos grupos que estão sendo comparados⁵⁸. Após o PCA, foi realizado a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA – *Partial Least Squares Discriminant Analysis*), para identificação dos metabólitos discriminadores candidatos. O PLS-DA é um método supervisionado, que associa uma classe a cada observação⁵⁹. *Molecular features* discriminantes no modelo PLS-DA foram selecionados utilizando a lista de *Variable Importance Projection* (VIP). As variáveis com *VIP scores* >1 foram selecionadas para posterior identificação.

Foi utilizado o *software MS-dial* para a deconvolução e identificação dos espectros das análises de GC-MS. A identificação dos metabólitos analisados por GC-MS foi feita utilizando a biblioteca de dados Fiehn RT Library (FiehnLib) e NIST MS Search 2.0.

No caso dos *molecular features* analisados por RPLC-MS a identificação valeu-se dos dados armazenados nos bancos de dados do HMDB, KEGG e Metlin. Os possíveis adutos

inseridos na busca foram $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+2H]^+$ e $[M+K]^+$, com erro máximo de massa de 10 ppm.

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – Análise metabolômica por RPLC-MS

A composição da urina contém aproximadamente 95% de água⁶⁰. Muitas substâncias apolares e insolúveis ou pouco solúveis em água, quando absorvidos pelo organismo geralmente são transformadas (metabolizadas) em compostos mais polares visando a excreção renal.

A presença de muitos compostos polares torna a separação em amostra de urina pouco eficiente para cromatografia líquida de fase reversa. Em geral, compostos polares são pouco retidos nesse modo, utilizando fases estacionárias tradicionais como C18 e C8, portanto é necessária uma fase estacionária modificada. Uma das alternativas usadas para contornar esse problema é utilizar uma fase reversa contendo grupos polares. Dessa forma, no presente estudo, a fase estacionária utilizada para a análise de amostras de urina dos pacientes teve na sua composição grupos pentafluorofenil (PFP) (Figura 2). Essa modificação permite que a polaridade da coluna aumente e, conseqüentemente aumente a capacidade de reter compostos mais polares que uma C18 convencional, tornando possível a análise de urina com maior cobertura metabólica por cromatografia líquida em fase reversa⁶¹.

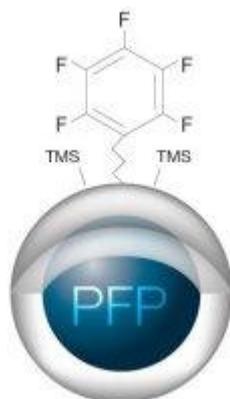


Figura 2: Estrutura da fase estacionária Phenomenex Kinetex ® PFP (Modificado de <https://www.phenomenex.com/info/page/f5>, acessado em 20/12/2020).

Empregou-se um padrão interno (p-fluorofenilalanina) no preparo das amostras de urina, para avaliar a qualidade das análises e corrigir possíveis erros de injeção; o cromatograma do íon extraído do padrão interno, p-fluorofenilalanina foi plotado para todas as análises. Na Figura 3 é possível observar pouca variação nas áreas e no tempo de retenção do padrão interno em todas as amostras de urina analisadas, demonstrando repetibilidade do método empregado. O CV das áreas do p-fluorofenilalanina para as 78 amostras injetadas foi de 3%, confirmando a baixa variação de área das injeções durante a sequência analítica.

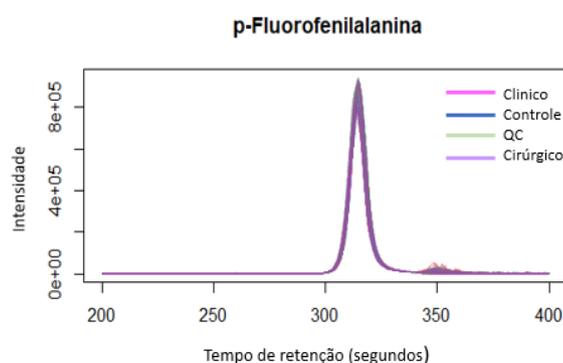


Figura 3: Cromatograma do íon extraído do padrão p-fluorofenilalanina de todas as amostras de urina analisadas em RPLC-MS.

A análise por RPLC-MS gera dados de alta complexidade em três dimensões (m/z , tempo de retenção e intensidade). Então, os dados brutos foram processados pelo software XCMS para obtenção de uma tabela com os *molecular features* para as análises estatísticas.

Assim, a Tabela obtida pelo XCMS para os dados de RPLC-MS apresentou, após subtrair o branco, 3533 *molecular features*.

Amostras de controle de qualidade (QC), compostas por um pool de todas as amostras do estudo, foram analisadas no início, a cada 5-10 amostras e ao final das análises. Para remover *molecular features* que foram medidos com muita variação, usou-se como critério remover *molecular features* com CV maior que 30 % nas amostras de QC, restando 1926 *molecular features*.

Os dados foram normalizados pela mediana, escalonados pela Unidade de Variância (UV), em que a escala é o desvio padrão, e foi ainda utilizada uma transformação logarítmica. A normalização é feita para remover variações sistemáticas, geralmente associadas com o tamanho da amostra, ou quando a concentração absoluta da amostra não pode ser facilmente controlada, por exemplo, o volume de injeção no cromatógrafo, ou variação na quantidade de um extrato biológico. O escalonamento tem a função de diminuir as distâncias entre as variáveis, e é recomendando sempre quando as variáveis apresentam uma grande faixa de variação dos dados, minimizando a influência de uma variável dominante. E a transformação logarítmica foi utilizada para linearizar os dados, além de reduzir a heterogeneidade da variação, uma vez que, o intervalo dos valores em amostras biológicas costuma variar em várias ordens de magnitude; essa transformação não afeta a interpretação qualitativa dos resultados⁶².

Os 1926 *molecular features* gerados após o tratamento de dados foram utilizados para a análise multivariada e univariada.

4.1.1 – Abordagem multivariada RPLC-MS

O modelo de PCA, análise de componentes principais, é um método que converte a matriz de dados multidimensional em uma dimensão menor, por meio de reconhecimento de padrões; isso transforma os dados originais, em gráficos que podem informar similaridade entre as amostras e as variáveis responsáveis por isso. Esse método é conhecido como método não supervisionado, ou seja, não é apresentado ao modelo dados de qual grupo as amostras pertencem⁶³. Com os dados tratados obteve-se o PCA (Figura 4) de todas as amostras analisadas por RPLC-MS. Nesse modelo foi observado que as amostras de QC se encontram próximas umas às outras e perto do centro do *plot*, indicando que a variabilidade instrumental durante a análise é menor que a variabilidade biológica das amostras, viabilizando o tratamento estatístico comparativo dos dados. Foram utilizadas 8 amostras de QC que foram

analisadas no início, entre as amostras e no final da sequência analítica, para que fosse possível o monitoramento da performance do método, bem como a estabilidade instrumental.

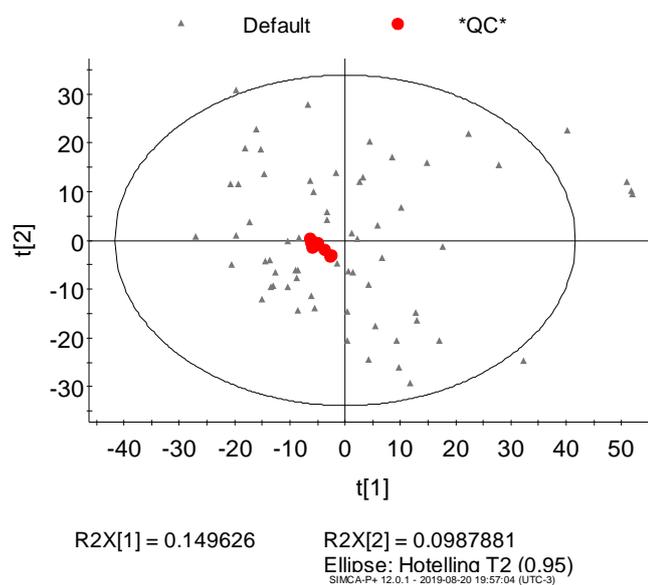


Figura 4: *Score Plot* do modelo de PCA com todas as amostras analisadas por RPLC-MS. As amostras de QC estão destacadas em vermelho. $R^2=0,629$, $Q^2=0,128$.

Após a verificação da estabilidade instrumental, por meio dos QC's, foi plotado o PCA de todas as amostras. O resultado não se mostrou eficiente em separar os três grupos presentes na matriz (Figura 5).

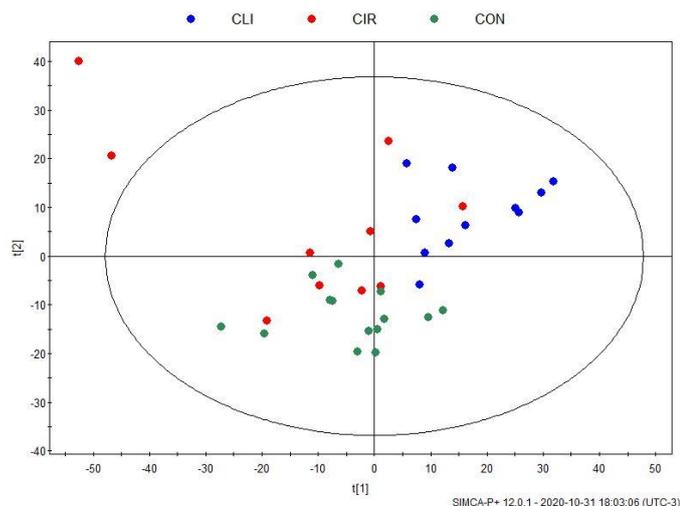


Figura 5: *Score Plot* do modelo de PCA com todas as amostras analisadas por RPLC-MS. $R^2 = 0,580$, $Q^2 = 0,241$.

Para melhorar a separação entre os grupos foi utilizado o PLS-DA (análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais), um método de regressão multivariada. Diferente do modelo de PCA, o PLS-DA é um modelo supervisionado, nesse modelo é atribuído qual grupo cada amostra pertence. Embora, o PLS-DA apresente uma informação a mais, os princípios básicos que governam o modelo PLS-DA são os mesmos do PCA⁶⁴.

A predição do modelo do PLS-DA pode ser avaliada pelo Q^2 , que é estimado utilizando a validação cruzada. No software SIMCA-P utilizado para a construção do modelo o *default* para a validação cruzada é o *k-fold*, que consiste em dividir o conjunto de dados em k partes diferentes, ou seja, subconjuntos, no caso $k=7$, para um número de componentes fixas o valor de Y de todas as amostras de um subconjunto é predito utilizando os outros subconjuntos (k-1) para a estimativa, esse processo é repetido para todos os subconjuntos. O Q^2 é calculado usando a diferença do valor de Y observado e o valor calculado⁶⁵.

Os parâmetros que medem a qualidade do modelo, R^2 e Q^2 , avaliam, respectivamente, a variância explicada pelo modelo e a capacidade de previsão do modelo.

A Figura 6, apresenta os modelos de PLS-DA obtidos para as três comparações (clínico/controle, cirúrgico/controle e clínico/cirúrgico). Valores poucos satisfatórios foram encontrados para as comparações entre os grupos controle/clínico (CLI x CON) ($Q^2=0,539$ e $R^2=0,956$) e controle/cirúrgico (CON x CIR) ($Q^2=0,512$ e $R^2=0,809$). Para a comparação entre os grupos clínico e cirúrgico (CLI x CIR) o modelo apresentou valores insatisfatórios de Q^2 (0,317), mesmo tendo um valor aceitável de R^2 (0,947). A análise de variância (ANOVA) dos resíduos da validação cruzada dos modelos de PLS-DA mostrou boa significância estatística para as comparações CON x CLI ($F=1,433$ e $p\text{-valor} = 0,007$) e CON x CIR ($F=8,93$ e $p\text{-valor} = 4 \times 10^{-5}$) e sem significância estatística para a comparação CLI x CIR ($F=1,433$ e $p\text{-valor} = 0,2$).

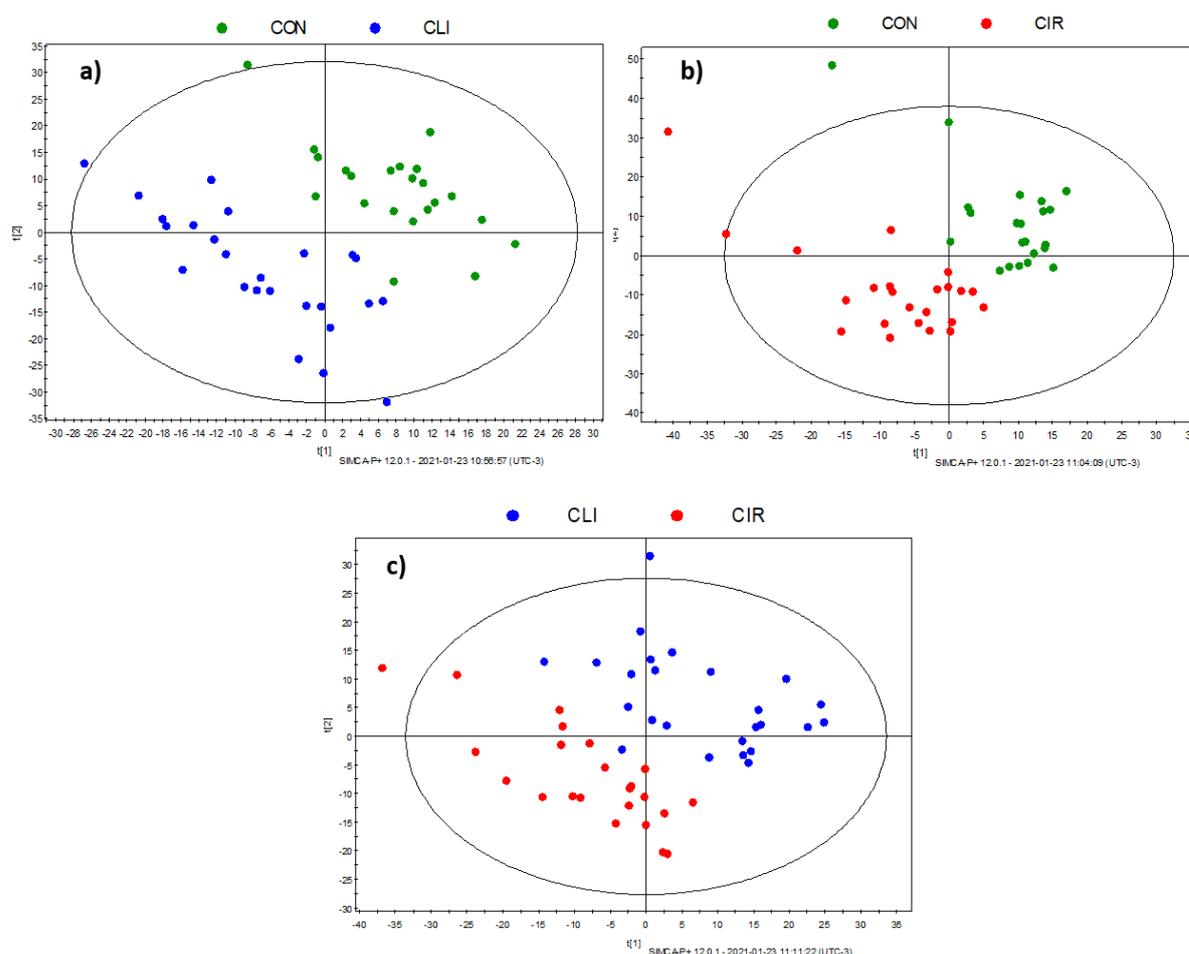


Figura 6: Score plot dos modelos PLS-DA para amostras de urinas, com todas as idades, analisadas por RPLC-MS. Legenda: a) Comparação Controle (CON) vs Clínico (CLI), b) Comparação Controle (CON) vs Cirúrgico (CIR) e c) Comparação Clínico (CLI) vs Cirúrgico (CIR).

Uma possível explicação para a baixa previsibilidade dos modelos está no fato de que, o intervalo de idade dos indivíduos nos grupos é muito grande (para o grupo cirúrgico a faixa de idade varia de 4 meses a 17 anos, para o grupo clínico, de 8 meses a 17 anos e o grupo controle possui uma variação de 3 a 10 anos). Além disso, entre os pacientes de um mesmo grupo existem diferenças fisiológicas, morfológicas e comportamentais distintas devido a essa grande faixa de idade. Dessa forma, a variabilidade biológica dentro do mesmo grupo de pacientes é muito maior do que as diferenças metabólicas entre os pacientes cirúrgicos ou clínicos. Para agrupar esses pacientes por idade, foi utilizado os critérios da *Food and Drug Administration* (FDA) que utiliza o desenvolvimento pediátrico e capacidade metabólica, como critérios⁶⁶. Os grupos categorizados, e que pertencem ao nosso conjunto de amostras são:

- Neonatos: nascimento até 1 mês;
- Bebês: 1 mês até 2 anos;
- Crianças: 2 até 12 anos;
- Adolescentes: 12 até 16 anos.

Com base nessa nova classificação foram testados novos modelos de PLS-DA, utilizando apenas as amostras de pacientes na faixa etária de 2 a 12 anos, faixa etária com o maior número de amostras por grupo, e que apresentou maior igualdade no tamanho amostral por grupo. O número de amostras inicial por grupo foi então reduzido: para o grupo cirúrgico (n=10), clínico (n=12) e controle (n=14). A Figura 7 apresenta o *score plot* (gráfico de escores) dos novos modelos de PLS-DA. Nessa faixa de idade o valor de Q^2 para a comparação CLI x CIR foi de 0,714 e o R^2 de 0,985. Para a comparação CON x CLI o valor de Q^2 foi de 0,849 e o R^2 de 0,998. Na comparação CON x CIR, o Q^2 obtido foi de 0,772 e R^2 de 0,984. Os novos valores obtidos para a faixa etária de 2 a 12 anos foram considerados

satisfatórios para obtenção dos metabólitos discriminadores, uma vez que apresentaram um bom ajuste de modelo e alto valor preditivo.

Os modelos também foram validados por análise de variância (ANOVA) dos resíduos da validação cruzada com valores aceitáveis. Sendo que, para a comparação CLI x CIR, obteve-se um p -valor = 0,01 e $F=4,43$; para a comparação CON x CLI, obteve-se um p -valor = 2×10^{-3} e $F= 4,9$.; e para a comparação CON x CIR, obteve-se um p -valor = 0.006 e $F= 4.5$. A Tabela 1 ilustra a melhora no desempenho dos modelos de PLS-DA após a categorização por idade.

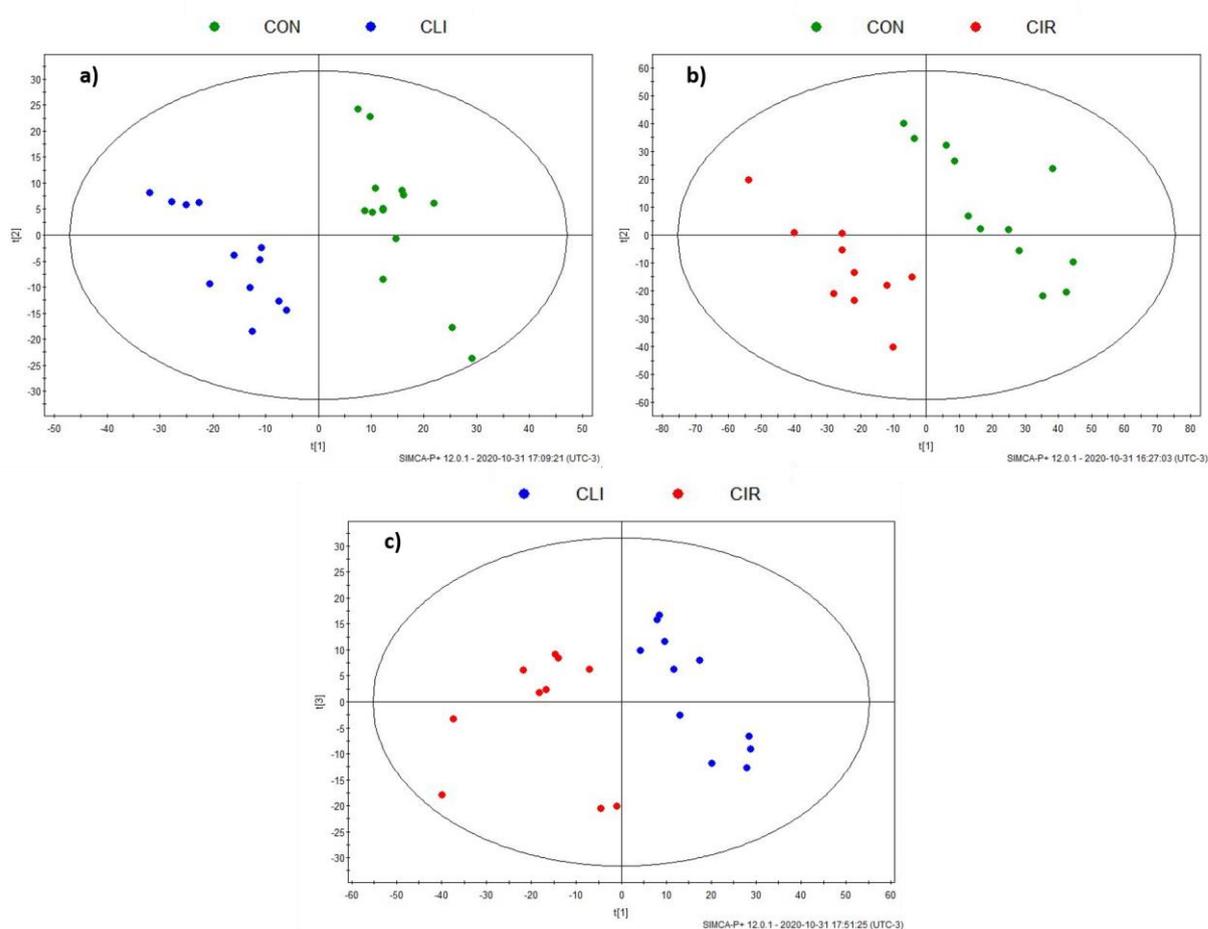


Figura 7: Scores plot dos modelos PLS-DA para amostras de urinas de pacientes com estenose de JUP entre 2-12 anos, analisadas por RPLC-MS. Legenda: a) Comparação Controle (CON) vs Clínico (CLI), b) Comparação Controle (CON) vs Cirúrgico (CIR) e c) Comparação Clínico (CLI) vs Cirúrgico (CIR).

