



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

ALZENIR RODRIGUES SOUZA

**AVALIAÇÃO METABOLÔMICA DO PLASMA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM ANEMIA FALCIFORME**

Salvador

2021

ALZENIR RORIGUES SOUZA

**AVALIAÇÃO METABOLÔMICA DO PLASMA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Professor Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus

Salvador

2021

ALZENIR RORIGUES SOUZA

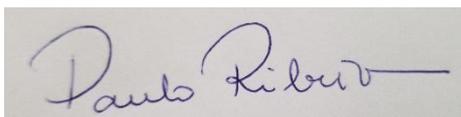
**AVALIAÇÃO METABOLÔMICA DO PLASMA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

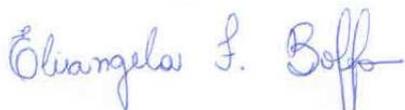
Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus

Co-orientadora: Profa. Dra. Elisangela Fabiana Boffo

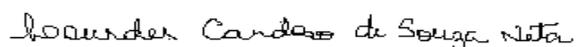
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus
Doutorado em Plant Biochemistry and Molecular Biology, Wageningen University – Holanda
- Universidade Federal da Bahia



Prof^a. Dr^a. Elisangela Fabiana Boffo
Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Universidade
Federal da Bahia



Prof^a. Dr^a. Lourdes Cardoso de Souza Neta
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Universidade do
Estado da Bahia



Prof. Dr. Carlos Daniel Silva da Silva
Doutorado em Química Inorgânica, Universidade Federal do Ceará (UFC) - Instituto Federal
de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

S729 Souza, Alzenir Rodrigues

Avaliação metabólica do plasma de crianças e adolescentes com anemia falciforme / Alzenir Rodrigues Souza – Salvador, 2021.

110 f.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química, 2021.

1. Anemia Falciforme. 2. Química Analítica. 3. Ressonância Magnética Nuclear. I. Jesus, Paulo Roberto Ribeiro de. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 543.2:615.155

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa Senhora por me darem força, perseverança e graça nesta caminhada.

Aos meus pais, Alice Rodrigues Souza e Antônio da Conceição Souza, pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis.

A minha família pela motivação e por acreditarem no meu trabalho.

Ao professor Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus por aceitar o convite para ser meu orientador realizando esta missão com maestria e carisma.

Agradeço aos professores Carlos Daniel Silva da Silva e Elisângela Fabiana Boffo por aceitarem o convite para composição dessa banca examinadora.

A todos os professores que me acompanharam nas disciplinas tanto obrigatórias como optativas.

Aos colegas pela troca de conhecimentos e experiências.

À Universidade Federal da Bahia - UFBA por abrir as portas a mim, favorecendo a conclusão do meu curso de mestrado. À Capes por tornar possível, com o seu apoio financeiro, a realização deste projeto.

A todos um abraço fraterno!