Tabela 1: Comparação dos parâmetros estatísticos obtidos nos modelos PLS-DA, sem e com a classificação por faixa etária.

Faixa etária	CLI_CIR		CON_CLI		CON_CIR	
	0 a 17 anos	2 a 12 anos	0 a 17 anos	2 a 12 anos	0 a 17 anos	2 a 12 anos
Parâmetros						
Q ²	0,32	0,71	0,54	0,85	0,51	0,80
R ²	0,95	0,985	0,96	0,998	0,81	0,996
F	1,43	4,4	1,4	4,9	8,9	4,5
p-valor	0,2	0,01	0,007	0,002	4x10 ⁻⁵	0,006

Um dos métodos estatísticos mais poderosos para confirmar a validade dos dados é o teste de permutação. Esse teste de validação consiste na permutação aleatória das categorias (clínico, controle e cirúrgico) das amostras. O desempenho do modelo obtido, usando como parâmetro o Q², é avaliado e espera-se que, o valor de Q² para o modelo permutado seja menor do que o modelo original. Esse procedimento é repetido N vezes. Se vários modelos aleatoriamente permutados apresentarem o Q² maior que o modelo original, então o original não tem confiabilidade, mesmo com p-valor menor que 0,05 na análise de ANOVA dos resíduos da validação cruzada⁶⁷.

A Figura 8 apresenta o gráfico do teste de permutação para as três comparações. O ponto na extrema direita do gráfico é o Q² do modelo original; podemos observar que para todas as 200 permutações realizadas, nenhuma obteve um Q² maior que o modelo original, reforçando a validade do modelo obtido.

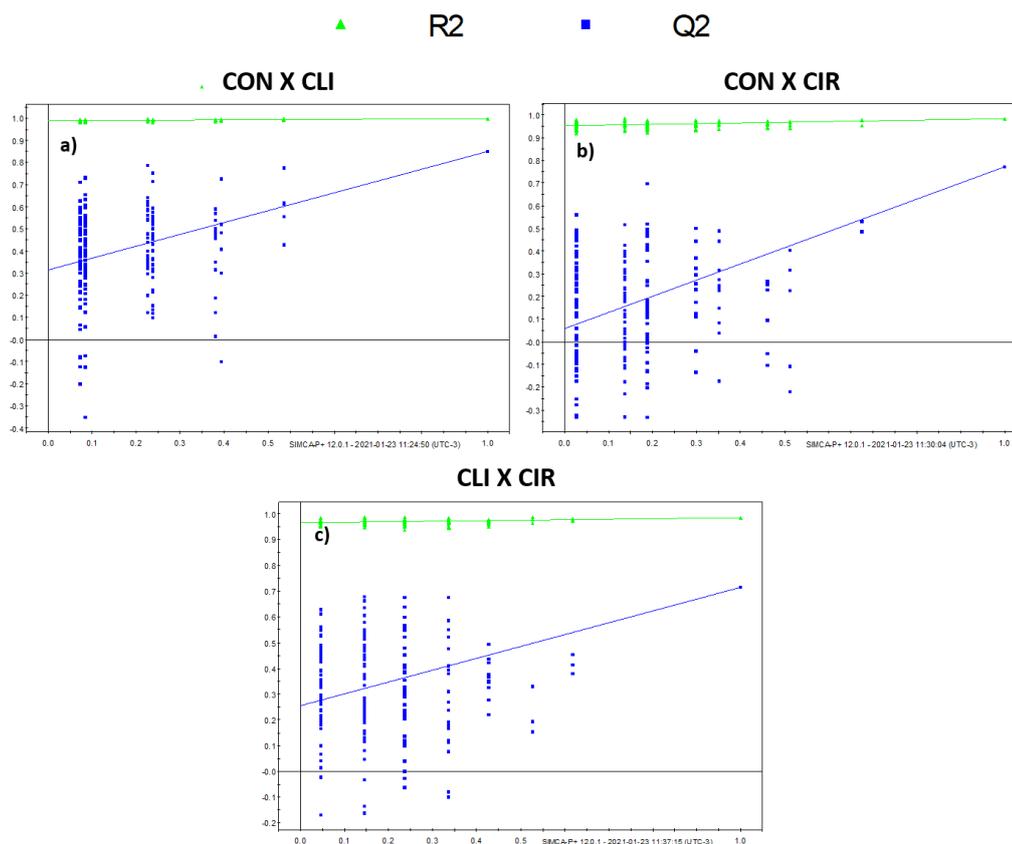


Figura 8: Teste de 200 permutações dos modelos de PLS-DA da análise metabolômica por RPLC-MS.

Outras figuras de méritos, além do Q^2 e R^2 , usadas para avaliar o desempenho de um modelo estatístico são a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e a área sobre a curva ROC (AUC, do inglês *Area under curve*).

A curva ROC é uma das figuras de méritos mais familiares e utilizadas na avaliação de desempenho de um teste de diagnóstico médico⁶⁸, e relaciona a sensibilidade e a especificidade, e como esses parâmetros mudam conforme as pontuações de biomarcadores disponíveis. Essa pontuação representa a probabilidade da sensibilidade e da especificidade calculada e, ao unir esses pontos, temos a curva ROC. No caso da uma análise multivariada a sensibilidade e a especificidade são referentes a um conjunto de metabólitos e não apenas um metabólito específico⁶⁹.

A sensibilidade é a probabilidade de um teste apresentar resultado positivo em um indivíduo doente, e a especificidade é a probabilidade do teste apresentar resultado negativo em um indivíduo saudável. O canto superior esquerdo (0,1), de um gráfico de curva ROC representa um modelo onde todos os indivíduos, controle e teste são corretamente classificados, ou seja, a sensibilidade e (1-especificidade) possuem o melhor valor de corte⁷⁰.

A AUC é utilizada para examinar a qualidade da curva ROC e o desempenho do teste; essa área varia de 0 a 1, e quanto mais se aproxima de 1 (100 %) mais próximo do ponto (0,1) e, conseqüentemente, maior é o poder do teste em discriminar os grupos teste e controle⁷⁰.

Os metabólitos significativos encontrados pelos modelos de PLS-DA foram avaliados como possíveis candidatos a biomarcadores pelo uso de curvas ROC. Utilizando a plataforma disponível no *MetaboAnalyst*, foi plotada a curva ROC para os *molecular features* apontados como significativos ($VIP > 1$) pelo modelo PLS-DA e identificados de forma putativa. Foi utilizado o modelo de classificação PLS-DA e o método para posição hierárquica dos *features* (*ranking feature*) foi o PLS-DA *built-in*. A Figura 9 apresenta o gráfico da curva ROC de cada comparação pertinente.

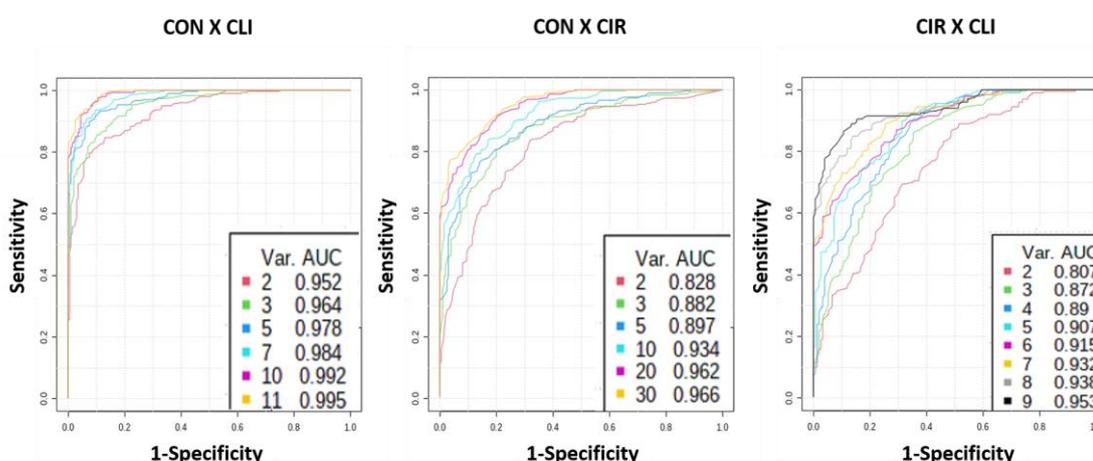


Figura 9: Comparação de diferentes modelos baseados nas curvas ROC. Para a comparação CON X CLI e CON X CIR foram gerados 6 modelos, e para a comparação CIR X CLI, 8 modelos do conjunto de *molecular features* foram gerados. Todos os modelos foram criados utilizando o PLS-DA *built-in*. A legenda mostra o número do *molecular feature* e a AUCs de cada modelo.

Para a comparação Controle x Clínico utilizaram-se 6 modelos multivariados de 2 até 11 variáveis (total de variáveis significativas no modelo multivariada para as análises de LC-MS) e, em todos os conjuntos de variáveis, a AUC foi maior que 0,95. Para o modelo com todas as variáveis a acurácia foi de 99,5%.

Na comparação Controle x Cirúrgico todos os 30 *molecular features* apresentaram uma acurácia de 96,6%, enquanto na comparação Clínico x Cirúrgico os 9 *molecular features* apresentaram uma acurácia de 95,3%. Os bons resultados de AUC para as comparações utilizando os *molecular features* significativos encontrados no modelo PLS-DA fortalecem o modelo, dando mais credibilidade aos *molecular features*, pois demonstram ótimo performance em discriminar os grupos teste e controle^{71,72}.

4.1.2 – Abordagem univariada RPLC-MS

Embora o modelo multivariado apresente a vantagem de respeitar a variabilidade e a complexidade intrínseca de amostras de natureza biológica, ajudando a elucidar relações complexas, lineares ou não lineares⁷³, os riscos de *overfitting* (inclusão de mais variáveis que o necessário, ou seja, utilizar mais parâmetros do que pode ser justificado pelo conjunto de dados)⁷⁴ são comuns.

A abordagem univariada utiliza métodos estatísticos tradicionais que consideram uma variável por vez, sua vantagem em relação à multivariada é a eliminação de *overfitting*.

Tendo em mente as vantagens e desvantagens de cada modelo, um não exclui o outro, e, devem, sempre que possível, serem combinados para obter o maior número de informações necessárias⁷⁵.

Para as variáveis paramétricas cujo teste de normalidade foi o Shapiro-Wilk, foi aplicado o teste Bartlett, para distinguir as variâncias iguais e diferentes. Em seguida foi avaliado o p-valor da ANOVA, usado para avaliar diferença entre três ou mais grupos, para encontrar possíveis candidatos a biomarcadores e verificar efeito significativo entre as

variáveis. Quando encontrado efeito significativo entre as variáveis, utilizou-se o teste *post-hoc* de Tukey para localizar entre qual grupo foi encontrada a diferença. Os testes *post-hoc* são utilizados para corrigir o aumento excessivo do erro tipo I, ou seja, concluir que existe diferenças entre os grupos quando na verdade não existe. O teste de Tukey utiliza o valor do p-valor ajustado (também conhecido como q-valor) para determinar se as diferenças entre os grupos são significativamente estatísticas⁷⁶.

O teste Kruskal-Wallis foi aplicado para as variáveis não-paramétricas, para encontrar possíveis candidatos a biomarcadores e utilizado o teste *post-hoc* de Dunn⁷⁷.

O fluxograma para a avaliação das variáveis por análise univariada está ilustrado na Figura 10.

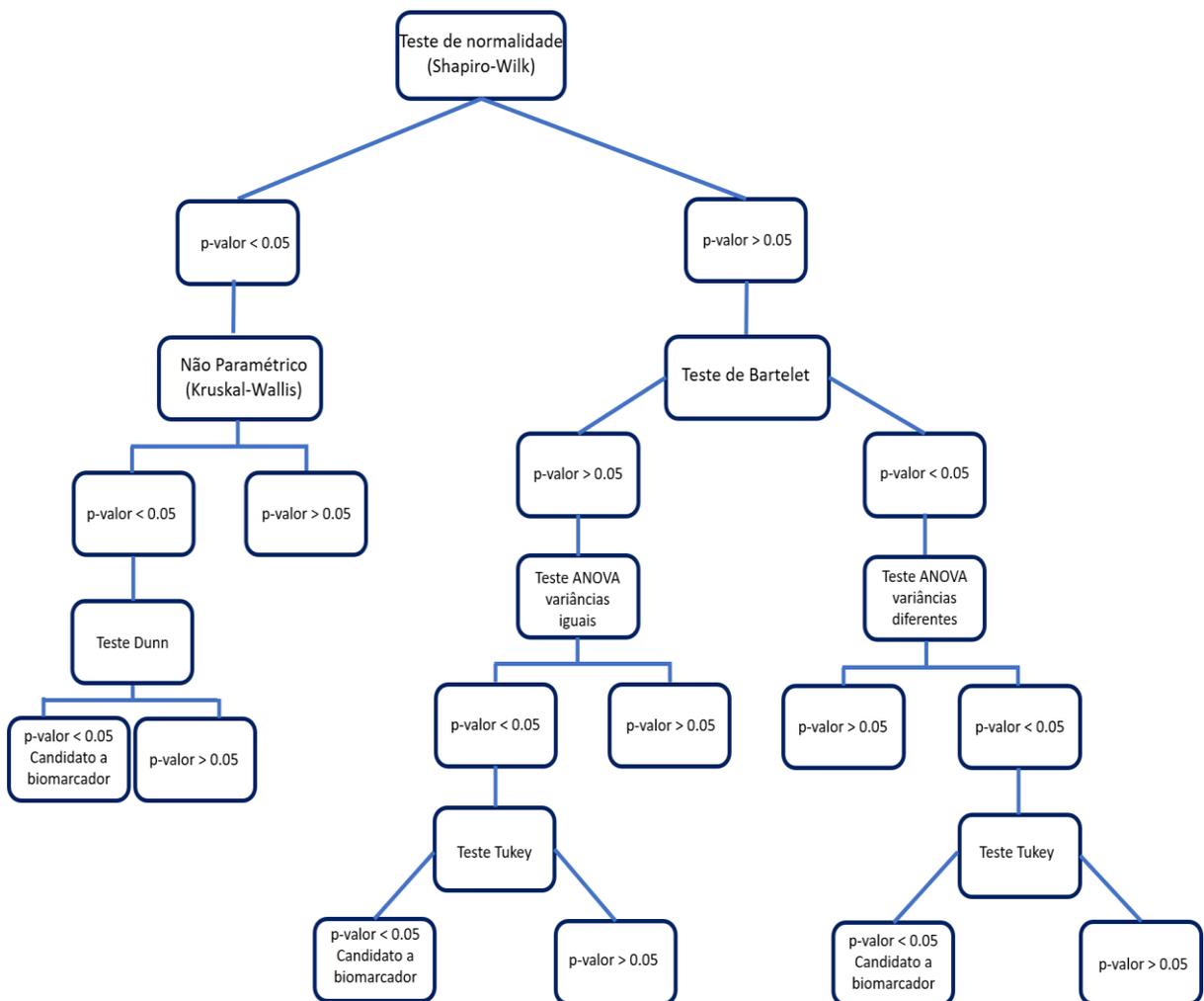


Figura 10: Fluxograma da tomada de decisões para a análise univariada.

Para o modelo univariado foi analisado a curva ROC para cada *molecular feature* significativo. Os resultados de p-valor e AUC da curva ROC estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros p-valores e AUC para curva ROC dos *molecular features* encontrados com significância estatística utilizando a abordagem univariada, para análise em RPLC-MS.

Comparação Controle x Cirúrgico			Comparação Clínico x Cirúrgico			Comparação Controle x Clínico		
<i>Massa exata</i>	p-valor (ROC)	AUC (Univariada)	<i>Massa exata</i>	p-valor (ROC)	AUC (Univariada)	<i>Massa Exata</i>	p-valor (ROC)	AUC (Univariada)
153,0540	0,02	0,807	158,0439	0,01	0,775	165,0158	0,02	0,768
173,0919	0,02	0,834	176,0707	0,02	0,770	173,0919	0,02	0,755
176,0707	0,004	0,872	198,0524	0,02	0,794	261,1091	0,01	0,799
198,0524	0,002	0,882	235,1659	0,02	0,712	263,0417	0,02	0,783
221,0406	0,02	0,813	235,1659	0,02	0,712	276,1452	0,03	0,740
229,1196	0,02	0,749	263,0417	0,02	0,760	303,1351	0,05	0,706
261,1091	0,001	0,877	390,0621	0,02	0,612	305,0880	0,02	0,536
276,1183	0,01	0,791	176,0708	0,02	0,770	321,0825	0,03	0,703
303,1351	0,003	0,866				327,0704	0,01	0,743
341,1505	0,001	0,845				332,0979	0,03	0,749
						336,1400	0,01	0,786
						384,1505	0,01	0,796
						192,0743	0,03	0,749

O *molecular feature* 305,0880, encontrado na comparação CON x CLI, foi o único que apresentou valor abaixo de 0,6 para AUC, e por isso não foi utilizado para a etapa de identificação.

4.1.3 – Identificação dos *molecular features*

Os bons resultados estatísticos para a faixa etária selecionada, permitiu, na análise multivariada, a extração dos VIPs para os modelos de PLS-DA. As relações *m/z* com VIP maior que 1, e que apresentaram uma porcentagem de variação (*change*, definição abaixo) superior a 30 %, em pelo menos uma das comparações, foram levadas para busca em banco de dados (HMDB, METlin, KEGG). Na análise univariada todos os *molecular features* que passaram em todos os testes apresentados no fluxograma (Figura 10) também foram levados ao banco de dados. Todos os *molecular features* com significância estatística encontrados nas duas abordagens estatísticas foram identificados e listados nas Tabelas 7, 8 e 9, no final desse capítulo.

Devido à natureza putativa da identificação é possível encontrar mais de uma possibilidade de metabólito para um mesmo *molecular feature*.

Para buscar os possíveis metabólitos nos banco de dados, os adutos $[M+H]^+$, $[M+2H]^{++}$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ foram considerados e o erro de massa máximo permitido na busca foi de 10 ppm. Foram aceitos metabólitos que apresentassem estrutura química compatível com a técnica, endógenos e que apresentassem alguma correlação com rotas metabólicas presentes em mamíferos.

Para quantificar a porcentagem de alteração em relação ao grupo controle foi utilizado o *change*, calculado conforme fórmula 1; para comparação entre os grupos clínico e cirúrgico, o grupo clínico foi usado como referência (ou controle).

Fórmula 1.

$$\text{Change (\%)} = \left(\frac{\text{Grupo Teste} - \text{Grupo controle}}{\text{Grupo Controle}} \right) * 100$$

4.2 – Análise metabolômica por GC-MS

4.2.1 – Tratamento com Urease

Amostra de urina normalmente contém uma alta concentração de ureia, e, portanto, os cromatogramas de GC-MS, sem um tratamento prévio para a remoção de ureia, apresentam um sinal largo e com alta intensidade correspondente à ureia, sobrepondo e prejudicando a obtenção de informações nessa região. Portanto, uma etapa de remoção de ureia na amostra de urina é indispensável. A retirada da ureia pode ser feita utilizando a enzima urease, que provoca a degradação da ureia em amônia e bicarbonato¹⁰.

A Figura 11 ilustra um cromatograma de íons totais (TIC) de uma mesma amostra de urina derivatizada, sem e com um tratamento para a remoção de ureia. O sinal entre 9,0 e 9,5 min é referente à ureia, evidenciando um sinal largo, de alta intensidade, o qual provoca uma elevação da altura da linha de base do cromatograma, que se inicia em aproximadamente 7.9 min e se estende até aproximadamente 9,6 min.

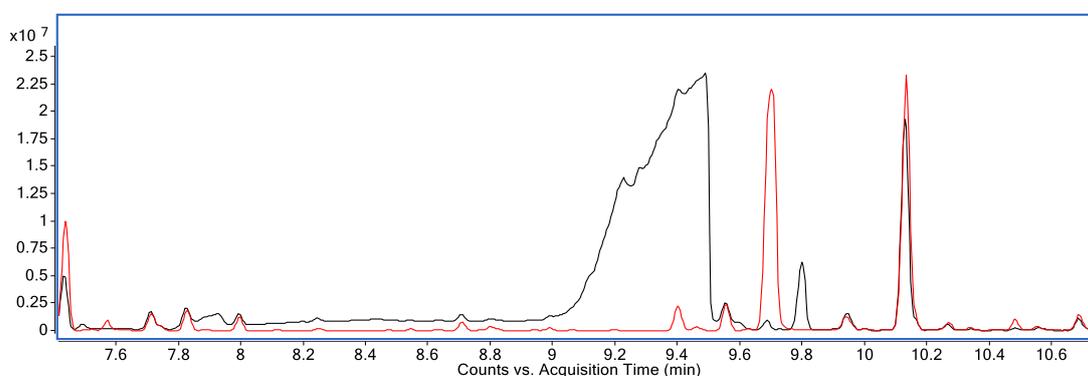


Figura 11: Cromatograma das amostras com tratamento de urease (vermelho) e sem tratamento (preto).