RESUMO

A anemia falciforme constitui um tipo de anemia em que a hemácia adquire a forma de foice, levando a vaso-oclusão, isquemia e inflamação; equivale a uma anemia hemolítica. Atinge uma parcela significativa da população brasileira, sendo necessária uma maior atenção para esta doença no ramo da pesquisa. A hidroxiureia é um medicamento eficaz no tratamento da anemia falciforme e melhora a qualidade de vida dos pacientes. Torna-se relevante a análise metabolômica voltada para esta doença, incluindo o estudo do metaboloma dos pacientes que utilizam este medicamento, já que o estudo das alterações do conjunto de metabólitos do plasma sanguíneo pode contribuir para o diagnóstico da doença e desenvolvimento terapêutico. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar a análise metabolômica do plasma de crianças e adolescentes divididos em três grupos: pacientes com anemia falciforme que não utilizam a hidroxiureia (SCD); pacientes com anemia falciforme que utilizam a hidroxiureia (SCD_HDU); e indivíduos que não possuem anemia falciforme (controle). O sangue foi coletado das referidas crianças e adolescentes na faixa etária de 6 a 18 anos, e as amostras de plasma sanguíneo foram liofilizadas e submetidas a precipitação de proteínas e subsequente análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H). Antes desta análise realizou-se a otimização de protocolo da aquisição de espectros, sendo selecionada a sequência de pulso Noesypr 1d, dentre as demais. Os espectros foram processados em diversas plataformas on-line de análises metabolômicas visando a identificação e a quantificação de metabólitos, bem como a realização das análises estatísticas multivariadas. Para tanto, utilizou-se o programa Chenomx suíte 8.4, e antes da quantificação foi feito o alinhamento de picos, ambos realizados no programa NMRProcFlow. As análises estatísticas multivariadas foram realizadas no programa MetaboAnalyst 2,0 e incluíram PLS-DA, validação cruzada, VIP scores e mapa de calor. Vinte e quatro metabólitos foram identificados, incluindo dez ácidos orgânicos, oito aminoácidos, além de outros compostos orgânicos. Através das análises estatísticas multivariadas foi possível comparar o conjunto de metabólitos dos grupos de participantes. A análise de PLS-DA revelou dissimilaridades no perfil metabólico do grupo controle e os grupos SCA e SCA_HDU. A análise dos três grupos resultou em oito metabólitos com VIP scores maiores ou iguais a 1, dentre os quais a leucina/isoleucina, prolina, ácidos graxos, creatina/creatinina, histidina, ácido 3-hidroxi-butírico, glicerol e acetona. De acordo com o mapa de calor, a leucina/isoleucina, prolina, ácidos graxos, creatina/creatinina e glicerol possuem maiores concentrações no grupo SCD_HDU, e a histidina, ácido 3-hidroxi-butírico e acetona possuem maiores concentrações no grupo controle. Este trabalho mostra a utilidade da análise metabolômica para a detecção de biomarcadores da anemia falciforme. Podem ser encontrados metabólitos com suas respectivas quantidades comparativas entre os grupos, característicos da anemia falciforme, bem como observadas as alterações do conjunto de metabólitos dos participantes, devido o uso da hidroxiureia. Os resultados descritos neste trabalho podem contribuir no diagnóstico e desenvolvimento terapêutico da doença, servindo como base para futuras investigações que envolvem o tema desta pesquisa.

Palavras-chave: Anemia Falciforme. Hidroxiureia. Metabolômica. Plasma Sanguíneo. Ressonância Magnética Nuclear.

ABSTRACT

Sickle cell anemia is a type of anemia in which the red blood cells take on a sickle shape, leading to vaso-occlusion, ischemia and inflammation. It affects a significant portion of the Brazilian population, which required greater attention for research purposes. Hydroxyurea is a drug that has effectively been used in the treatment of sickle cell anemia, improving the quality of life of patients. Metabolomics analysis focused on this disease is relevant, including the study of the metabolome of patients who use this drug, since the study of alterations in the set of blood plasma metabolites can contribute to the diagnosis of the disease and therapeutic development. In this context, the aim of this study is to carry out a metabolomics analysis of the plasma of children and adolescents divided into three groups: patients with sickle cell anemia who do not use hydroxyurea (SCD); patients with sickle cell anemia who use hydroxyurea (SCD_HDU); and individuals who do not have sickle cell anemia (control). Blood was collected from children and adolescents aged 6 to 18 years, and blood plasma samples were lyophilized and subjected to protein precipitation and subsequent analysis by Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen (^1H NMR). Before this analysis, the optimization of the spectra acquisition protocol was performed, with the Noesypr 1d pulse sequence being selected. The spectra were processed in several online metabolomics analysis platforms aiming at the identification and quantification of metabolites, as well as the performance of multivariate statistical analyses. For this purpose, the Chenomx suite 8.4 program was used, and before the quantification, the peak alignment was performed, both performed in the NMRProcFlow program. Multivariate statistical analyzes were performed using the MetaboAnalyst 2.0 program and included PLS-DA, cross validation, VIP scores and heat map. Twenty-four metabolites were identified, including ten organic acids, eight amino acids, and other organic compounds. Through multivariate statistical analysis it was possible to compare the set of metabolites of the groups of participants. The PLS-DA analysis revealed dissimilarities in the metabolic profile of the control group and the SCA and SCA_HDU groups. The analysis of the three groups resulted in eight metabolites with VIP scores greater than or equal to 1, including leucine/isoleucine, proline, fatty acids, creatine/creatinine, histidine, 3-hydroxybutyric acid, glycerol and acetone. According to the heat map, leucine/isoleucine, proline, fatty acids, creatine/creatinine and glycerol have higher concentrations in the SCD_HDU group, and histidine, 3-hydroxybutyric acid and acetone have higher concentrations in the control group. This work shows the usefulness of metabolomic analysis for the detection of sickle cell anemia biomarkers. Metabolites can be found with their respective comparative amounts between the groups, characteristic of sickle cell anemia, as well as changes in the group of metabolites of the participants, due to the use of hydroxyurea, can be observed. The results described in this work can contribute to the diagnosis and therapeutic development of the disease, serving as a basis for future investigations involving the subject of this research.