Apesar da remoção da ureia produzir benefícios para a identificação de metabólitos, foi observado o surgimento de um sinal, também de alta intensidade (9,7 min), que, embora, não seja tão largo quanto o da ureia, também prejudica a análise. Esse sinal foi identificado, por meio de comparação com espectro de massas com um banco de dados, como o sinal do fosfato em 9,7 min (Figura 12), que está presente na urease utilizada. Isso foi verificado analisando um branco (água), com e sem tratamento com urease (Figura 13). Tal sinal intenso do fosfato atrapalha o registro fiel dos cromatogramas, pois, por estar com alta intensidade, o equipamento desliga seu detector automaticamente para preservar o filamento, responsável pelo ganho de sinal do equipamento; após um pequeno intervalo de tempo o detector volta a ligar. Durante esse intervalo que o detector permanece desligado ocorre perda de sinal, que pode ser importante para encontrar metabólitos discriminantes durante a análise. Além disso, o sistema de detecção, quando muitas amostras são analisadas, pode causar um constante liga e desliga, prejudicando assim a integridade do sistema.

Portanto, é fundamental a otimização da análise para que o benefício da remoção da ureia não seja minimizado pelo aparecimento de outro sinal.

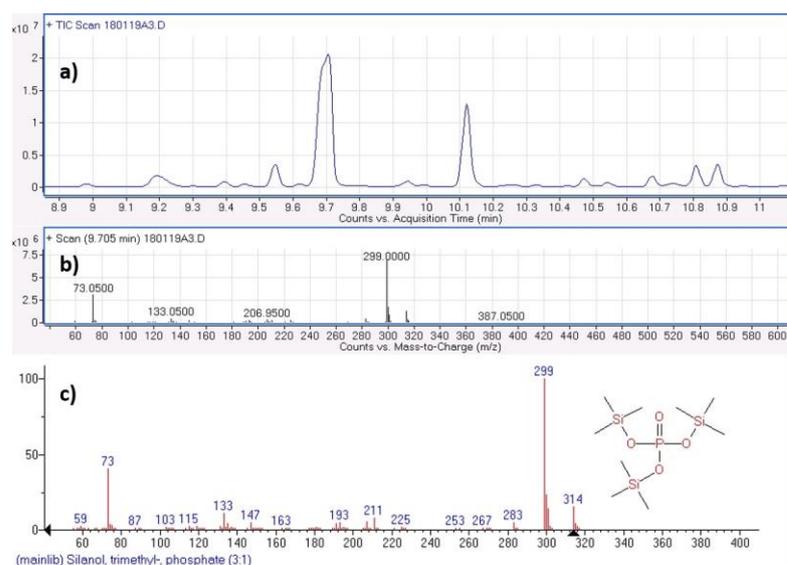


Figura 12: Análise de urina por GC-MS. Legenda: a) TIC de uma amostra de urina com tratamento de Urease, b) Espectro de massas do pico em 9.7 min e c) Resultado da comparação de espectro realizando a biblioteca NIST.

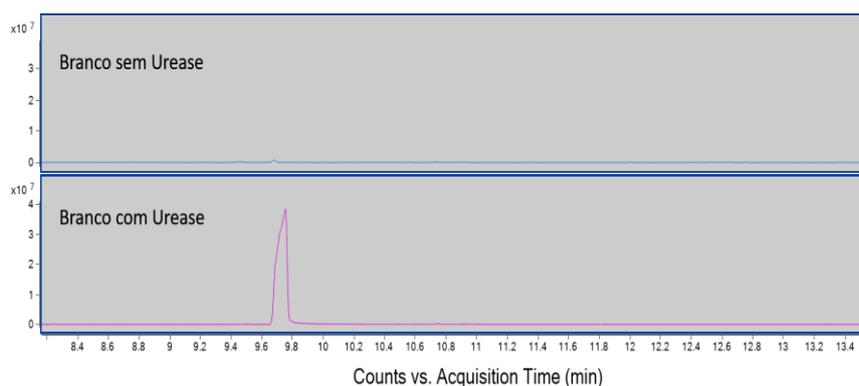


Figura 13: Cromatograma de Ions Totais (TIC) do branco sem o tratamento com urease e do branco com tratamento de urease.

Na tentativa de impedir o desligamento automático do detector foi realizado um experimento com diferentes concentrações de urease, com o objetivo de encontrar uma concentração mínima, na qual a intensidade do sinal do fosfato não saturasse o detector e a ureia fosse completamente degradada.

Para avaliar a possibilidade de diminuir a concentração já otimizada pelo grupo (10 mg/mL)¹⁰, e com o objetivo de impedir o desligamento por saturação do detector, foi realizado um experimento com concentrações baixas de urease 0,25, 0.5 e 1 mg/mL, em triplicata. Foi observado que mesmo diluindo 10 vezes a concentração inicialmente testada há pouca redução do sinal do fosfato, e essa redução não foi o suficiente para impedir que o detector fosse forçado a desligar. A Figura 14 apresenta o TIC da região onde o fosfato e a ureia aparecem nas análises, entre 8,8 e 10,6 min. É possível observar que mesmo na menor concentração testada (0,25 mg/mL) o sinal do fosfato satura o detector e a ureia aparece com uma intensidade muito grande. Pelo fato de ocorrer apenas uma tímida redução do sinal do fosfato, mesmo em baixas concentrações, optou-se por empregar a máxima concentração de urease (10 mg/mL), para garantir remoção total da ureia. Além disso, optou-se pela programação prévia do desligamento do detector na região do sinal do fosfato. Esse procedimento preserva o filamento do detector, uma vez que ele não desliga durante a

aquisição devido à saturação do sinal de fosfato. Esse controle de desligamento garante a robustez das análises.

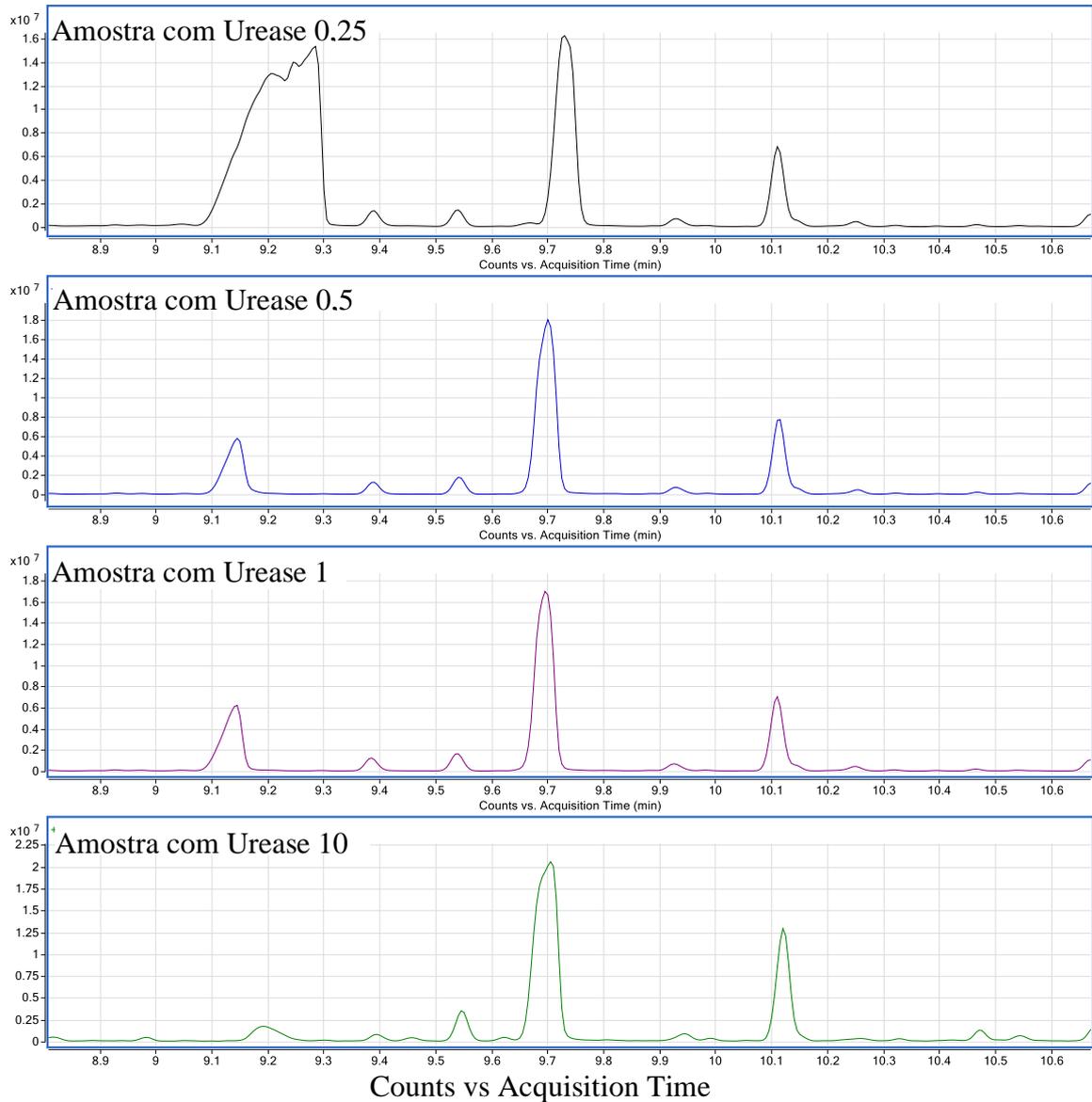


Figura 14: TIC de uma mesma amostra de urina tratadas com diferentes concentrações de urease.

A Figura 15 apresenta um cromatograma da amostra de urina tratada com urease, programando-se o método para desligar o detector entre 9.6 e 9.8 min.

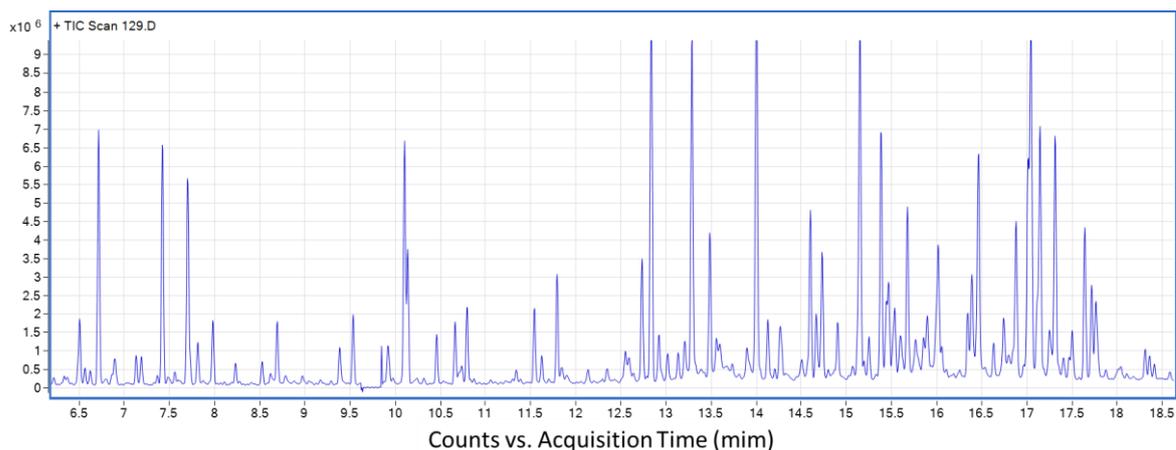


Figura 15: Cromatograma com amostra de urina tratada com urease, programando-se o método para desligar o detector entre 9.6 e 9.8 min.

4.2.2 – Otimização das condições de derivatização

Compostos que contém em seus grupos funcionais hidrogênio com tendência a formar ligações de hidrogênio intermoleculares, por exemplo, -SH, O-H, -NH e -COOH, tem sua volatilidade afetada, sua estabilidade térmica comprometida e tendem a interagir com os materiais que compõem a coluna cromatográfica⁷⁸. Para que tais compostos sejam passíveis de análise por GC, é necessário modificar os grupos funcionais. Além disso, compostos de massa molecular elevada e com grupos polifuncionais são inviáveis para uma análise direta em GC, pois normalmente tais compostos são bastante polares e reduzem sua volatilidade tornando o tempo de retenção muito longo³¹.

O objetivo da derivatização é transformar um determinado composto químico de maneira que o novo composto apresente propriedades que favorecem a análise. Em GC essa derivatização normalmente é feita para tornar os compostos químicos mais voláteis e termicamente estáveis. Dessa forma a derivatização aumenta a volatilidade dos compostos de interesse. Além disso, impedem a absorção dos analitos no sistema de GC⁷⁹.

Um bom exemplo da necessidade e aplicação da derivatização é a análise de ácidos carboxílicos. Por apresentarem elevada polaridade e serem solúveis em água o resultado de

análise, principalmente em baixas concentrações, não é satisfatório. Entretanto, podemos diminuir a polaridade e, conseqüentemente, aumentar sua volatilidade, se convertermos os ácidos em ésteres metílicos, transformando o grupo OH da carbonila em OCH₃⁸⁰.

Em metabolômica, a derivatização de GC-MS comumente é feita em duas etapas, metoximação (ou oximação) e sililação²⁷.

A metoximação protege os grupos funcionais cetona e aldeídos do tautomerismo ceto-enólico, aumentando a estabilidade das moléculas que possuem tais grupos, e evitando a ciclização. Além disso, inibe a formação de anéis de açúcares redutores e protege as moléculas de descarboxilação⁸¹.

A sililação aumenta a volatilidade do composto, substituindo o hidrogênio ácido em compostos polares pelo grupo trimetilsilil (TMS) [-Si(CH₃)₃] ^{31,27}. A sililação transforma várias funções químicas polares e pouco favoráveis à cromatografia gasosa como álcoois, ácidos carboxílicos, aminas, fenóis, carboidratos, esteroides, entre outras. Porém, utilizar a sililação como etapa única, não garante a derivatização de todos os metabólitos, pois muitos apresentam grupos funcionais que sofrem tautomerismo, como cetonas e aldeídos. Por isso a necessidade de uma etapa de metoximação antes da sililação. As Figuras 16 e 17 ilustram as reações de metoximação e sililação para aldeídos e cetonas.

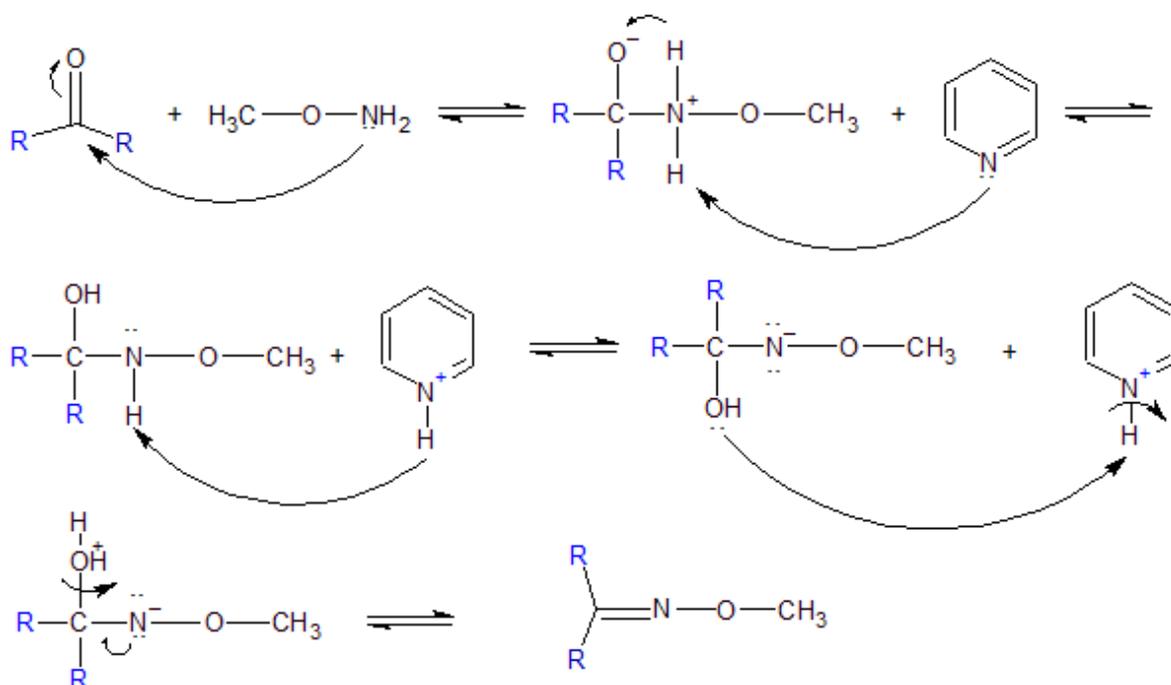


Figura 16: Exemplificação do mecanismo de reação de metoximação.

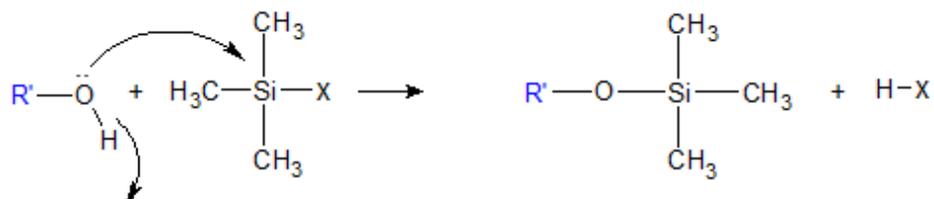


Figura 17: Exemplificação do mecanismo de reação de silição.

Existem vários estudos sobre a derivatização dos metabólitos para CG-MS, entretanto, muitos divergem com relação às condições (tempo de reação, temperatura, concentração e volume de reagentes). Até o momento, no grupo, foram testados dois procedimentos para preparo de amostra, que visaram otimizar o número de metabólitos identificados por GC-MS ^{10,27}, buscando a melhor qualidade e repetibilidade nos cromatogramas. Entretanto, como há diferença nas matrizes das amostras e de equipamentos utilizados, é necessário realizar um estudo para ter a certeza de qual preparo de amostra é o mais indicado.

Para encontrar uma condição ótima de preparo de amostras, um experimento baseado no planejamento fatorial foi aplicado ao estudo. Esse tipo de experimento é interessante pois ajuda a determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse. Nesse caso foram estudados os efeitos da temperatura, tanto da sililação quanto da metoximação, em 2 níveis (valores máximos e mínimos encontrados na literatura) e os efeitos do tempo de reação, para as duas etapas, também em dois níveis. A escolha dos níveis foi baseada nos trabalhos realizados pelo grupo e nos protocolos de derivatização de outros artigos^{10,27,82,83}.

As condições de derivatização estão listadas na **Tabela 3** abaixo.

Tabela 3: Condições de tempo e temperatura para as duas etapas de derivatização experimentais.

Condição	Tempo de metoximação (h)	Temperatura de metoximação (°C)	Tempo de sililação (h)	Temperatura de sililação (°C)
1	2	25	0,5	40
2	2	25	1	70
3	2	25	0,5	40
4	2	25	1	70
5	16	25	0,5	40
6	16	25	1	70
7	16	25	0,5	40
8	16	25	1	70
9	2	40	0,5	40
10	2	40	1	70
11	2	40	0,5	40
12	12	40	1	70
13	16	40	0,5	40
14	16	40	1	70
15	16	40	0,5	40
16	16	40	1	70

As condições nas quais a temperatura e tempo de metoximação estão no nível máximo (13, 14, 15 e 16) foram descartadas, pois um prolongado tempo de metoximação, no qual as amostras estão submetidas ao banho-maria, aumenta sua exposição à água, e, portanto, tais condições oferecem um risco maior de contaminação de água na amostra. A presença de água

torna a próxima etapa ineficiente, pois a água também reage, por hidrólise, com o reagente de silição utilizado na segunda etapa da derivatização⁸⁴.

Uma das maneiras de avaliar o planejamento fatorial é buscar o maior número de compostos identificados com alto grau de confiança. O software de identificação utilizado foi o MS-DIAL, que para cada comparação do espectro da biblioteca com o experimentalmente obtido, atribui uma nota (*score*) de 0 – 100, e quanto maior essa nota, maior é a similaridade, e, portanto, maior confiança na identificação. Nesse experimento apenas os metabólitos identificados com coeficiente de variação (CV) menor que 30 e *scores* > 80, Tabela 4, foram utilizados.

Tabela 4: Número de compostos identificados com *scores* >80 e CV <30% para as condições de diferentes condições de derivatização.

Condição	Número de compostos identificados com <i>scores</i> >80 e CV <30%
1	35
2	46
3	47
4	42
5	59
6	48
7	43
8	55
9	54
10	48
11	44
12	45

As condições 5, 8 e 9 apresentaram os maiores números de metabólitos identificados. Entretanto, nenhuma das três condições aparentou vantagem sobre a outra, pois a diferença no número de compostos identificados é irrisória, e, portanto, não oferecerem informação suficiente para decidir qual a melhor condição. Uma segunda análise foi usada como parâmetro de decisão, e foi escolhida a média da intensidade dos metabólitos identificados; tal

parâmetro tem como objetivo analisar as condições em termos quantitativos, diferente da primeira análise, no qual o desempenho qualitativo foi avaliado.

Para escolher os metabólitos a serem avaliados usando a média das intensidades, optou-se em escolher metabólitos que representassem, da melhor forma possível, as classes de metabólitos encontrados nas análises de GC. A cobertura analítica para os metabólitos em GC abrange as classes de aminoácidos, ácidos carboxílicos, açúcares, ácidos graxos, esteroides e açúcares fosfatados. A Figura 18 apresenta um cromatograma de uma amostra de QC utilizada no estudo e o intervalo de tempo para a maioria dos metabólitos de cada classe.

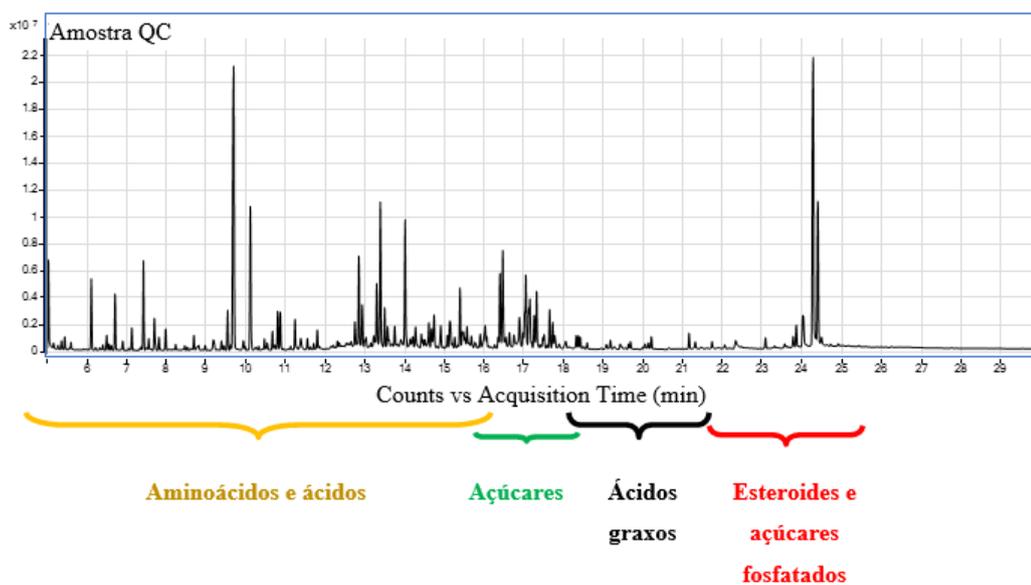


Figura 18: Cromatograma ilustrando os intervalos de tempo para cada classe de metabólito analisado em GC-MS.

Para cobrir toda a corrida cromatográfica, quatro classes, de regiões distintas do cromatograma, foram selecionadas, e para cada classe, três metabólitos identificados com $CV < 30\%$, para comparação da intensidade do sinal analítico fornecido pela análise em cromatografia gasosa. A Tabela 5 apresenta os metabólitos escolhidos.

Tabela 5: Metabólitos selecionados para a avaliação de intensidade nas condições com mais metabólitos identificados (5, 8 e 9) do estudo fatorial de otimização das condições de derivatização da urina.

Classe	Metabólitos identificados com scores >80 e CV<30%
Aminoácidos	Glicina
	Fenilalanina
	Ácido Glutâmico
Ácidos graxos	Ácido esteárico
	Ácido Palmítico
	Ácido adípico
Açúcares	Pentose
	Hexose
	Pentose
Ácidos carboxílicos	Ácido cítrico
	ácido-2-hidroxi-butírico
	Ácido succínico

A especificação de açúcares ainda é um desafio, pois o padrão de fragmentação de açúcares similares é muito semelhante, e por isso as bibliotecas fornecem mais de uma identificação de açúcar possível. Entretanto existe a possibilidade de diferenciar entre pentoses e hexoses, pois os fragmentos que essas estruturas apresentam são específicos, tornando possível diferenciar um açúcar de 5 ou 6 carbonos. As pentoses apresentam um fragmento característico com m/z 217 e as hexoses possuem o fragmento de m/z 204⁸⁰. Avaliar a ordem de retenção dos açúcares experimentalmente obtidos com a biblioteca Fiehn pode ajudar na distinção entre os açúcares, porém alguns açúcares possuem um tempo de retenção muito próximo, não sendo uma forma confiável de identificação. Em um estudo de metabolômica alvo é possível identificar os açúcares, utilizando padrão de referência e otimizando as condições analíticas, para aumentar a resolução entre os picos dos açúcares. Devido as características não direcionada do estudo, o presente trabalho classifica os açúcares como pentose e hexose, sem especificar qual.

O gráfico da média das intensidades, Figura 19, revela que, exceto para a fenilalanina, a média das intensidades foram maiores para a condição 8. E, portanto, foi a condição de preparo de amostra utilizada para dar prosseguimento ao estudo.

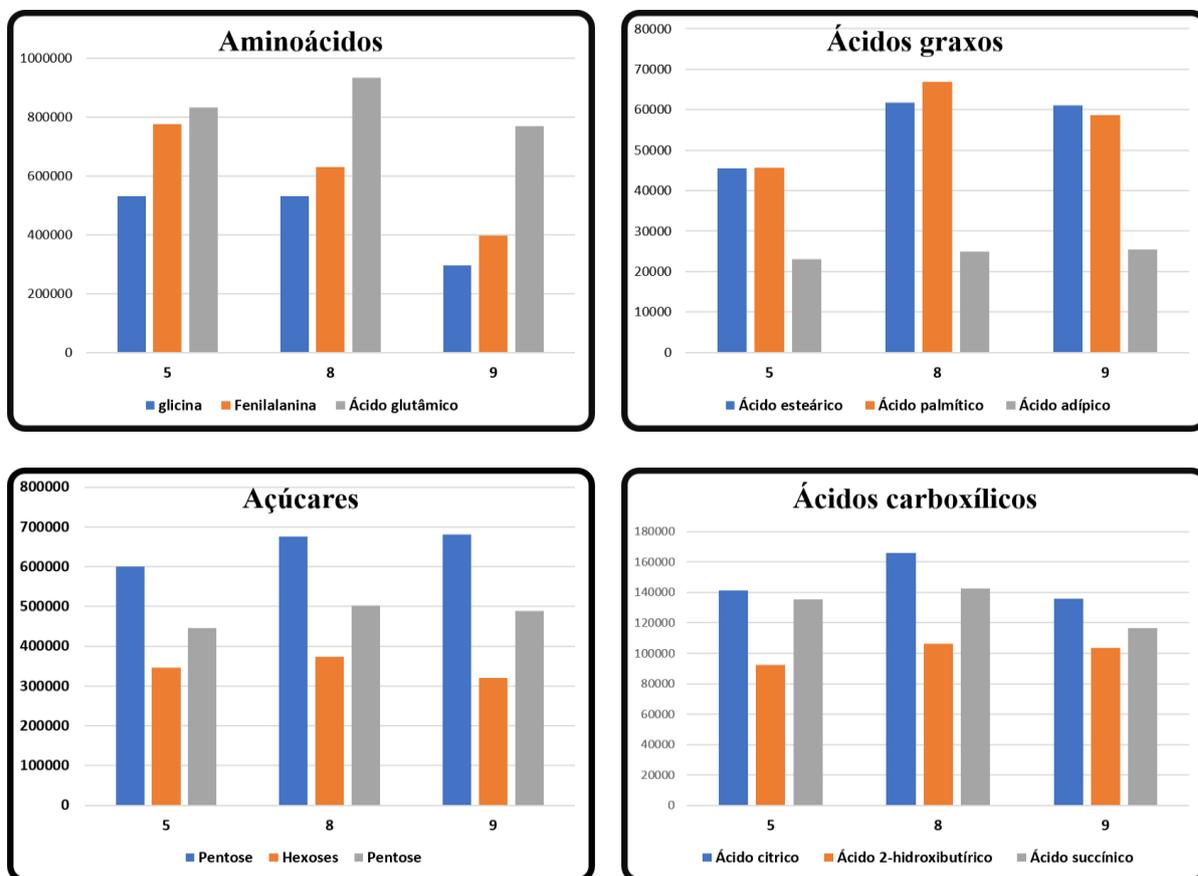


Figura 19: Gráfico da média das intensidades para os três metabólitos selecionados para as quatro classes estudadas: açúcares, ácidos carboxílicos, aminoácidos e ácidos graxos.

O fluxograma abaixo ilustra as etapas de preparo de amostra e as condições estabelecidas para análise de GC-MS.

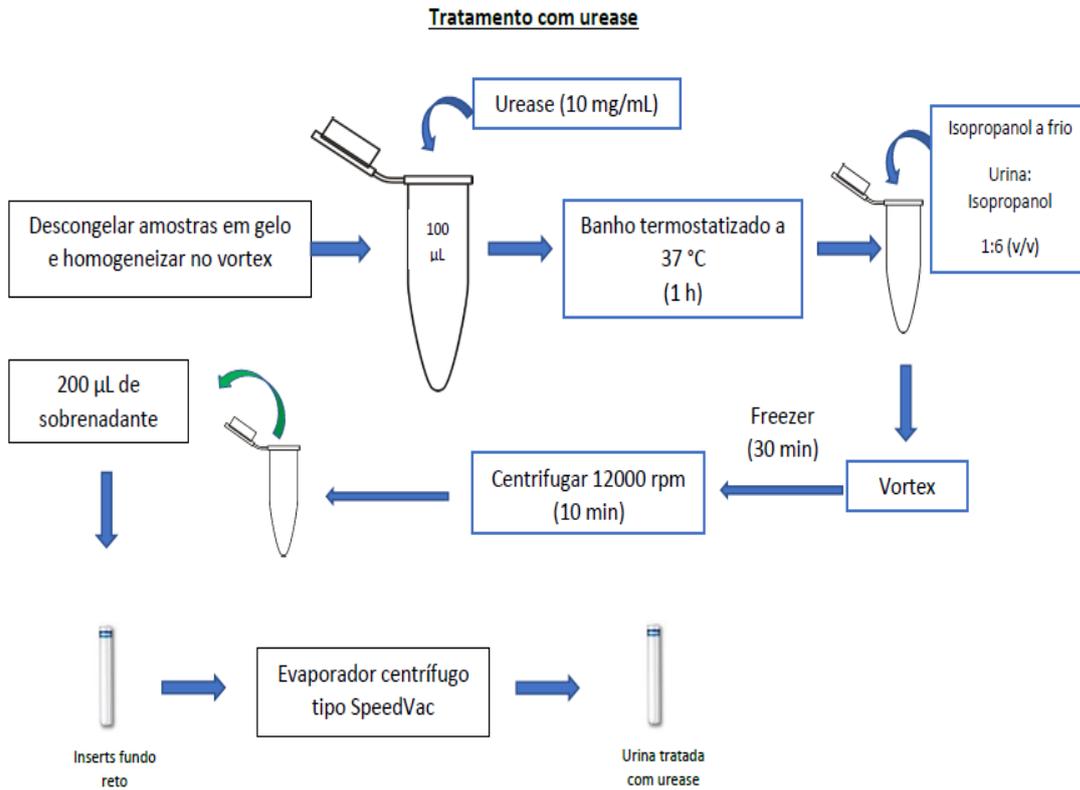


Figura 20: Fluxograma para preparo de amostra: etapa de remoção da ureia.

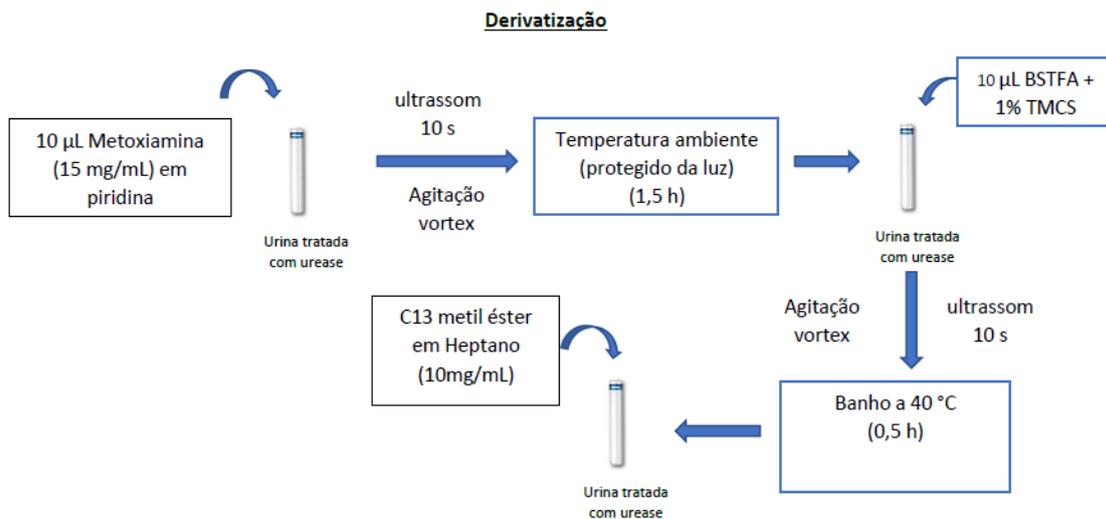


Figura 21: Fluxograma para preparo de amostra: etapa de derivatização.

4.2.3 – Abordagem multivariada GC-MS

Os resultados anteriores de RPLC-MS revelaram a necessidade de restringir a análise das amostras por idade, e, portanto, apenas as amostras na faixa etária indicada foram analisadas. As análises em GC-MS foram realizadas nas condições otimizadas de derivatização citadas anteriormente.

Os *molecular features* que apresentaram CV maior do que 30 % nas amostras QC foram removidos e a tabela obtida pelo XCMS para os dados de GC-MS apresentou, após subtrair o branco, 1612 *molecular features*.

Os dados foram normalizados pela mediana, escalonados pela Unidade de Variância (UV) e foi utilizado uma transformação logarítmica, mesmos procedimentos realizados para as amostras analisadas por RPLC-MS.

A avaliação do padrão interno ajudou a observar possíveis erros de injeção e falha instrumental; o cromatograma do íon extraído do padrão interno éster metílico de ácido tridecanoico (C13 metil tridecanoato) foi plotado para todas as análises. Na Figura 22 é possível observar que as áreas e o tempo de retenção apresentaram repetibilidade em todas as análises, tendo a área do pico, um CV de 6 %.

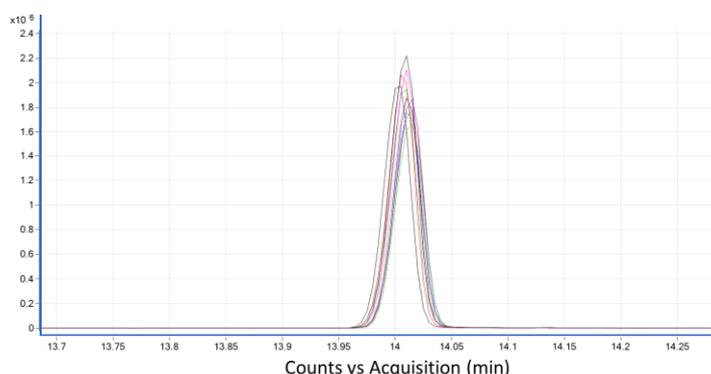


Figura 22: Cromatograma do íon extraído do padrão C13 metil tridecanoato de todas as amostras de urina analisadas em GC-MS.

Novamente, os QCs foram verificados por meio de um modelo de PCA, e a formação de *cluster* das amostras de QC (Figura 23) permitiu a continuidade da análise estatística multivariada. As amostras de controle de qualidade foram feitas a partir da mistura das amostras analisadas, totalizando 8 amostras, sendo que, uma amostra foi analisada no começo da corrida, 6 foram analisadas durante a corrida analítica e 1 no final.

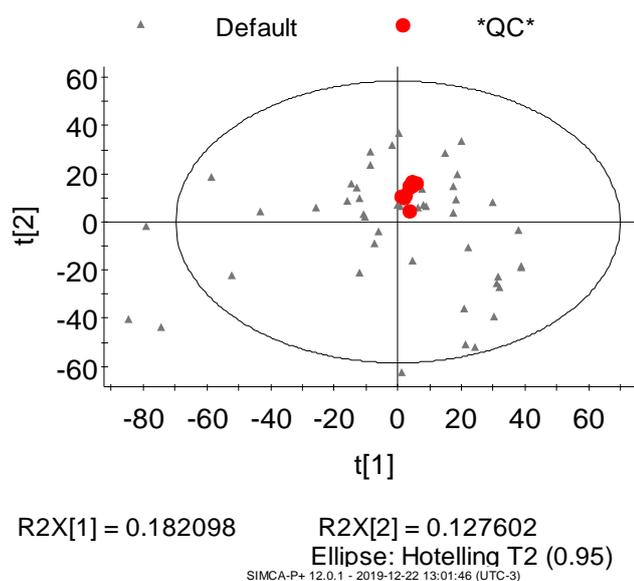


Figura 23: *Score Plot* do modelo de PCA com todas as amostras analisadas por GC-MS. As amostras QC estão destacadas em vermelho. $R^2=0,670$, $Q^2=0,237$.

Após a verificação da estabilidade instrumental, por meio dos QCs, foi plotado o PCA de todas as amostras. O resultado, assim como em RPLC-MS, não se mostrou eficiente em separar os três grupos presentes na matriz (Figura 24).

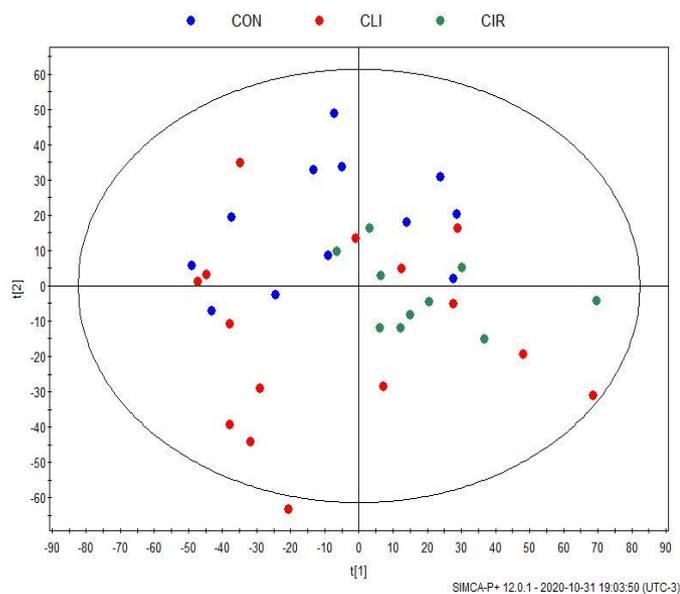


Figura 24: *Score Plot* do modelo de PCA com todas as amostras analisadas por GC-MS. $R^2=0,645$, $Q^2=0,247$.

Os cromatogramas foram visualizados, calibrados, deconvoluídos e identificados no software MS-DIAL.

A calibração tem como objetivo corrigir o tempo de retenção, em relação a biblioteca Fiehn, e para isso foi analisado, no início da corrida analítica, um padrão comercial de uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos, FAME MIX (*Fatty acid methyl esters*), que variam de C8-C22. A deconvolução é feita por meio de algoritmos computacionais e tem como propósito reconstruir um espectro de massa puro para cada componente que o espectrômetro de massa registra, ou seja, no espectro de cromatogramas de íons totais (TIC) são separados os componentes coeluídos (Figura 25) ⁸⁵.

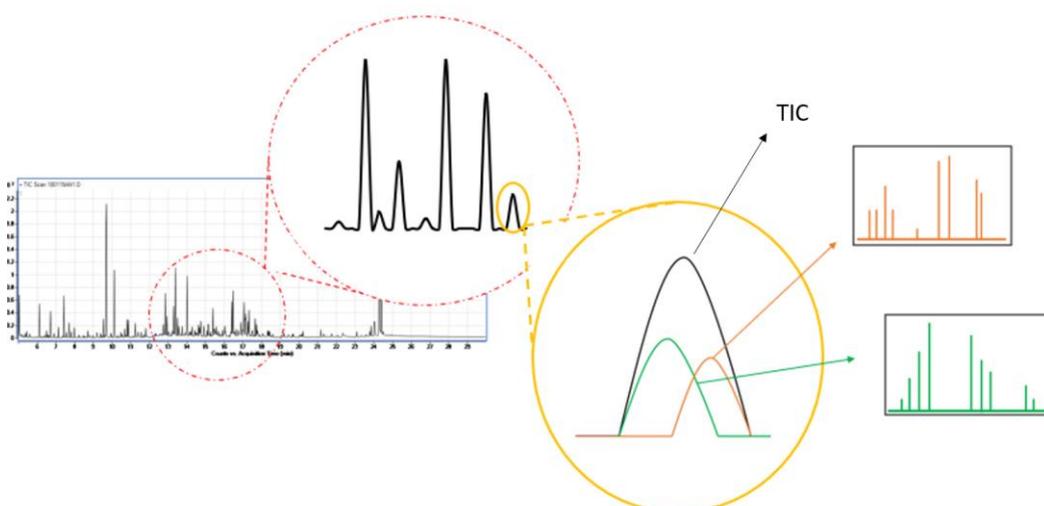


Figura 25: Representação da deconvolução de 2 espectros (verde e laranja) a partir de um cromatograma de íons totais (TIC, em preto).

A tabela gerada pelo XCMS foi utilizada para a estatística multivariada. A análise multivariada, pelo modelo de PLS-DA, gerou bons resultados para a separação CLI x CIR, com p -valor = 0,03, $Q^2 = 0,759$, $R^2=0,996$ e $F= 3$. A comparação CON x CIR gerou um p -valor = 0,0001, $Q^2=0,743$, $R^2= 0,91$, e $F = 11,4$.

O software não gerou o gráfico da comparação CON x CLI, indicando que não foi possível atribuir uma separação plausível entre os grupos. Isso corrobora para a abordagem de complementariedade de técnicas nos estudos com abordagem metabolômica, pois nas análises de LC-MS, a comparação CON x CLI foi encontrada.