Keywords: Sickle Cell Anemia. Hydroxyurea. Metabolomics. Blood plasma. Nuclear Magnetic Resonance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Componentes do sangue
- Figura 2** Molécula de hemoglobina e um grupo heme
- Figura 3** Hemácia normal e em forma de foice
- Figura 4** Esquema resumido do fluxograma de trabalho envolvido na análise metabolômica após de finição do problema biológico. A) Metabolômica global. B) Metabolômica alvo
- Figura 5** A circulação de carga do núcleo do hidrogênio gera um dipolo magnético
- Figura 6** Dois níveis de energia dos núcleos de hidrogênio, como descrito pela mecânica quântica, em um campo magnético de magnitude B_o . N é a população nos estados de energia mais alta (N_β) e mais baixa (N_α). A direção do campo magnético (B_o) está para cima, paralelo à ordenada, e a intensidade do campo (B_o) aumenta para a direita. Campos B_o maiores aumentam ΔE
- Figura 7** Representação clássica de um núcleo de hidrogênio em precessão em um campo magnético de magnitude B_o , por analogia com um pião em precessão.
- Figura 8** Diagrama esquemático de um espectrômetro de RMN com transformações de Fourier e um magneto supercondutor
- Figura 9** Acetato de benzila em $CDCl_3$, 300 MHz
- Figura 10** Escala de RMN em 300 e 600 MHz.
- Figura 11** Acoplamento spin-spin entre grupos CH e CH_2 com deslocamentos químicos muito diferentes.
- Figura 12** Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: Noesypr 1d; número de scans: 64; proporção $CD_3OD:D_2O$ (μL): 500:200.
- Figura 13** Espectro de RMN da amostra PAM/003 referente a Identificação da Alanina, dubleto em 1,4715 ppm. Fórmula estrutural deste metabólito com hidrogênios correspondentes a absorção destacados de vermelho.

- Figura 14** Espectro de RMN da amostra PAM/003 referente as Identificações do Azelato, tripleto em 2,1529 ppm; Prolina, multipletto em 2,0128 ppm - 2,0694 ppm; e Acetato, singleto em 1,9092 ppm. Fórmulas estruturais destes metabólitos com hidrogênios correspondentes as absorções destacados de vermelho.
- Figura 15** Espectro da amostra PAM/003, pertencente ao grupo SCD_HDU, observado no intervalo de deslocamento químico de 0,0 ppm a 2,5 ppm. Identificação dos seguintes metabólitos: acetato (singleto; 1,9092 ppm), acetona (singleto; 2,2167 ppm), ácido 2-hidroxi-butírico (tripleto; 0,8932 ppm), alanina (dubleto; 1,4715 ppm), azelato (tripleto; 2,1528 ppm), citrato (dubleto; 2,4800 ppm), HDL/VLDL (singleto largo; 1,2732 ppm), lactato (dubleto; 1,334 ppm), leucina/isoleucina (tripleto; 1,1968 ppm), prolina (multipletto; 2,0128 ppm – 2,0694 ppm), valina (dubleto; 1,0608 ppm). Pico de referência: TMSP-d4 (0,0001 ppm).
- Figura 16** Picos de metabólito não identificado 1 desalinhados.
- Figura 17** Picos de metabólito não identificado 1 alinhados.
- Figura 18** Picos da Alanina (Dubleto; 1,4715 ppm) desalinhados
- Figura 19** Picos da Alanina (Dubleto; 1,4715 ppm) alinhados
- Figura 20** Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais – PLS-DA. Gráfico de escores de componente 1 *versus* componente 2, descrevendo 47,9 % da variância total dos dados. Similaridade e dissimilaridade dos grupos controle, SCD e SCD_HDU.
- Figura 21** Validação cruzada da PLS-DA dos grupos controle, SCD e SCD_HDU. Desempenho da acurácia, R^2 e Q^2 das componentes 1 e 2.
- Figura 22** VIP (variable influence on projection) scores. Metabólitos contributivos para a separação dos grupos controle, SCD, SCD_HDU na PLS-DA.
- Figura 23** Mapa de calor. Concentrações dos metabólitos nos grupos controle, SCD, e SCD_HDU, apresentadas através de um gradiente de cores, representado pela faixa de numeração de -1 a 1, onde a concentração é crescente
- Figura 24** Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais – PLS-DA. Gráfico de escores de componente 1 *versus* componente 2, descrevendo 47,4 % da variância total dos dados. Dissimilaridade dos grupos SCD e SCD_HDU