A validação do modelo, através do teste de permutação, mostrou que os modelos permutados possuem Q^2 menor que o modelo original, portanto, a confiabilidade do modelo permite a extração das variáveis responsáveis pela separação.

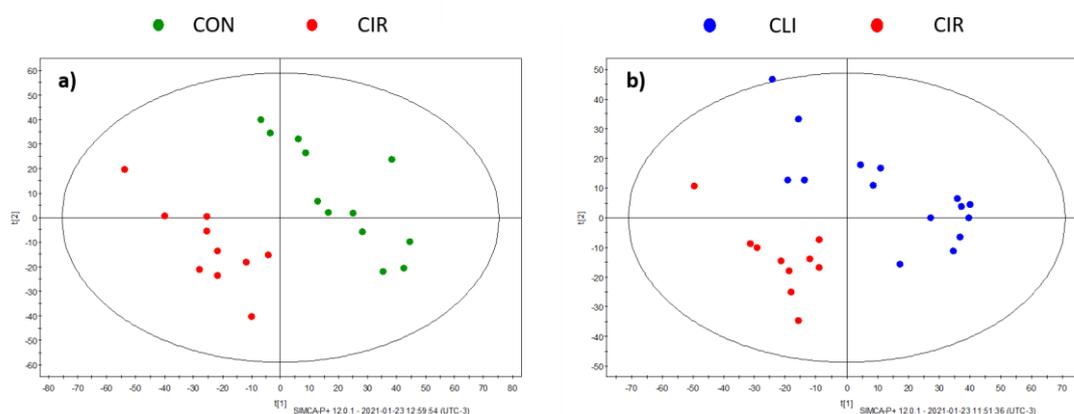


Figura 26: Scores plot dos modelos PLS-DA para amostras de urinas analisadas por GC-MS. Legenda: a) Comparação Controle (CON) vs Cirúrgico (CIR) e b) Comparação Clínico (CLI) vs Cirúrgico (CIR).

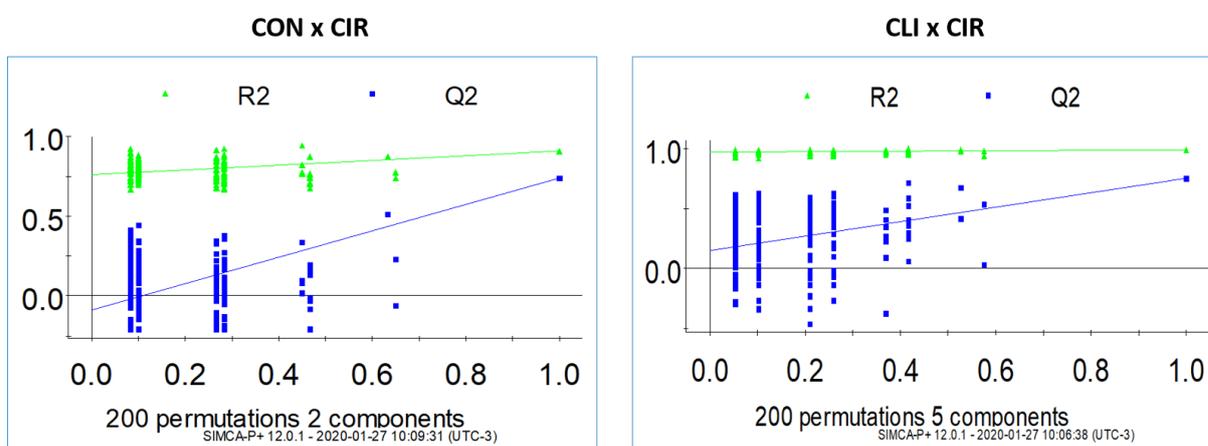


Figura 27: Teste de 200 permutações dos modelos PLS-DA da análise metabolômica por GC-MS.

Os metabólitos significativos pelos modelos de PLS-DA e identificados por comparação do espectro de massas foram avaliados como possíveis candidatos a biomarcadores pelo uso de curvas ROC.

A curva ROC, Figura 28, para a comparação CON x CIR foi feita utilizando 6 modelos que englobaram todas as 26 variáveis significativas no modelo multivariado e, o modelo com os 26 conjuntos de variáveis apresentou uma AUC de 0,923, informando uma acurácia de 92,3%. Na comparação CLI x CIR, o modelo com todos os 18 *molecular features* apresentaram uma acurácia de 98,3%. Os bons resultados de AUC para as duas comparações, denotam a excelente capacidade que esses conjuntos de metabólitos têm em distinguir o grupo teste e controle^{78,79}.

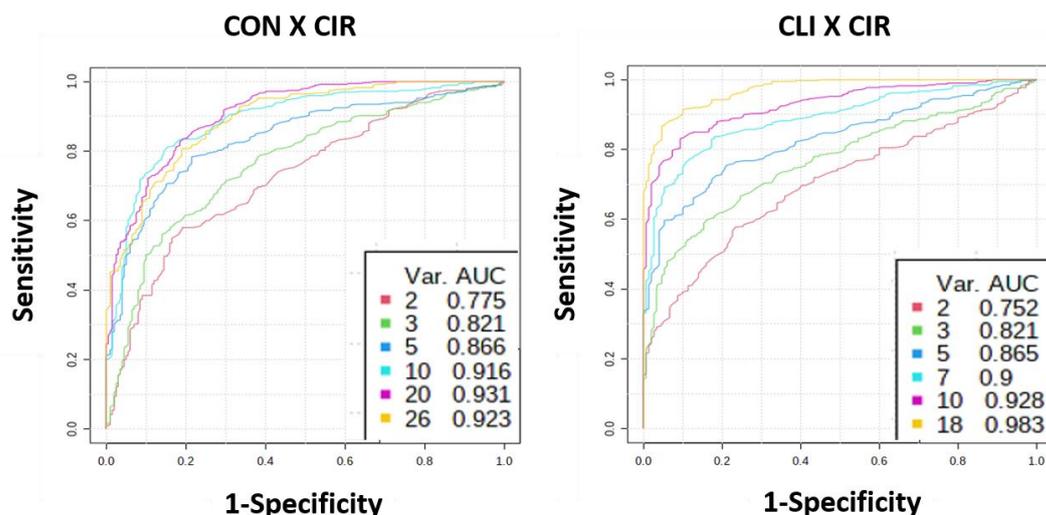


Figura 28: Comparação dos seis modelos de conjuntos de *molecular features* para as comparações baseadas nas curvas ROC. Todos os modelos foram criados utilizando o PLS-DA *built-in*. A legenda mostra o número do *molecular feature* e a AUCs de cada modelo.

4.2.4 – Abordagem univariada GC-MS

Na abordagem multivariada não foi possível encontrar padrões de separação entre os grupos controle e clínico, nas análises realizadas por GC-MS. Porém, ao realizarmos uma investigação usando as mesmas ferramentas estatísticas da univariada, foram identificados metabólitos significativos entre a comparação CON x CLI. Isso evidencia a complementariedade das ferramentas estatísticas multivariada e univariada.

A tomada de decisão para os metabólitos na abordagem univariada foi a mesma utilizada para amostras analisadas em RPLC-MS, citadas no item 4.1.2, e, esboçada na Figura 10.

A AUC para os metabólitos significativos, encontrados na univariada das amostras analisadas por GC-MS estão listadas na Tabela 6 e apresentaram valores significativos para todos os metabólitos identificados.

Tabela 6: Parâmetros p-valores e AUC para curva ROC dos metabólitos identificados com significância estatística utilizando a abordagem univariada, para análise GC-MS.

Comparação Controle x Cirúrgico			Comparação Clínico x Cirúrgico			Comparação Controle x Clínico		
<i>Metabólitos</i>	<i>p</i> -valor (ROC)	AUC (Univariada)	<i>Metabólitos</i>	<i>p</i> -valor (ROC)	AUC (Univariada)	<i>Metabólitos</i>	<i>p</i> -valor (ROC)	AUC (Univariada)
3-hydroxy-3-methylglutaric acid	0,004	0,770	4-hydroxybenzoic acid	0,04	0,727	3-hydroxy-3-methylglutaric acid	0,05	0,660
Arabitol/Ribose/Xylitol (Pentoses alcohol)*	0,03	0,790	4-hydroxyphenylacetic acid	0,0006	0,900	Allose/Galactose/Glucose (Hexose)*	0,03	0,703
Cellobiose	0,007	0,750	Ascorbic acid	0,04	0,753	Alpha glucosamine 1-phosphate	0,01	0,725
Furoylglycine	0,03	0,662	Furoylglycine	0,01	0,807	Dithiothreitol	0,04	0,709
Pantothenic acid	0,005	0,833	Gluconic acid	0,009	0,813	Lactobionic acid	0,04	0,693
Arabitol/Ribose/Xylitol (Pentoses alcohol)*	0,001	0,882	Lactobionic acid	0,01	0,760	Mannitol/Sorbitol/Iditol (Sugars acid)*	0,04	0,702
Tagatose	0,04	0,721	Mannitol/Sorbitol/Iditol (Sugars acid)*	0,02	0,780	Pantothenic acid	0,03	0,722
			N-acetyl-L-aspartic acid	0,0002	0,900	Pimelic acid	0,01	0,732
			Mannitol/Sorbitol/Iditol (Sugars acid)*	0,02	0,767	Mannitol/Sorbitol/Iditol (Sugars acid)	0,04	0,693
			Threitol	0,006	0,807	Tagatose	0,02	0,712

Todos os metabólitos analisados, em todas as comparações obtiveram AUC maior que 0,6, e demonstram ótima performance em discriminar os grupos teste e controle^{71,72}.

4.2.5 – Identificação

A identificação dos metabólitos foi feita pelo software MS-DIAL, que compara os espectros obtidos com os registrados em bibliotecas; as bibliotecas utilizadas foram a Fiehn e NIST. Para garantir confiabilidade na identificação apenas compostos com *score* maior que 80 foram utilizados. O *score* é uma nota atribuída pelo software que considera a similaridade espectral e do tempo de retenção⁸⁶.

4.3 – Metabólitos

A complementariedade das técnicas analíticas empregadas (RPLC-MS e GC-MS) e abordagem estatística (Univariada e Multivariada) podem ser visualizadas no diagrama de Venn, Figuras 29 e 30. Além disso, como já discutido, as diferenças nas características de metabólitos extraídos em cada técnica tornaram possível a comparação, dois a dois, dos três grupos disponíveis para o estudo, pois se fosse utilizado apenas GC-MS, a comparação CON x CLI não seria possível.

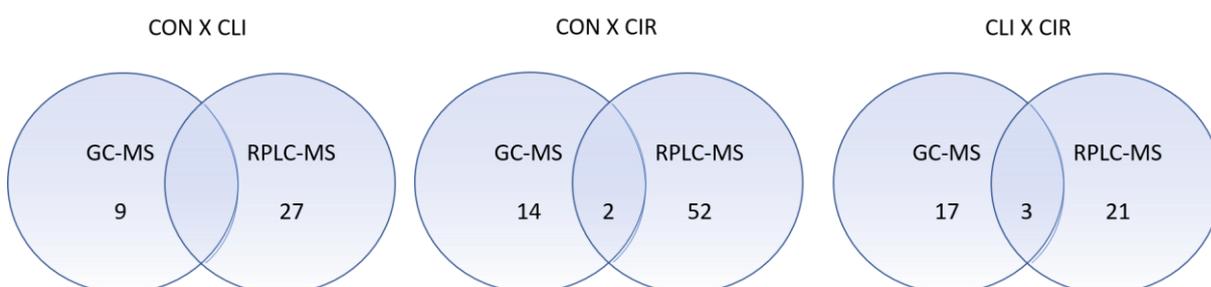


Figura 29: Diagrama de Venn para comparação de número de metabólitos significativos encontrados nas técnicas GC-MS e RPLC-MS

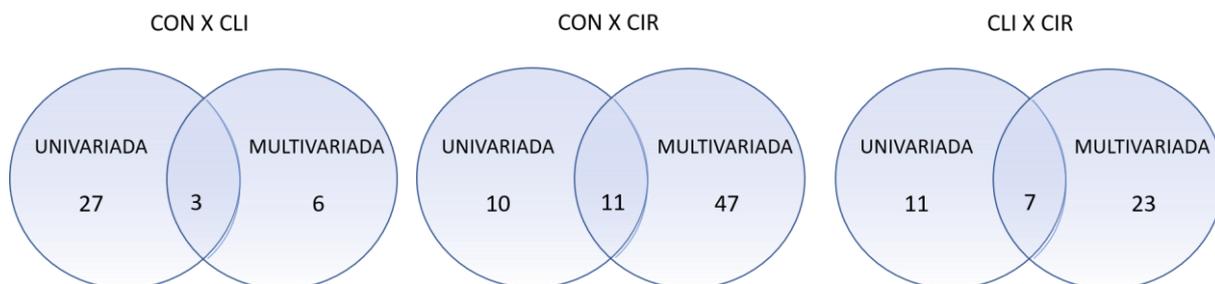


Figura 30: Diagrama de Venn para comparação de número de metabólitos significativos encontrados nas abordagens univariada e multivariada.

Todos os *molecular features* significativos encontrados nas análises multivariadas e univariada por LC-MS e por GC-MS estão apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9.

A classificação e rotas metabólicas atribuídas aos metabólitos foram extraídos dos bancos de dados HMDB e KEGG.

Tabela 7: Metabólitos discriminantes entre os grupos CON x CLI e suas características obtidas na avaliação metabolômica global por GC-MS e RPLC-MS.

COMPARAÇÃO CONTROLE X CLÍNICO										
Metabólito	Aduto	Massa (LC-MS)	Ion m/z (GC-MS)	Mass error (ppm)	Score	Change	Técnica Analítica	Classificação	Abordagem estatística	Rota biológicas
1-Methylhistamine / 3-Methylhistamine *	[M+Na] ⁺	192.0743		0		+ 93	LC-MS	Amines	Multivariada	Histidine metabolism
	[M+H] ⁺	126.1025	-	1	-	+ 101			Univariada	
1-Methylhistidine / 3-Methylhistidine *	[M+Na] ⁺	192.0743		1		+ 101	LC-MS	Amines	Multivariada	Histidine metabolism
	[M+H] ⁺		-						Univariada	
1-Methylinosine	[M+Na] ⁺	305.088		8		- 52	LC-MS	Purine nucleosides	Univarida	NA
2,3-Methylenesuccinic acid	[M+Na] ⁺	165.0158		0		- 71	LC-MS	Fatty acids and conjugates	Univarida	C5-Branched dibasic acid metabolism
2-Methylcitric acid	[M+K] ⁺	384.1505		3		+ 31	LC-MS	Tricarboxylic acids and derivatives	Univarida	NA
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	-	-	231		90	- 35	GC-MS	Fatty acids and conjugates	Univarida	Lipid metabolism Fatty acid metabolism
3-Hydroxyhippuric acid	[M+H] ⁺	196.0623		10		+ 84	LC-MS	Benzoic acids and derivatives	Univarida	Fatty acid metabolism
	[M+K] ⁺	234.0158		2		+ 72				
3-Methoxytyrosine	[M+H] ⁺	212.0922		1		+ 30	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada	NA
4-Hydroxyhippuric acid	[M+H] ⁺	196.0623		10		+ 84	LC-MS	Benzoic acids and derivatives	Univarida	Fatty acid metabolism
	[M+K] ⁺	234.0159		2		+ 72				
Acetylcysteine	[2M+H] ⁺	327.0704		8		- 56	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univarida	NA
Alpha glucosamine 1-phosphate	-	-	217		80	- 49	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Univarida	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
Aspartylglycosamine	[M+H] ⁺	336.14		0		+ 33	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Univarida	NA
Dihydroxy-1H-indole glucuronide	[M+H] ⁺	326.0894		6		+ 109	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	NA
Dithiothreitol	-	-	180		92	+ 54	GC-MS	Alcohols and polyols	Univarida	Vitamin K metabolism
Glucose / Galactose /Fructose (Hexose) *	-	-	103		95	+ 49	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Univarida	NA
Glutaminyphenylalanine	[M+K] ⁺	332.0979		8		- 43	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univarida	NA

Glutamyl-Hydroxyproline (Dipeptide)	[M+H] ⁺	261.1091	-	2	-	+ 47	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada Univarida	NA
Glutarylcarntine	[M+H] ⁺	276.1452	-	4	-	+ 54	LC-MS	Tricarboxylic acids and derivatives	Univarida	Lipid metabolism pathway
Glycylproline (Dipeptide)	[M+H] ⁺	173.0919	-	1	-	+ 46	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univarida	Collagen metabolism
Histidine asparagine (Dipeptide)	[M+Na] ⁺	292.1035	-	6	-	+ 36	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada	NA
Hydroxykynurenine	[M+K] ⁺	263.0417	-	4	-	+ 43	LC-MS	Carbonyl Compounds	Univarida	Tryptophan metabolism
Hydroxyprolyl-Glutamate (Dipeptide)	[M+H] ⁺	261.1091	-	4	-	+ 47	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada	NA
Hydroxyprolyl-Glutamate (Dipeptide)	[M+H] ⁺	261.1091	-	4	-	+ 47	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univarida	NA
Lactobionic acid	-	-	259	-	86	+ 52	GC-MS	NA	Univarida	NA
Muconic acid	[M+Na] ⁺	165.0158	-	0	-	- 71	LC-MS	Fatty acids and conjugates	Univarida	Benzoate degradation
N6,N6-Dimethyl-L-Lysine	[M+Na] ⁺	197.1252	-	4	-	+ 53	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada	Lysine degradation
N-Acetylneuraminic acid	[M+Na] ⁺	332.0979	-	8	-	- 43	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Univarida	Amino Sugar Metabolism Beta-Alanine metabolism Pantothenate and CoA
Pantothenic acid	-	-	291	-	78	- 49	GC-MS	Alcohols and polyols	Univarida	Fatty acid metabolism Lipid Metabolism
Pimelic acid	-	-	155	-	93	- 36	GC-MS	Fatty acids and conjugates	Univarida	NA
Poly-N-acetyllactosamine (N-acetylglucosamine and	[M+H] ⁺	384.1505	-	1	-	+ 31	LC-MS	Fatty acyl glycosides	Univarida	NA
Prolyglycine (Dipeptide)	[M+H] ⁺	173.0919	-	1	-	+ 46	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univarida	Amino acid degradation pathways
Putrescine	[M+H] ⁺	89.1079	-	1	-	+ 99	LC-MS	Amines	Multivariada	NA
Salicylic acid	[M+H] ⁺ [M+K] ⁺	196.0623 234.0160	-	10 2	-	+ 84 + 72	LC-MS	Benzoic acids and derivatives	Univarida	Pathways of salicylate elimination
Sorbitol / Mannitol	-	-	205	-	81/94	+ 60	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Univarida	Fructose and mannose metabolism Galactose metabolism
Tagatose	-	-	216	-	80	- 43	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Univarida	Galactose metabolism

Threonine and Tyrosine (Dipeptide)	[M+K] ⁺	321.0825	-	7	-	- 76	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univarida	NA
---------------------------------------	--------------------	----------	---	---	---	------	-------	---	-----------	----

*Compostos indiscrimináveis pelas técnicas empregadas

Tabela 8: Metabólitos discriminantes entre os grupos CON x CIR e suas características obtidas na avaliação metabolômica global por GC-MS e RPLC-MS

COMPARAÇÃO CONTROLE X CIRURGICO										
Metabólito	Aduto	Massa (LC-MS)	Ion m/z (GC-MS)	Mass error (ppm)	Score	Change	Técnica Analítica	Classificação	Abordagem estatística	Rota biológicas
12-Oxo-2,3-dinor-10,15-phytodienoic acid	[M+K] ⁺	303.1351	-	2	-	+ 73	LC-MS	Eicosanoids	Multivariada	Lipid metabolism pathway
2-(6-carboxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-	[M+K] ⁺	319.0073	-	3	-	- 65	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	NA
2-Methylbutyrylglycine	[M+K] ⁺	198.0524	-	2	-	+ 141	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada	NA
2-Methylcitric acid	[M+K] ⁺	341.1505	-	3	-	+ 75	LC-MS	Tricarboxylic acids and derivatives	Univariada	NA
2-Phenylglycine	[2M+H] ⁺	303.1351	-	4	-	+ 73	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada	NA
3-(2-hydroxyphenyl)propanoic acid	[M+K] ⁺	205.0249	-	6	-	+ 258	LC-MS	Phenylpropanoic acids	Multivariada	Phenylalanine metabolism
3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ylacetate	M+Na	219.1338	-	8	-	- 25	LC-MS	Fatty alcohol esters	Multivariada	Lipid metabolism pathway
3-Cresotinic acid	[M+H] ⁺	153.054	-	4	-	+ 132	LC-MS	Benzoic acids and derivatives	Univariada	NA
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid (dicrotalic acid)	-	-	231	-	90	- 43	GC-MS	Fatty acids and conjugates	Multivariada Univariada	Lipid metabolism Fatty acid metabolism
3-Hydroxy-4-methoxymandelate	[M+Na] ⁺	221.0406	-	7	-	- 46	LC-MS	Methoxyphenols	Multivariada	NA
3-Hydroxyphenylacetate	[M+H] ⁺	153.054	-	4	-	+ 132	LC-MS	1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids	Univariada Multivariada	Tyrosine metabolism
3-Methoxy-4-hydroxymandelate	[M+Na] ⁺	221.0406	-	7	-	- 46	LC-MS	Methoxyphenols	Multivariada	Tyrosine metabolism
3-Methoxyphenylacetic acid	[M+K] ⁺	205.0249	-	6	-	+ 258	LC-MS	Anisoles	Multivariada	NA
3-Methoxyphenylacetic acid	[M+K] ⁺	205.0249	-	6	-	+ 147	LC-MS	-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids	Multivariada	Tyrosine metabolism
3-Methoxytyramine	[M+K] ⁺	206.0595	-	8	-	+ 109	LC-MS	Methoxyphenols	Multivariada	Tyrosine metabolism

3-Phenyllactic acid	[M+K] ⁺	205.0249	-	6	-	+ 258	LC-MS	Phenylpropanoic acids	Multivariada	Phenylalanine metabolism
4-acetamidobutyric acid	-	-	142	-	90	- 32	GC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada	Arginine and proline metabolism
4-hydroxy-2,3-dimethoxybenzoic acid	[M+Na] ⁺	221.0406	-	7	-	- 46	LC-MS	Benzoic acids and derivatives	Multivariada	NA
4-Hydroxy-3-methylbenzoic acid	[M+H] ⁺	153.054	-	4	-	+ 137	LC-MS	Benzoic acids and derivatives	Multivariada	NA
4-Hydroxyphenylacetate	[M+H] ⁺	153.054	163	4	96	+ 132 + 84	LC-MS GC-MS	1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids	Univariada Multivariada	Tyrosine metabolism
5,6-Dihydrouridine	[M+H] ⁺	247.093	-	2	-	+ 68	LC-MS	Organoxygen compounds	Multivariada	NA
5-Hydroxyindoleacetaldehyde	[M+H] ⁺	176.0707	-	1	-	+ 139	LC-MS	Hydroxyindoles	Multivariada	Tryptophan metabolism
5-Hydroxylysine	[M+H] ⁺	163.1063	-	9	-	+ 137	LC-MS	Amino acids, peptides and analogues	Multivariada	Lysine degradation
6-Methylmercaptapurine	[M+2H] ⁺	84.0232	-	3	-	+ 39	LC-MS	Purines and purine derivatives	Multivariada	Mercaptopurine Metabolism Pathway
6-Methylsalicylic acid	[M+H] ⁺	153.054	-	4	-	+ 137	LC-MS	Benzoic acids and derivatives	Multivariada	NA
Alpha ketoglutaric acid	-	-	289	-	79	- 49	GC-MS	gamma-keto acids and derivatives	Multivariada	Citrate cycle (TCA cycle)
Arabitol / Ribitol / Xylitol (Pentoses alcohol) *	-	-	103	-	94	+ 81	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada Univariada	NA
Ascorbic acid	-	-	214	-	83	+ 55	GC-MS	Furanones	Multivariada	Ascorbate and aldarate metabolism
Asparagine alanine / Glutamine glycine (Dipeptide)	[M+Na] ⁺	226.0808	-	4	-	- 42	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada	NA
Aspartylhydroxyproline	[M+H] ⁺	247.093	-	2	-	+ 69	LC-MS	Amino acids, peptides and analogues	Multivariada	NA
Citric acid	[M+K] ⁺	230.9886	-	7	-	- 40	LC-MS	Tricarboxylic acids and derivatives	Multivariada	Citrate cycle (TCA cycle)
Cystathionine	[M+H] ⁺	223.0742	-	2	-	+ 182	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada	Glycine, serine and threonine metabolism
Cystine	[M+H] ⁺	241.0308	-	1	-	+ 156	LC-MS	Tricarboxylic acids and derivatives	Multivariada	Cysteine and methionine metabolism
Desaminotyrosine	[M+K] ⁺	205.0249	-	6	-	+ 258	LC-MS	Phenylpropanoic acids	Multivariada	Tyrosine metabolism

Diketogulonic acid	[M+K] ⁺	230.9886	-	7	-	- 40	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	Pentose and glucuronate interconversions
D-Threitol	[M+Na] ⁺	145.0474	-	2	-	+ 57	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	D-xylose metabolism
Erythritol - Uremia	[M+Na] ⁺	145.0474	-	2	-	+ 57	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	ABC transporters
Fucose (Hexose) *	-	-	117	-	80	+ 55	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	NA
Furoylglycine	[M+Na] ⁺	192.0272	94	2	89	- 55 - 51	LC-MS GC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada Univariada	Fatty acid beta-oxidation
Galabiose -Maltose - Trehalose (Disaccharides)*	[M+Na] ⁺	365.1053	-	0	-	- 20	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	Starch and sucrose metabolism
Gemcitabine diphosphate	[M+H] ⁺	212.5101	-	3	-	- 56	LC-MS	Organic oxoanionic compounds	Multivariada	NA
Geranyl phenylacetate	[M+H] ⁺	273.1842	-	3	-	+ 80	LC-MS	Fatty alcohol esters	Multivariada	Lipid metabolism pathway
Gluconic acid	-	-	205	-	90	- 54	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada Univariada	Carbon metabolism
Glutaminyglutamic acid (Dipeptide)	[M+H] ⁺	276.1183	-	3	-	+ 84	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada	NA
Glutamyl-Hydroxyproline	[M+H] ⁺	261.1091	-	4	-	+ 73	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada Univariada	Amino acid degradation pathways
Glycylproline (Dipeptide)	[M+H] ⁺	173.0919	-	1	-	+ 40	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada	NA
Hydroxypropyl-Proline (Dipeptide)	[M+H] ⁺	229.1196	-	6	-	+ 72	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada	NA
Hydroxyvalerylcarnitine	[M+K] ⁺	302.1342	-	7	-	+ 41	LC-MS	Fatty acids and conjugates	Multivariada	Lipid metabolism pathway
Indoleacetic acid	[M+H] ⁺	176.0707	-	1	-	+ 139	LC-MS	Indolyl carboxylic acids and derivatives	Univariada	NA
Leucrose	-	-	361	-	97	- 50	GC-MS	alpha-(1-1) linked disaccharide	Multivariada	NA
Maltose/ Trehalose (Disaccharides)	-	-	103	-	96	+ 36	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	Starch and sucrose metabolism
Mandelic Acid	[M+H] ⁺	153.054	-	4	-	+ 137	LC-MS	Benzene and substituted derivatives	Multivariada Univariada	Aminobenzoate degradation
Mannitol/Sorbitol/Galactiol/ Iditol (Sugars acid) *	[M+K] ⁺	221.0406	-	7	-	- 46	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada Univariada	Fructose and mannose metabolism
Methionine sulfoxide	[M+H] ⁺	166.0534	-	9	-	+ 152	LC-MS	Amino acids, peptides and analogues	Multivariada	Cysteine and methionine metabolism

Myo-Inositol	[M+K] ⁺	219.0273	-	3	-	- 31	LC-MS	Alcohols and polyols	Multivariada	Ascorbate and aldarate metabolism
N-gamma-Glutamylglutamine (Dipeptide)	[M+H] ⁺	276.1183	-	3	-	+ 84	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada	NA
Pantothenic acid	-	-	291	-	77	- 59	GC-MS	Alcohols and polyols	Multivariada Univariada	NA
Poly-N-acetyllactosamine (N-acetylglucosamine and	[M+H] ⁺	384.1505	-	1	-	+ 75	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada	NA
Prolylglycine (Dipeptide)	[M+H] ⁺	173.0919	-	1	-	+ 39	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada	NA
Putrescine	[M+H] ⁺	89.1079	-	6	-	+ 283	LC-MS	Amines	Multivariada	Arginine and proline metabolism
Ribose (Pentose)	-	-	103	-	91	+ 30	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	NA
Sorbose (Hexose)	-	-	319	-	92	- 64	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	NA
Sorbose/Allose/Fructose/ Glucose/Tagatose(Hexose)*	[M+K] ⁺	219.0273	-	3	-	- 31	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	NA
Syringic acid	[M+Na] ⁺	221.0406	-	7	-	- 46	LC-MS	Benzoic acid and derivatives	Multivariada	Aminobenzoate degradation
Tagatose (Pentose)	-	-	217	-	80	- 48	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada Univariada	NA
Taurine	[M+H] ⁺	126.0211	-	7	-	+ 99	LC-MS	Organosulfonic acids and derivatives	Multivariada	Taurine and hypotaurine metabolism
Threonic acid	-	-	293	-	97	- 32	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	Ascorbate and aldarate metabolism
Uric acid	[M+Na] ⁺	191.018	-	2	-	+ 78	LC-MS	Purines and purine derivatives	Multivariada	Purine metabolism

*Compostos indiscrimináveis pelas técnicas empregadas

Tabela 9: Metabólitos discriminantes entre os grupos CLI x CIR e suas características obtidas na avaliação metabolômica global por GC-MS e RPLC-MS

COMPARAÇÃO CLINICO X CIRURGICO										
Metabólito	Aduto	Massa (LC-MS)	Ion m/z (GC-MS)	Mass error (ppm)	Score	Change	Técnica Analítica	Classificação	Abordagem estatística	Rota biológicas
1,5-anhydri-D-Sorbitol	-	-	203	-	89	+ 31	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	NA
1-Methylhistamine / 3-Methylhistamine *	[M+H] ⁺	126.1025	-	6	-	- 47	LC-MS	Amines	Multivariada	Histidine metabolism
2-Aminomuconic acid	[M+H] ⁺	158.0439	-	6	-	-35	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada	Tryptophan metabolism
2-Methylbutyrylglycine	[M+K] ⁺	198.0524	-	2	-	+ 93	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada	Pathway of L- isoleucine
3-(3-Hydroxyphenyl)propanoic acid	[M+K] ⁺	205.0249	-	6	-	+ 147	LC_MS GC-MS	Phenol esters	Multivariada Univariada	Phenylalanine metabolism
3-Hydroxyphenylacetic acid	[M+H] ⁺	153.054	-	9	-	+ 124	LC-MS	1-hydroxy-2-unsubstituted benzenoids	Multivariada	Tyrosine metabolism
4-Hydroxy-3-methylbenzoic acid	[M+H] ⁺	153.054	-	9	-	+ 124	LC-MS	Anisoles	Multivariada	NA
4-hydroxybenzoic acid	-	-	193	-	85	+ 96	GC-MS	Benzoic acids and derivatives	Multivariada Univariada	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis
4-hydroxyphenylacetic acid	[M+H] ⁺	153.054	163	-	96	+ 124 + 112	LC-MS GC-MS	1-hydroxy-2-unsubstituted benzenoids	Multivariada	Tyrosine metabolism Phenylalanine metabolism
4-Methoxyphenylacetic acid	[M+K] ⁺	205.0249	-	6	-	+ 147	LC-MS	-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids	Multivariada	Tyrosine metabolism Phenylalanine metabolism
5-Aminopentanoic acid	[2M+H] ⁺	235.1659	-	3	-	- 46	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada	Lysine degradation
5-Hydroxyindoleacetaldehyde	[M+H] ⁺	176.0707	-	1	-	+ 96	LC-MS	Benzoic acids and derivatives	Multivariada	Tryptophan metabolism
6-Methylsalicylic acid	[M+H] ⁺	153.054	-	9	-	+ 124	LC-MS	Hydroxyindoles	Multivariada	NA
Adenine	[M+Na] ⁺	158.0439	-	1	-	- 35	LC-MS	Purines and purine derivatives	Univariada	Purine metabolism
Alpha ketoglutaric acid	-	-	289	-	79	- 47	GC-MS	gamma-keto acids and derivatives	Multivariada	Citrate cycle (TCA cycle)
Alpha-glucosamine 1-phosphate	-	-	217	-	80	+ 48	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism

Asparagine alanine / Glutamine glycine (Dipeptide)	[M+Na] ⁺	226.0808	-	4	-	- 35	LC-MS	Amino acids, peptides and analogues	Multivariada	Citrate cycle (TCA cycle)
Beta- alanine	-	-	247	-	96	- 36	GC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada	Beta-Alanine metabolism
Cellobiose (Disaccharides)	-	-	103	-	90	- 46	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	NA
Desaminotyrosine	[M+K] ⁺	205.0249	-	6	-	+ 147	LC-MS	Cyclic purine nucleotides	Multivariada	Phenylalanine metabolism Tyrosine metabolism
D-Fucose/2-Deoxyglucose (Hexose)*	[M+Na] ⁺	187.0589	-	3	-	+ 102	LC-MS	Phenylpropanoic acids	Multivariada	NA
D-glucose (hexose)	-	-	103	-	97	+ 30	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	NA
D-threitol	-	-	307	-	97	- 30	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Univariada	NA
Furoylglycine	-	-	94	-	85	- 64	GC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada Univariada	Fatty acid beta-oxidation
Gluconic acid	-	-	205	-	90	- 39	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada Univariada	Pentose phosphate pathway
Glucuronic acid	-	-	319	-	85	- 42	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	Aminobenzoate degradation
Glutamine hydroxyproline (Dipeptide)	[M+K] ⁺	298.0789	-	-	-	- 31	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	NA
Glycerol 1-phosphate	-	-	299	-	84	+ 36	GC-MS	Glycerophosphates	Multivariada	Glycerolipid metabolism
Hydroxykynurenine	[M+K] ⁺	263.0417	-	4	-	- 36	LC-MS	Carbonyl compounds	Univariada	Tryptophan metabolism
Indole-3-acetic-acid-O- glucuronide	[M+K] ⁺	390.0621	-	9	-	- 40	LC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Univariada	NA
Indoleacetic acid	[M+H] ⁺	176.0707	-	1	-	+ 96	LC-MS	Indolyl carboxylic acids and derivatives	Univariada	Tryptophan metabolism
L-3-Phenyllactic acid	[M+K] ⁺	205.0249	-	6	-	+ 147	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Multivariada	Phenylalanine metabolism
Lactobionic acid	-	-	259	-	86	- 37	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Univariada	NA
L-ascorbic acid	-	-	214	-	83	+ 110	GC-MS	Furanones	Multivariada Univariada	Ascorbate and aldarate metabolism
L-Valine	[2M+H] ⁺	235.1659	-	3	-	- 46	LC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada	Valine, leucine and isoleucine degradation
Mandelic Acid	[M+H] ⁺	153.054	-	9	-	+ 124	LC-MS	Phenylpropanoic acids	Multivariada	Aminobenzoate degradation

Methyl (E)-2-dodecenoate	[M+Na] ⁺	235.1659	-	4	-	- 46	LC-MS	Fatty acid esters	Univariada	Lipid metabolism
N-acetyl-D-mannosamine	-	-	205	-	89	- 38	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
N-acetyl-L-aspartic acid	[M+H] ⁺	176.0708	116	1	81	+ 96 + 50	LC_MS GC-MS	Amino acids, peptides, and analogues	Univariada Multivariada	Alanine, aspartate and glutamate metabolism
Ribose/ Arabinose / Xylose (Pentose)*	-	-	307	-	91	+ 114	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Multivariada	NA
Sorbitol/ Mannitol *	-	-	205	-	90 / 94	- 50	GC-MS	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Univariada	Fructose and mannose metabolism

*Compostos indiscrimináveis pelas técnicas empregadas

Capítulo 5 – Interpretação Biológica

5 – INTERPRETAÇÃO BIOLÓGICA

5.1 – Análise de via metabolômica

Uma das maneiras de estimar a importância de um metabólito dentro de uma rota metabólica é utilizar o *Metabolomics Pathway Analysis* (MetPA); essa análise pode ser realizada utilizando algoritmos como, o teste exato de Fisher e o teste hipergeométrico para realizar a análise de enriquecimento da via, que é um passo essencial para interpretação de dados ômicos. Nessa etapa, determina-se o enriquecimento estatístico das vias metabólicas, processos biológicos e outras anotações funcionais na lista de metabólitos candidatos. Tais abordagens são similares à abordagem utilizada em *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA)^{87,88}, e identifica quais vias metabólicas têm compostos que estão super-representados e têm perturbações significativas em suas concentrações.

Após essa análise topológica da via, uma métrica usada para estimar a importância relativa de um nó em toda as suas ramificações é feita, tal medida se baseia em medidas de centralidade de um metabólito. Tal medida propõe-se a determinar, de maneira quantitativa, a posição de um nó em relação aos outros nós na via metabólica; isso ajuda a estimar a importância relativa de um determinado nó ou papel na organização da rede. Para realizar essa medida de centralidade existem várias maneiras, uma delas é pelo método *degree centrality*, que consiste em avaliar a importância do nó analisando a quantidade de nós a que ele é ligado, ou seja, quanto maior o número de nós ligados a este, maior a sua importância na via metabólica^{89,90}.

Por fim, o impacto da via (do inglês, *Pathway Impact*) é uma combinação dos resultados de centralidade e enriquecimento da via. Esse parâmetro é calculado utilizando a razão entre a soma das medidas de importância de cada um dos metabolitos correspondentes, pela soma das medidas de importância de todos os metabólitos em cada via^{88,89}.

O *Pathway Impact score* representa uma estimativa da importância relativa de uma determinada via frente a uma rede metabólica global; um valor de $\text{impact} > 0,1$ e $-\log_{10}(p) > 1$ são comumente usados para considerar uma via metabólica relevante^{89,91}.

O *MetaboAnalyst* foi utilizado para realizar a *Pathway analysis* dos compostos identificados em cada separação. O método de enriquecimento utilizado foi Teste de Fisher, teste de significância estatística utilizado na análise de tabelas de contingência, na análise topológica foi *Out-degree Centrality* e a biblioteca de via metabólica selecionada foi *homo sapiens* do banco de dados KEGG.

As Figuras 31, 32 e 33 ilustram os gráficos das análises topográficas geradas pelo *MetaboAnalyst*.

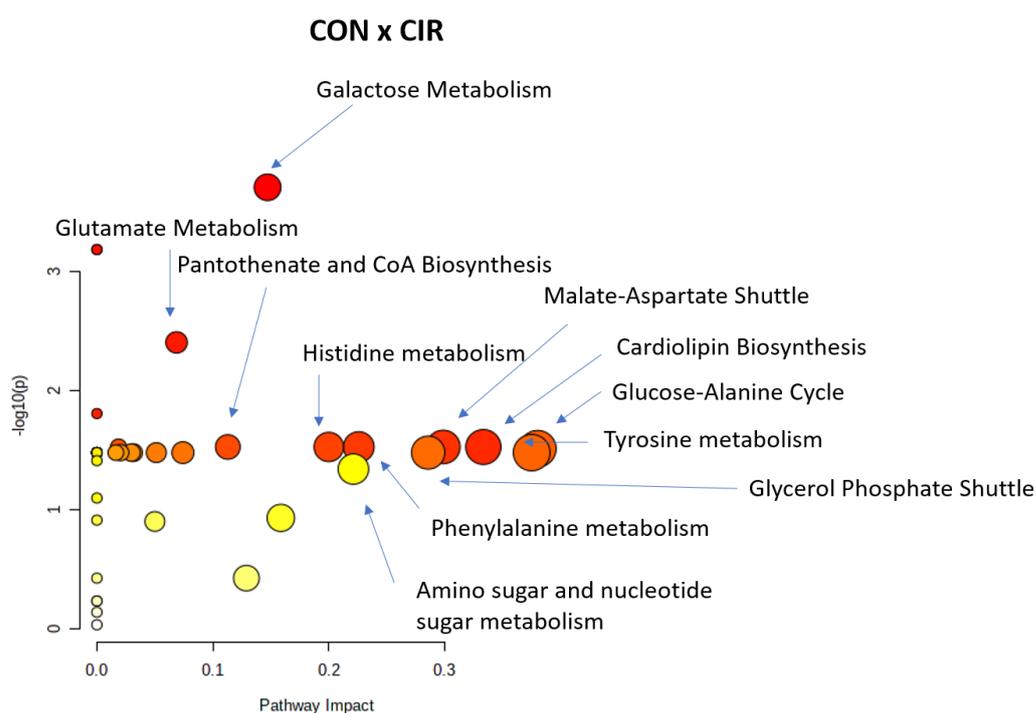


Figura 31: Mapa de visualização das vias metabólicas relevantes para a comparação CON x CIR. As cores variam do amarelo para o vermelho conforme diferentes níveis de significância para a análise de enriquecimento.

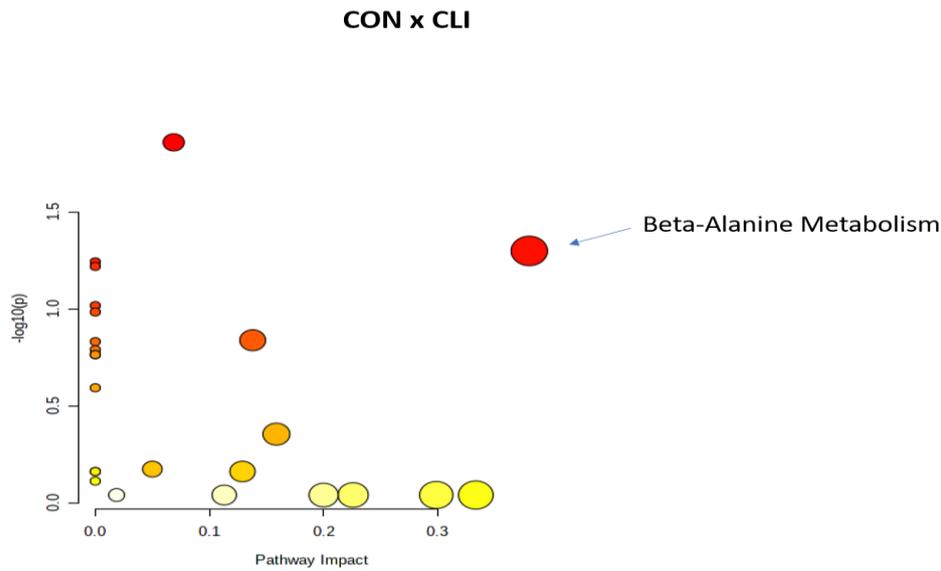


Figura 32: Mapa de visualização das vias metabólicas relevantes para a comparação CON x CLI. As cores variam do amarelo para o vermelho conforme diferentes níveis de significância para a análise de enriquecimento.