- Figura 25** Validação cruzada da PLS-DA dos grupos SCD e SCD_HDU. Desempenho da acurácia, R^2 e Q^2 das componentes 1 e 2.
- Figura 26** VIP (variable influence on projection) scores. Metabólitos contributivos para a separação dos grupos SCD e SCD_HDU na PLS-DA.
- Figura 27** Mapa de calor. Concentrações dos metabólitos nos grupos SCD e SCD_HDU, apresentadas através de um gradiente de cores, representado pela faixa de numeração de $-0,6$ a $0,6$, onde a concentração é crescente.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Tipos de número de spin nuclear, I, com várias combinações de massa e número atômico
- Tabela 2** Otimização do protocolo de ressonância magnética nuclear de plasma sanguíneo. A tabela mostra os diferentes parâmetros de aquisição dos espectros de RMN em diferentes proporções da mistura contendo metanol deuterado (CD₃OD) e água deuterada (D₂O).
- Tabela 3** Parâmetros de aquisição de espectros 1D NOESY.
- Tabela 4** Dados espectrais de RMN ¹H dos metabólitos identificados em amostras de plasma sanguíneo de crianças com anemia falciforme tratadas com hidroxiureia.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AF | Anemia falciforme |
| ANOVA | Análise de variância |
| AVC | Acidente vascular cerebral |
| CE-MS | Capillary electrophoresis – mass spectrometry) |
| cPCR | Reação em cadeia de polimerase convencional |
| CW | Onda contínua |
| DF | Doença falciforme |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DRC | Doença renal crônica |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FID | Decaimento livre da indução |
| FT | Transformação de Fourier |
| GC-MS | Gas chromatography – mass spectrometry |
| HbF | Hemoglobina fetal |
| HbS | Hemoglobina S |
| HbSS | Hemoglobina SS |
| HMDB | Human Metabolome Database |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Performance |
| HU | Hidroxiureia |
| ICAM-1 | Molécula de adesão intercelular-1 |
| IL-6 | Interleucina-6 |

| | |
|--------------------|--|
| KEGG | Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes |
| LBQM | Laboratório de Química Molecular |
| LC-MS | Liquid chromatography – mass spectrometry) |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| MAC-1 | Macrófago-1 |
| MCV | Volume médio de células |
| MSH | Estudo Multicêntrico de Hidroxiureia |
| MS/MS | Espectrometria de Massas/Espectrometria de Massas |
| MTD | Dose máxima tolerada |
| NIST | National Institute of Standards and Technology |
| NMR | Nuclear magnetic resonance |
| NMR-2D | Ressonância Magnética Nuclear em duas dimensões |
| PCR | Reação em cadeia de polimerase |
| PLS | Partial least squares |
| PLS-DA | Partial least squares discriminant analysis |
| RBCs | Glóbulos vermelhos |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RMN ¹ H | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| RT-PCR | Reação em cadeia de polimerase em tempo real |
| SCA | Anemia falciforme |
| SCD | Doença falciforme e grupo de participantes com anemia falciforme que não utilizam a hidroxiureia |
| SCD_HDU | Grupo de participantes com anemia falciforme que utilizam a hidroxiureia |
| SMDB | Serum Metabolome Database |
| TCD | Doppler transcraniano |