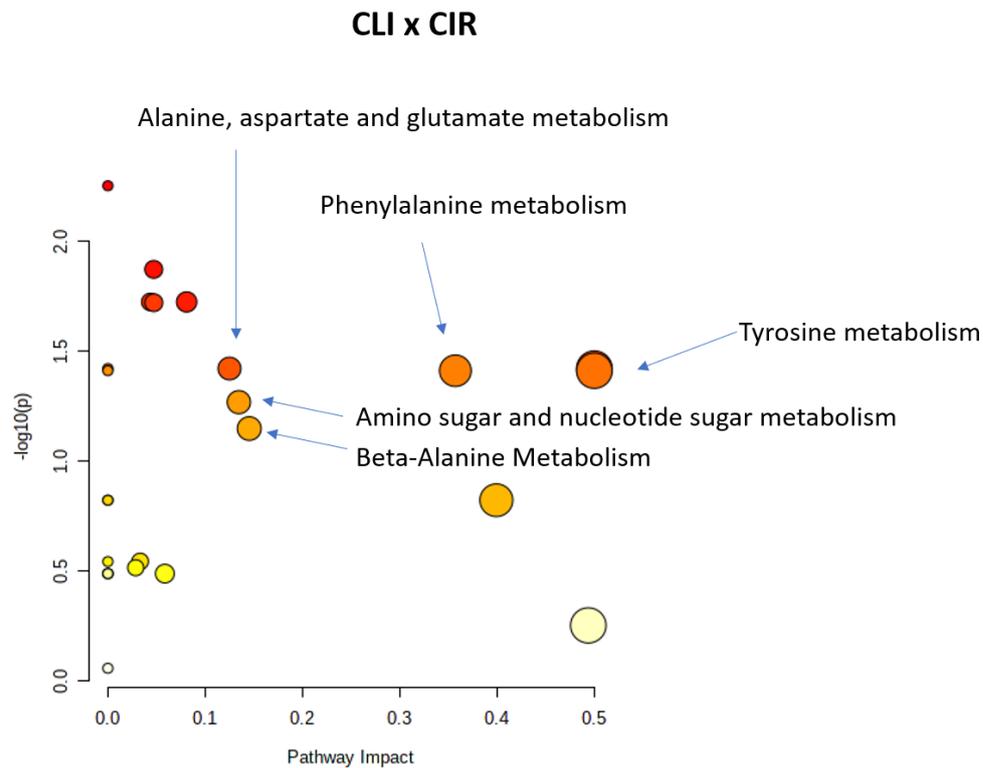


Figura 33: Mapa de visualização das vias metabólicas relevantes para a comparação CLI x CIR. As cores variam do amarelo para o vermelho conforme diferentes níveis de significância para a análise de enriquecimento.

5.1.1 – Metabolismo Tirosina e Fenilalanina

As rotas metabólicas do metabolismo Tirosina e Fenilalanina tiveram alto *Pathway Impact* tanto na comparação CLI x CIR como na comparação CON x CIR.

Para a comparação CLI x CIR a rota metabólica da Tirosina teve como metabólitos significativos putativamente identificados o ácido 3-hidroxifenilacético, ácido 4-metoxifenilacético e desaminotirosina e, na comparação do espectro de massas por GC-MS, foi identificado o ácido 4-hidroxifenilacético. Para a rota da Fenilalanina, os metabólitos participantes putativamente identificados foram, desaminotirosina, ácido L-3-fenil-lático, ácido 3-(3-hidroxifenil) propanoico (Identificado também por GC-MS), ácido 4-metoxifenilacético e ácido 4-hidroxifenilacético.

Para a comparação CON x CIR a rota metabólica da Tirosina teve como metabólitos significativos putativamente identificados ácido 3-hidroxifenilacético, desaminotirosina, 3-metoxitiramina, 4-hidroxi-3-metoxi-mandélico, 3-metoxifenilacético e, na comparação do espectro de massas por GC-MS, foi identificado o ácido 4-hidroxifenilacético. Para a rota da Fenilalanina, os metabólitos participantes putativamente identificados foram, L-3-fenil-lático, ácido 3-(2-hidroxifenil) propanoico.

A rota da Tirosina e a rota da Fenilalanina apresentam metabólitos em comuns, devido ao fato de, as duas rotas estarem intrinsecamente ligadas entre si. Isso porque um dos produtos da rota metabólica da fenilalanina é a tirosina⁹².

Tais desarranjos do metabolismo desses dois aminoácidos podem causar doenças renais^{92,93}. Além disso, em casos de insuficiência renal crônica, há prejuízo na conversão da fenilalanina em tirosina e estresse oxidativo aumentado com efeitos metabólicos prejudiciais e tóxicos⁹⁴.

Estudos recentes em humanos demonstraram que a produção de tirosina a partir da fenilalanina ocorre não apenas no fígado, mas também nos rins⁹⁵.

O ácido 4-hidroxifenilacético foi o que apresentou uma das maiores *change* (124 em LC-MS e 112 em GC-MS). Seu aparecimento nas duas técnicas empregadas e a identificação por comparação de espectro, com score alto (96), confirmam sua presença discriminatória entre os grupos clínico e cirúrgico. Esse metabólito é encontrado aumentado em pacientes com nefropatia membranosa, doença glomerular caracterizada por quantidade excessiva de proteína na urina (proteinúria) e pela lesão de podócitos, células que revestem a superfície urinária do tufo capilar glomerular, que constituem a barreira de filtração glomerular, assegurando sua permeabilidade seletiva⁹⁶. A maior produção deste metabólito antioxidante sugere um mecanismo de defesa contra o aumento do estresse oxidativo e posteriormente excretado pela urina⁹⁷.

5.1.2 – Ciclo de Krebs

Embora o metabolismo do ciclo de Krebs, também conhecido como ciclo do citrato, não apareça no gráfico de *Pathway Impact* nas duas comparações deste tópico, as duas rotas discutidas no tópico anterior têm ligação direta com esse ciclo.

O ácido alfa-cetoglutárico e ácido cítrico já foram encontrados como metabólitos significativos em estudos associando metabólitos ao desenvolvimento de nefropatia induzida por contraste.⁹⁸

Estudos realizados em urinas de ratos com obstrução ureteral unilateral⁹⁹ e pacientes com insuficiência renal aguda¹⁰⁰, também apontaram o ácido alfa-cetoglutárico e o ácido cítrico, com expressiva diminuição e relacionou-se essa diminuição da excreção urinária de intermediários do ciclo de Krebs, ao possível comprometimento do metabolismo oxidativo mitocondrial, sugerindo lesão no túbulo proximal^{99,100}.

5.1.3 – Metabolismo dos aminoaçúcares e nucleotídeos

O metabolismo dos aminoaçúcares e nucleotídeos também aparecem alterados e significativos no gráfico de *Pathway Impact* para as comparações envolvendo o grupo CLI x CIR e CON x CIR. Para a comparação CLI x CIR, temos a diminuição de N-acetil-D-manosamina e o aumento do alfa-glucosamina 1-fosfato.

N-acetil-D-manosamina apresentou uma diminuição no grupo cirúrgico, quando confrontado com o grupo clínico, tendo as razões entre o grupo cirúrgico e clínico (CLI x CIR) um *change* de - 38. A N-acetil-D-manosamina é a molécula precursora dos ácidos siálicos, uma família de carboidratos complexos de nove carbonos, que apresentam variações no grau de substituição e oxidação na cadeia carbônica¹⁰¹.

Ácidos siálicos estão presentes na barreira de filtração glomerular, unidades funcionais dos rins, onde ocorre a filtração do sangue e eliminação de resíduos metabólitos. A redução desses ácidos está relacionada à nefropatia membranosa, doença por lesão mínima e a perda de nefrina, uma proteína estrutural de podócito¹⁰².

Os podócitos são células do epitélio visceral dos rins que, juntamente com os ácidos siálicos formam um importante componente da barreira de filtração glomerular, contribuindo para a seletividade de tamanho e mantendo uma superfície de filtração massiva⁹⁶.

O ácido siálico mais abundante existente em eucariotos, e principalmente nos mamíferos, é o ácido *N*-acetilneuramínico, sendo o precursor de todos os outros ácidos siálicos, tanto que frequentemente é referido simplesmente como ácido siálico. A síntese desse ácido é iniciada e regulada pela enzima GNE. Tal enzima já foi relacionada em estudos de desordem urinária ^{103,104}.

A suplementação de N-acetil-D-Manosamina, administrada em camundongos com deficiência em GNE, já demonstrou eficiência no tratamento de proteinúria, podocitopatia

(lesão glomerular é causada por alterações intrínsecas e/ou extrínsecas nos podócitos) e hipoalilação de glicanos glomerulares¹⁰⁴.

5.1.4 – Metabolismo da beta-alanina

A pouca discrepância entre os grupos CON x CLI, além de não gerar dados na comparação multivariada em análises de GC-MS, também apresentou uma única rota metabólica no gráfico de *Pathway Impact*, o da beta-alanina, também encontrado na comparação CLI x CIR. Já foi reportada a significância da beta-alanina em pacientes que desenvolveram nefropatia induzida por contraste⁹⁶.

5.1.5 – Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato

O metabolismo da alanina, aspartato e glutamato apresentou alto *Pathway Impact* na comparação CON x CIR. O metabólito que se destaca nessa rota é o ácido N-acetil-L-aspartico, putativamente identificado em LC-MS e identificado por comparação espectral em GC-MS com *score* 81. O ácido aspartico está associado ao estresse oxidativo e condições inflamatórias em ratos com doença renal crônica¹⁰⁵. E um seu aumento já foi verificado em ratos com falência renal crônica. Também é um possível biomarcador sérico de nefropatia diabética¹⁰⁶.

Capítulo 6 – Conclusão e perspectivas

6 – CONCLUSÃO

6.1 – Conclusão

O estudo foi bem-sucedido em encontrar um painel de metabólitos que discriminassem os grupos cirúrgico, clínico e controle, utilizando a abordagem metabolômica com multiplataforma de análise. Isso demonstra a poderosa aplicabilidade dessa área de estudo multidisciplinar. O tratamento das amostras para a extração do maior número de metabólitos, pensando em uma análise global (*untarget*) para GC-MS, foram estudados e otimizados para as condições laboratoriais e amostral, demonstrando que as condições estudadas (tempo e temperatura das reações) influenciam no número de metabólitos extraídos e identificados. A condição otimizada foi utilizada para o preparo de amostra por GC-MS.

Ao utilizar duas técnicas de separação podemos encontrar metabólitos de naturezas distintas e encontrar distinção nas três comparações, o que não seria possível utilizando apenas GC-MS. Isso demonstra a complementariedade das técnicas, principalmente em uma análise global.

Verificaram-se perturbações similares nas vias metabólicas nas comparações CON x CIR e CLI x CIR. Principalmente no metabolismo da fenilalanina, tirosina, aminoaçúcares e nucleotídeos.

Os metabólitos que discriminaram os grupos CLI x CIR foram: ácido 3-hidroxifenilacético, ácido 4-metoxi-fenilacético, ácido 4-hidroxifenilacético, desaminotirosina, ácido alfa-cetoglutárico, ácido cítrico, N-acetil-D-manosamina, alfa-glucosamina 1-fosfato, beta-alanina e o ácido N-acetil-L-aspártico. Após futuros estudos metabólitos poderão ser biomarcadores na indicação do tratamento de estenose de JUP em crianças.

A utilização da curva ROC fortalece a confiabilidade no conjunto de metabólitos encontrados como possíveis biomarcadores.

Os resultados demonstram um comprometimento, tanto na função tubular quanto na glomerular, principalmente de barreira, observados pela diminuição dos ácidos siálicos, importantes na barreira da membrana basal, e alta alteração do ácido 4-hidroxifenilacético. Esses resultados sugerem que a perda da função renal está relacionada ao começo das alterações das proteínas de barreira da filtração glomerular, causada principalmente por danos aos podócitos, fundamentais para a estrutura da filtração

Esses resultados demonstram que a metabolômica pode auxiliar na tomada de decisão, de pacientes com estenose de JUP, para qual tratamento prosseguir após a identificação da obstrução, impedindo o encaminhamento cirúrgico desnecessário.

6.2 – Perspectivas

Os metabólitos discriminantes encontrados na comparação entre o grupo de crianças submetidas a pieloplastia e com acompanhamento clínico, comparação de maior desafio, pode auxiliar na tomada de decisão. Porém são necessários futuros estudos, com preparo de novas amostras e repetição dos experimentos de metabolômica, para a realização de validação biológica desses metabólitos por meio de uma análise alvo, utilizando, por exemplo, adição de padrão ou espectrometria de massas MS/MS.

A indicação de lesão glomerular fornece fortes evidências para se iniciar um estudo com foco na compreensão do mecanismo de lesão na barreira de filtração glomerular e, conseqüentemente, a perda da função renal. Tais estudos também podem ser enriquecidos verificando-se a correlação entre os dados clínicos de proteinúria com a concentração dos metabólitos discriminadores encontrados pelo presente estudo

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

1. COLLINS, Francis S.; MCKUSICK, Victor A. Implications of the Human Genome Project for Medical Science. **Journal of the American Medical Association** , [S.l], v. 285, n. 5, p. 540-544, jan./2001.
2. WHEELER, D. A. *et al.* The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. **Nature**, [S.l], v. 452, n. 1, p. 872-876, abr./2008.
3. HORGAN, R. P.; KENNY, L. C. ‘Omic’ technologies:genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. **The Obstetrician & Gynaecologist**, [S.l], v 13, p. 189-195, jun./2011.
4. GÓES, A. C. S.; OLIVEIRA, V. X. Projeto Genoma Humano: um retrato da construção do conhecimento científico sob a ótica da revista Ciência Hoje. **Ciênc. Educ.**, Bauru, v. 20, n. 3, p. 561-577, 2014.
5. RYAN, D.; ROBARDS, K. Metabolomics: The Greatest Omics of Them All?. **Analytical Chemistry**, [S.l], v 78, p. 7954-7958, dez./2006.
6. NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. ‘Metabolomics’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, [S.l], v. 29, n. 11, p. 1181-1189, jul./1999.
7. FIEHN, Oliver. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand. **Comparative and Functional Genomic**, [S.l], v. 2, p. 155-168, jun./2001.
8. FACCIO, A. T. Abordagem metabolômica no estudo da exposição gestacional à poluição atmosférica. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

9. SUSSULINI, Alessandra. **Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications**. [S.L.]: Springer International Publishing, 2017. 6-8 p.
10. CRUZ, P. L. R. **Avaliação de terapias imunossupressoras em transplantes renais com uma abordagem metabolômica**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
11. NORDSTRÖM, Anders; LEWENSOHN, Rolf. Metabolomics: Moving to the Clinic. **Journal Neuroimmune Pharmacology**, [S.l.], v. 5, p. 5-17, abr./2009.
12. ARMITAGE, Emily G.; SOUTHAM, Andrew D. Monitoring cancer prognosis, diagnosis and treatment efficacy using metabolomics and lipidomics. **Metabolomics**, [S.l.], v. 12, p. 146, ago./2016.
13. TRUSHINA, Eugenia; MIELKE, Michelle M. Recent advances in the application of metabolomics to Alzheimer's Disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.l.], v. 1842, n. 8, p. 1232-1239, ago./2014.
14. PATTI, Gary J.; YANES, Oscar; SIUZDAK, Gary. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature reviews molecular cell biology**, [S.l.], v. 13, p. 263-266, abr./2012.
15. WOOD, Paul L. Mass Spectrometry Strategies for Clinical Metabolomics and Lipidomics in Psychiatry, Neurology, and Neuro-Oncology. **Neuropsychopharmacology REVIEWS**, [S.l.], v. 39, p. 24-33, ago./2013.
16. BOGDANOV, M. et al. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. **Brain**, [S.l.], v. 131, n. 2, p. 389-396, fev./2008.
17. SPRATLIN, Jennifer L.; SERKOVA, Natalie J.; ECKHARDT, S. Gail. Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: A Review. **Clinical cancer research**, [S.l.], v. 15, n. 2, p. 431-440, jan./2009.

18. FALEGAN, O. S. et al. Urine and Serum Metabolomics Analyses May Distinguish between Stages of Renal Cell Carcinoma. **Metabolites**, [S.l], v. 7, n. 6, fev./2017.
19. PRETER, Vicky De; VERBEKE, Kristin. Metabolomics as a diagnostic tool in gastroenterology. **The World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, [S.l], v. 4, n. 4, p. 97-107, nov./2013.
20. Atzler Dorothee; SCHWEDHELM, Edzard; ZELLER, Tanja. Integrated genomics and metabolomics in nephrology. **Nephrology Dialysis transplantation**, [S.l], v. 29, n. 8, p. 14671474, aug./2014.
21. MACLELLAN, D. L. et al. Alterations in urinary metabolites due to unilateral ureteral obstruction in a rodent model. **Molecular BioSystems**, [S.l], v. 7, p. 2181-2188, fev./2011.
22. FANOS, V. et al. Metabolomics Application in Maternal-Fetal Medicine. **BioMed Research International**, [S.l], v. 2013, p. 1-9, mai./2013.
23. ROBERTS, L. D. *et al.* Targeted Metabolomics. **Current protocols in molecular biology**, S.L, v. 98, n. 1, p. 1-34, abr./2012.
24. WORLEY, Bradley; POWERS, Robert. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, [S.l], v. 1, n. 1, p. 92-107, jun./2015.
25. **Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011.**, [S.l], p. 1-4, 2011. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/917736/1/CITE10.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2020.
26. VILLAS-BÔAS, Silas Granato; GOMBERT, Andreas K. Análise do metaboloma. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, [S.l], v. 9, n. 36, p. 58-69, jul./2018.

27. CANUTO, G. A. B. et al. Metabolômica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, [S.l], v. 41, n. 1, p. 75-91, out./2016.
28. CHIARADIA, Mariza C.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, [S.l], v. 31, n. 3, p. 623-636, fev./2008.
29. COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S..**Fundamentos de cromatografia**. 1 ed. [S.l]: Unicamp, 2006.
30. [SKOOG - WEST - HOLLER – CROUCH. **Fundamentos de química analítica**: Tradução da 8ª edição norte-americana. [S.l.]: Thomson, 2006. p. 899 - 909.
31. BEDAIR, Mohamed; SUMNER, Lloyd W. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, [S.l], v. 27, n. 3, p. 238-250, mar./2008.
32. LENZ, Eva Maria; WILSON, Ian D. Analytical Strategies in Metabonomics. **journal proteome research**, [S.l], v. 6, n. 2, p. 443-458, dez./2006.
33. HÜBSCHMANN, Hans-joachim. **Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications**. 3. ed. S.l: Wiley-Vch, 2015. p. 384-385.
34. XIAYAN, Li; LEGIDO-QUIGLEY, Cristina. Advances in separation science applied to metabonomics. **Electrophoresis journal**, [S.l], v. 29, n. 18, p. 3724-3736, out./2008.
35. GRECO, Giorgia; LETZEL, Thomas. Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations. **Journal of Chromatographic Science**, [S.l], v. 51, n. 7, p. 684-693, ago./2013.

36. HMDB. **Other Databases**. Disponível em: <https://hmdb.ca/w/databases>. Acesso em: 20 jan. 2021.
37. KOEPPEN, Bruce M; STANTON, Bruce A. **Fisiologia**: Berne e Levy. 6. ed. [S.l]: Elsevier, 2008. p. 561-562.
38. PIÇARRO, Clécio; SILVA, José M. P; OLIVEIRA, Eduardo A. Hidronefrose na criança. **Revista Médica de Minas Gerais**, [S.l], v. 24, n. 2, p. 61-65, jan./2014.
39. WARD, A M; KAY, R; ROSS, J H. Ureteropelvic junction obstruction in children. : Unique considerations for open operative intervention. **Urologic Clinics of North America** , [S.l], v. 25, n. 2, p. 211-217, mai./1998.
40. JACKSON, Laura; WOODWARD, Mark; COWARD, Richard J.. The molecular biology of pelvi-ureteric junction obstruction. **Journal of Pediatric Nephrology** , [S.l], v. 33, n. 4, p. 553-571, mar./2017.
41. BRAGA, L. H. et al. Ureteropelvic junction obstruction in children: two variants of the same congenital anomaly?. **International Brazilian Journal of Urology**, [S.l], v. 29, n. 6, p. 528-534, /dez. 2003.
42. RODRÍGUEZ-SUÁREZ, E. et al. Urine as a source for clinical proteome analysis: from discovery to clinical application. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.l], v. 1844, n. 5, p. 884-898, mai./2014.
43. BARRIL, E. D. S. et al. ESTENOSE DA JUNÇÃO PIELO URETERAL. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, Sorocaba, [S.l], v. 16, n. 3, p. 155-156, jul./2014.

44. CSAICSICHA, D.; GREENBAUMB, L. A.; AUFRICHTA C. Upper urinary tract: when is obstruction obstruction?. **Current Opinion Urology Journal**, [S.I.], v. 14, p. 213-217, jul./2012.
45. LEE, Hyeyoung; HAN, Sang Won. Ureteropelvic Junction Obstruction: What We Know and What We Don't Know. **Korean Journal of Urology**, [S.I.], v. 50, n. 5, p. 423-431, mai./2009.
46. Shokeir, Ahmed A. Role of urinary biomarkers in the diagnosis of congenital upper urinary tract obstruction. **Indian Journal of Urology**, [S.I.], v. 24, n. 3, p. 313-317, set./2008.
47. RICCABONA, M. et al. Doppler sonography in congenital ureteropelvic junction obstruction. **European Journal of Ultrasound**, [S.I.], v. 3, p. 203-209, out. 2005.
48. DECRAMER, S. et al. Predicting the clinical outcome of congenital unilateral ureteropelvic junction obstruction in newborn by urinary proteome analysis. **NATURE MEDICINE**, [S.I.], v. 12, n. 4, p. 398-400, mar. 2006
49. BEGER, R. D. et al. Metabonomics of acute kidney injury in children after cardiac surgery. **Pediatric Nephrology**, [S.L.], v. 23, p. 977-988, mar./2008.
50. DRUBE, J. et al. Urinary proteome analysis identifies infants but not older children requiring pyeloplasty. **Pediatric Nephrology**, [S.I.], v. 25, p. 1673-1678, fev./2010.
51. MESROBIAN, H. O. et al. Candidate Urinary Biomarker Discovery in Ureteropelvic Junction Obstruction: A Proteomic Approach. **THE JOURNAL OF UROLOGY**, [S.I.], v. 184, p. 709-714, ago./2010.
52. MACLELLAN, D. L. et al. Alterations in urinary metabolites due to unilateral ureteral obstruction in a rodent model. **Molecular BioSystems**, [S.I.], v. 7, n. 7, p. 2181-2188, abr./2011.

53. BOIZARD, F. et al. A capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry pipeline for long term comparable assessment of the urinary metabolome. **Scientific Reports**, [S.I], v. 6, out./2016.
54. PAPADOPOULOS, T. et al. Systems biology combining human- and animal-data miRNA and mRNA data identifies new targets in ureteropelvic junction obstruction. **BMC Systems Biology**, [S.I], v. 2017, n. 11, mar./2017.
55. MERCIER, K. et al. Preterm Neonatal Urinary Renal Developmental and Acute Kidney Injury Metabolomic Profiling: An Exploratory Study. **Pediatric Nephrology**, [S.L], v. 32, n. 1, p. 151-161, jan. 2017.
56. KIND, T. *et al.* FiehnLib – mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, [S.I], v. 81, n. 24, p. 10038-10048, dez./2009.
57. SMITH, C. A. et al. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. **Analytical Chemistry**, [S.L], v. 78, n. 3, p. 779-787, jan. 2006. (colocar ref 114 da GI).
58. Parreira, T. F. **Utilização de métodos Quimiométricos em dados de natureza multivariada**, 2003. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química,
59. CANUTO, Gisele A. B, Avaliação metabolômica comparativa in vitro de fármaco candidato ao tratamento de leishmaniose. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
60. NAKAMAE, Djair Daniel et al. EXAME DE URINA: TODO O RIGOR NA COLHEITA DE AMOSTRAS. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, [S.I], v. 14, n. 1, p. 51-57, apr./1980

61. GERTSMAN, Ilya; BARSHOP, Bruce A. Promises and pitfalls of untargeted metabolomics. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [S.l], v. 41, n. 3, p. 355-366, mai./2018.
62. FERREIRA, M. M. C. **QUIMIOMETRIA: CONCEITOS, MÉTODOS E APLICAÇÕES**. 1. ed. Campinas: Unicamp, 2015. p. 68-70.
63. TRYGG, Johan; HOLMES, Elaine; LUNDSTEDT, Torbjorn. Chemometrics in Metabonomics. **journal of proteome research**, [S.l], v. 6, n. 2, p. 469-479, dez./2006.
64. WISHART, David Scott. Metabolomics: Applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l], v. 19, n. 9, p. 482-493, set./2008.
65. TRIBA, M. N. *et al.* PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. **Molecular BioSystems**, [S.l], v. 11, n. 1, p. 13-29, jan./2015.
66. FDA. **General Clinical Pharmacology Considerations for Pediatric Studies for Drugs and Biological Products Guidance for Industry**. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/90358/download>. Acesso em: 20 jan. 2021
67. SZYMANSKA, E. *et al.* Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, [S.l], v. 8, n. 1, p. 3-16, jul./2011.
68. XIA, J. *et al.* Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. **Metabolomics**, [S.l], v. 9, n. 2, p. 280-299, abr./2013.
69. LOPES, B. *et al.* Bioestatísticas: conceitos fundamentais e aplicações práticas. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, [S.l], v. 73, n. 1, p. 16-22, set./2013.

70. PRATI, Ronaldo Cristiano; BATISTA, G. E. A. P. A; MONARD, Maria Carolina. Evaluating Classifiers Using ROC Curves. **Revista IEEE América Latina**, [S.l], v. 6, n. 2, p. 1-8, jun./2008.
71. MANDREKAR, Jayawant N.. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. **Journal of Thoracic Oncology**, [S.l], v. 5, n. 9, p. 1315-1316, set./2010.
72. INTERNATIONAL CONFERENCE ON MACHINE LEARNING, 2011, Bellevue, WA, USA, 2011. Tema: A Coherent Interpretation of AUC as a Measure of Aggregated Classification Performance.
73. MARASCHIN, M. *et al.* **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4: Fundamentos e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Bucher, 2017. p. 17-49.
74. HAWKINS, Douglas M.. The Problem of Overfitting. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S.l], v. 44, n. 1, p. 1-12, dez./2003
75. VINAIXA, M. *et al.* A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. **Metabolites**, [S.l], v. 2, n. 4, p. 775-795, ago./2012.
76. MCHUGH, Mary L.. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. **Biochemia Medica**, [S.l], v. 21, n. 3, p. 203-209, nov./2011.
77. NASCIMENTO, D. D. C; SILVA, Cristiane Rocha; PRESTES, Jonato. Procedimentos post hoc: orientação para praticantes de estatística em ciências da saúde. **Arquivos de Ciências do Esporte**, Uberaba, v. 6, n. 2, p. 45-49, jan./2018.
78. ZAIKIN, Vladimir G; HALKET, John M. Review: Derivatization in mass spectrometry--2. Acylation. **European Journal of Mass Spectrometry**, [S.l], v. 9, n. 5, p. 421-434, jan./2003.

79. ORATA, Francis. **Advanced gas chromatography**: Process in agricultura, biomedical and industrial applications. 1. ed. Quênia: IntechOpen, 2012. p. 83-108.
80. MASTRANGELO, A. et al. 31. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica chimica acta**, [S.l.], v. 900, p. 21-35, nov./2015
81. GULLBERG, J. *et al.* Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of Arabidopsis thaliana samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 331, n. 2, p. 283-295, ago./2004.
82. CHAN, Eric. C. Y; PASIKANTI, Kishore K.; NICHOLSON, Jeremy K. Global urinary metabolic profiling procedures using gas chromatography–mass spectrometry. **Nature**, [S.l.], v. 6, n. 10, p. 1483-1499, nov./2011.
83. FIEHN, Oliver. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling. **Current Protocols in Molecular Biology**, [S.l.], v. 114, n. 30, p. 1-32, abr./2017
84. HULSHOFF A, Lingeman H. Derivatization reactions in the gas-liquid chromatographic analysis of drugs in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.l.], v. 2, n. 3-4, p. 337-380, 1984.
85. DU, Xiuxia; ZEISEL, Steven H. Spectral Deconvolution for Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Current Status and Future Perspectives. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S.l.], v. 4, n. 5, p. 1-10, jan./2013.
86. MTBINFO-TEAM. **MS-DIAL tutorial**. Disponível em: <https://mtbinfo-team.github.io/mtbinfo.github.io/MS-DIAL/tutorial>. Acesso em: 21 out. 2020.

87. PACZKOWSKA, M. *et al.* Integrative pathway enrichment analysis of multivariate omics data. **Nature Communications**, [S.l.], v. 11, n. 735, p. 1-16, fev./2020.
88. XIA, Jianguo; WISHART, David S.. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. **Bioinformatics**, [S.l.], v. 26, n. 18, p. 2342-2344, jul./2010.
89. Liu G. *et al.* Pathway Analysis of Global Metabolomic Profiles Identified Enrichment of Caffeine, Energy, and Arginine Metabolism in Smokers but Not Moist Snuff Consumers. **Bioinformatics and Biology Insights**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 11, jul./2019.
90. Ronqui, J.R.R. **Medidas de centralidade em redes complexas: correlações efetividade e caracterização de sistemas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.
91. Liu X. *et al.* Identification of metabolic biomarkers in patients with type 2 diabetic coronary heart diseases based on metabolomic approach. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 6, n. 30785, p. 1-13, jun./2016.
92. MATTHEWS, Dwight E.. An Overview of Phenylalanine and Tyrosine Kinetics in Humans. **The Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 137, n. 6, p. 1549-1555, jun./2007.
93. CHAKRAPANI, Anupam; HOLME, Elisabeth. **Inborn Metabolic Diseases: Disorders of Tyrosine Metabolism**. 1. ed. Berlin: Springer, 2006. p. 233-243.
94. KOPPLE, Joel D. Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kidney failure. **Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 137, n. 6, p. 1586-1597, jun./2007.
95. BOIRIE, Y. *et al.* Impairment of phenylalanine conversion to tyrosine in end-stage renal disease causing tyrosine deficiency. **Kidney International**, [S.l.], v. 66, n. 2, p. 591-596, ago./2004.

96. SABINO, A. R. P. *et al.* Detecção de podocitúria em pacientes com nefrite lúpica. **Brazilian Journal of Nephrology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 252-258, jul./2013.
97. IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON SYSTEMS BIOLOGY, 2011, Zhuhai: IEEE, 2011. 327 – 335 p. Tema: Parallel Metabolomics of Urine and Serum Revealed Systematic Alteration Associated with Renal Disease.
98. DIERCKS, D. B. *et al.* Urine metabolomic analysis to detect metabolites associated with the development of contrast induced nephropathy. **Clinical and Experimental Emergency Medicine**, [S.l], v. 3, n. 4, p. 204-212, fev./2016.
99. MACLELLAN, D. L. *et al.* Alterations in urinary metabolites due to unilateral ureteral obstruction in a rodent model. **Molecular Omics**, [S.l], v. 7, n. 7, p. 2181-2188, mar./2011.
100. BAIRAKTARI, E. Paraquat-induced renal injury studied by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. **Clinical Chemistry**, [S.l], v. 44, n. 6, p. 1256-1261, jun./1988.
101. FATIMA, A. D. *et al.* Sialic acids: from the comprehension of their involvement in biological processes to antiinfluenza drug design . **Química Nova**, [S.l], v. 28, n. 2, p. 306-316, nov./2004.
102. HUIZING, M. *et al.* Rationale and Design for a Phase 1 Study of N-Acetylmannosamine for Primary Glomerular Diseases. **Kidney International Reports**, [S.l], v. 4, n. 10, p. 1454-1462, out./2019.
103. ITO, M. *et al.* Glycoprotein hyposialylation gives rise to a nephrotic-like syndrome that is prevented by sialic acid administration in GNE V572L point-mutant mice. **Plos One**, [S.l], v. 7, n. 1, p. 1-13, jan./2012.

104. GALEANO, B. *et al.* Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine. **Journal of Clinical Investigation**, [S.l], v. 117, n. 6, p. 1585-1594, jun./2007.
105. CHEN, D. *et al.* The link between phenotype and fatty acid metabolism in advanced chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [S.l], v. 32, n. 7, p. 1154-1166, jul./2017.
106. HIRAYAMA, A. *et al.* Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.l], v. 404, n. 3101, p. 3109, set./2012.

SÚMULA CURRICULAR

1.DADOS PESSOAIS

Nome: Lucas Henrique Ferreira da Silva

Local e data de nascimento: Nova Odessa, SP – 02/05/1988.

2.EDUCAÇÃO

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2012 - 2017.
Bacharel em química (com opção Tecnológica).

USP – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2018 - 2021
Mestrado em Ciências (Química Analítica).

3.FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2017 – Curso de atualização em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Carga horária de 20 horas – Hospital Israelita Albert Einstein.

2016 - XX Disciplina Intersemestral – “Biocatálise: Química a serviço da sustentabilidade”. Carga horária de 30 horas – Instituto de química de São Carlos – USP.

2021 – Validação, Verificação e Transferência de métodos analíticos. Carga horária 15 horas – USP Education.

4.OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, Cnpq, 2018 – 2020.

Analista de desenvolvimento Jr. União Química Farmacêutica Nacional, 2020 - até o presente.

Anexos

Anexo 1: Carta de aprovação no comitê de ética.**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES URINÁRIOS NO CONTROLE DO TRATAMENTO DE ESTENOSE DE JUNÇÃO URETEROPÉLVICA EM CRIANÇAS

Pesquisador: ROBERTO IGLESIAS LOPES

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 62235816.8.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.942.820

Apresentação do Projeto:

Estudo de prospectivo em uma coorte de participantes com diagnóstico de estenose de junção uretero-pélvica (JUP) confirmado por exames de imagem (US ou TC ou UE) demonstrando hidronefrose sem dilatação ureteral, cintilografia renal com DTPA evidenciando padrão obstrutivo, para avaliar o valor de marcadores urinários (NGAL, MMP2, MMP9, TIMP, KIM-1 e MMP12 no acompanhamento clínico e evolução destes participantes.

Estarão envolvidos no estudo 80 participantes, a saber: 30 submetidos a intervenção cirúrgica; 20 em acompanhamento clínico e 30 controles sem estenose de junção uretero-pélvica.

Em setembro de 2018, os pesquisadores solicitam a mudança da coleta de urina nos controles e justificam "Durante o processo de solicitação de financiamento junto a FAPESP foi solicitado como revisão que não fosse coletado urina do grupo controle através de sonda de alívio. O que possivelmente seria realizado no mesmo ato anestésico de crianças submetidas a correção cirúrgica de criptorquidia ou fimose, em caso de não conseguir realizar a coleta por micção espontânea ou saco coletor destes pacientes. Deste modo, estes pacientes só serão incluídos no estudo se concordarem em participar e em caso de sucesso na coleta de urina ambulatorial através de saco coletor ou micção espontânea. Para conseguir atingir o número esperado de pacientes do grupo controle foi firmado uma parceria com o ambulatório de puericultura do Instituto da Criança do HCFMUSP. E pacientes deste ambulatório serão convidados a participar da pesquisa através da coleta de urina por micção espontânea ou saco coletor. Deste modo, foi adicionado um TCLE para

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.942.820

grupo controle. Foi apenas retirado o parágrafo que dizia o diagnóstico da criança que faria parte do grupo controle de modo a se adequar a este "novo" grupo controle".

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Avaliar o papel dos biomarcadores urinários no acompanhamento em crianças com estenose de JUP.

Objetivos secundários:

Estabelecer valores de referência para dosagem urinária de biomarcadores para população pediátrica em nosso meio.

Correlacionar biomarcadores urinários com recuperação da função renal após desobstrução em participantes com estenose de JUP e em participantes sem obstrução funcional, em comparação com métodos convencionais (DMSA, DTPA).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos para os participantes são mínimos e incluem o desconforto durante a coleta de urina. Não haverá benefícios diretos para os participantes, mas o resultado dos exames poderá ser muito útil para estabelecer protocolos de seguimento para as crianças com estenose de JUP.

O risco dos participantes não se altera com a emenda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa muito útil para o seguimento e intervenções nos participantes com estenose de JUP. Não houve alteração do protocolo de pesquisa, exceto na forma de coletar a urina dos controles, e a coleta de urina por saco coletar é de risco mínimo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE para controles, em linguagem clara e adequada para as modificações que irão ocorrer.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Estudo de prospectivo em uma coorte de participantes com diagnóstico de estenose de junção uretero-pélvica (JUP) confirmado por exames de imagem (US ou TC ou UE) demonstrando hidronefrose sem dilatação ureteral, cintilografia renal com DTPA evidenciando padrão obstrutivo,

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010

UF: SP Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.942.820

para avaliar o valor de marcadores urinários (NGAL, MMP2, MMP9, TIMP, KIM-1 e MMP12 no acompanhamento clínico e evolução destes participantes. As modificações que constam da emenda não alteram o risco dos participantes e não há impedimentos éticos para a sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_122271_1_E1.pdf	18/09/2018 10:53:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controleV2.docx	18/09/2018 10:39:01	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
Outros	reposta.pdf	20/02/2017 16:35:29	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Texto_tese.docx	28/01/2017 14:25:04	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle.docx	28/01/2017 14:23:42	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_clinico.docx	28/01/2017 14:23:32	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_cirurgico.docx	28/01/2017 14:23:18	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
Outros	CadastroOnLine14610.pdf	22/11/2016 11:01:07	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rostro.pdf	21/10/2016 15:21:37	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito
Outros	Brochura.docx	16/02/2016 15:51:11	ROBERTO IGLESIAS LOPES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.942.820

Não

SAO PAULO, 05 de Outubro de 2018

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA:

"AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES URINÁRIOS NO CONTROLE DO TRATAMENTO DE ESTENOSE DE JUNÇÃO URETEROPÉLVICA EM CRIANÇAS "

PESQUISADOR PRINCIPAL: Marcos Figueiredo Mello e Paulo Renato Marcelo ~~Moscardi~~

DEPARTAMENTO/INSTITUTO: Departamento de Cirurgia, Clínica urológica do Instituto Central do Hospital das Clínicas da FMUSP

O (a) senhor (a) e seu filho estão sendo convidados a participar de um estudo clínico para avaliar uma doença que afeta os rins, chamada Estenose de Junção ~~Ureteropélvica~~. Essa doença consiste em um estreitamento na saída de urina do rim, o que causa dilatação do sistema coletor de urina. Esse é um problema geralmente adquirido durante o desenvolvimento das crianças dentro do útero das mães de tal forma que a maioria das pessoas portadoras já nascem com tal doença. Esse entupimento para a saída de urina pode machucar e destruir o rim se não tratada. Alguns pacientes necessitam de correção cirúrgica e outros não.

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária nesta pesquisa, que visa estudar componentes na urina de pacientes com entupimento nas vias urinárias para descobrir se tais elementos podem ajudar a determinar o grau de sofrimento nos rins e ainda avaliar a necessidade de cirurgia e a resposta ao tratamento cirúrgico. Para a realização do projeto é necessário coletar urina para que a mesma seja estudada e tais elementos, chamados ~~biomarcadores~~, sejam dosados.

Caso o (a) senhor (a) ou o representante legal concorde em participar do estudo, dados da sua história clínica e alguns resultados de exames laboratoriais serão coletados do prontuário médico. Após ter sido indicado sua cirurgia para correção do estreitamento da junção ~~ureteropélvica~~, serão coletadas quatro amostras de urina ao longo do seu tratamento, todas em consultas agendadas realizadas no ambulatório de Urologia do Instituto Central do HC-FMUSP. A primeira coleta será realizada na consulta em que serão solicitados os exames pré-operatórios para agendamento da cirurgia. A segunda coleta será obtida 1 mês após a cirurgia, a segunda com 3 meses e a terceira após 6 meses. Essas coletas serão feitas no ambulatório e serão avaliadas em nossos laboratórios.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Tais coletas não irão interferir no seu tratamento (de seu filho), que será realizado por meio de uma cirurgia que é conhecida como ~~pieloplastia~~ ~~pieloplastia~~, que consiste na desentupimento da saída de urina pelo rim. Antes da realização da cirurgia serão colhidos exames de sangue por punção de veia do antebraço, será realizada ultrassonografia e cintilografia renal. Seu filho será ainda avaliado pela equipe da anestesia.

As coletas adicionais de urina não oferecem nenhum risco e nem acarretará nenhum prejuízo a sua saúde (de seu filho). Além disso, essa pesquisa não mudará em nada o seu tratamento ou os resultados da cirurgia (de seu filho), pois não será testado nenhum medicamento e nenhum tratamento novo. Caso haja necessidade, além do atendimento, o participante da pesquisa têm direito à indenização por eventos adversos relacionados diretamente à pesquisa (resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde)

Não há benefício direto para o participante do estudo. O (a) senhor (a) estará contribuindo para a pesquisa e para melhor entendimento de uma doença que pode levar a lesões irreversíveis aos rins de muitas pessoas. O acompanhamento do paciente incluído no protocolo de pesquisa será semelhante a qualquer outro atendido na divisão com seguimento ambulatorial mesmo no encerramento e/ou a interrupção da pesquisa

Não há despesas pessoais para o (a) senhor (a) em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. E o (a) senhor (a) têm o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas e poderá ver o resultado dos mesmos a qualquer momento. O pesquisador e sua equipe estão comprometidos a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

O participante receberá uma via do termo de consentimento.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Antes de concordar em participar, é importante que o (a) senhor (a) leia e entenda todas as explicações que estão a seguir sobre os procedimentos, os benefícios potenciais e os riscos envolvidos na participação na pesquisa. Por favor, peça para qualquer pessoa da equipe do estudo que explique qualquer palavra ou informação que não seja entendida de maneira bem clara. Não assine este termo de consentimento a não ser que o (a) senhor (a) tenha tido a oportunidade de fazer perguntas e de receber respostas que esclareçam todas as suas dúvidas. Se escolher assinar e participar, você assinará duas cópias deste documento e uma delas será entregue a você.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Marcos Figueiredo Mello e que pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 455 – Pinheiros, São Paulo-SP. CEP 05.403-000. Telefone(s): 2661-7990 ~~email:~~ marcos.mello@hc.fm.usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – ~~tel:~~ (11)2661-7585, 2661-1548, (11) 2661-1549; E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim descrevendo o estudo "AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES URINÁRIOS NO CONTROLE DO TRATAMENTO DE ESTENOSE DE JUNÇÃO URETEROPÉLVICA EM CRIANÇAS".

Eu, _____
responsável pelo(a) menor, _____
discuti com o Dr. Marcos Figueiredo Mello e/ou Dr. Paulo Renato Marcelo ~~Moscardi~~ sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ Data ____/____/____
Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data ____/____/____
Assinatura do responsável pelo estudo.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