| | |
|---------|---|
| TCTH | Transplante de células-tronco hematopoiéticas |
| TMS | Tretametil-silano |
| TMSP-d4 | Trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado |
| VCAM-1 | Molécula de adesão celular vascular-1 |
| VIP | Variable influence on projection |
| VLDL | Lipoproteínas de muito baixa densidade |
| VOC | Crise vaso-oclusiva |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 19 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 3 | REFERENCIAL TEÓRICO | 20 |
| 3.1 | O SANGUE | 20 |
| 3.2 | ANEMIA FALCIFORME | 24 |
| 3.2.1 | Principais manifestações clínicas | 30 |
| 3.2.2 | Diagnóstico | 31 |
| 3.2.3 | Tratamento | 33 |
| 3.3 | HIDROXIUREIA | 34 |
| 3.4 | METABOLÔMICA | 40 |
| 3.5 | ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) | 47 |
| 3.5.1 | O espectrômetro de RMN | 52 |
| 3.5.2 | Deslocamento químico | 54 |
| 3.5.3 | Multipletos | 56 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 59 |
| 4.1 | SUJEITOS DA PESQUISA | 59 |
| 4.2 | COLETA DA AMOSTRA | 60 |
| 4.3 | LIOFILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS | 60 |
| 4.4 | ANÁLISE POR RMN | 61 |
| 4.4.1 | Preparação das amostras | 61 |
| 4.4.2 | Aquisição dos espectros de RMN | 62 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 4.4.3 | Identificação dos metabólitos | 63 |
| 4.4.4 | Análise metabolômica | 64 |
| 4.4.5 | Análises estatísticas | 64 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 66 |
| 5.1 | AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN | 66 |
| 5.2 | IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS | 68 |
| 5.3 | ALINHAMENTO DE PICOS DE RMN | 72 |
| 5.4 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 74 |
| 5.4.1 | Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais – PLS-DA dos grupos controle, SCD e SCD_HDU | 74 |
| 5.4.2 | Validação cruzada da PLS-DA dos grupos controle, SCD e SCD_HDU | 76 |
| 5.4.3 | VIP scores e Heat map dos grupos controle, SCD e SCD_HDU | 77 |
| 5.4.4 | Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais – PLS-DA dos grupos SCD e SCD_HDU | 83 |
| 5.4.5 | Validação cruzada da PLS-DA dos grupos SCD e SCD_HDU | 84 |
| 5.4.6 | VIP scores e Heat map dos grupos SCD e SCD_HDU | 85 |
| 5.5 | ALGUNS METABÓLITOS E A ANEMIA FALCIFORME | 89 |
| 6 | CONCLUSÃO | 91 |
| | REFERÊNCIAS | 94 |
| | APÊNDICES | 99 |

1 INTRODUÇÃO

A Avaliação Metabolômica dispõe de procedimentos para analisar compostos que também são encontrados no organismo humano, inclusive metabólitos presentes no plasma sanguíneo. Desempenha um papel fundamental para a análise do plasma sanguíneo de grupos de indivíduos detectando as alterações no metaboloma relacionadas com a anemia falciforme. Conforme Parise (2016), em 1949, Pauling e colaboradores descreveram a anemia falciforme como uma doença molecular, com dois outros grupos descrevendo-a de forma convincente como um transtorno hereditário.

O plasma sanguíneo pode sofrer alterações em sua composição química e, dessa forma, revelar as quantidades de metabólitos característicos da anemia falciforme. Podem ser observadas as modificações no metaboloma de indivíduos portadores da referida doença que fazem uso da hidroxiureia, um medicamento utilizado no tratamento.

Para Gowda (2008), evidências adicionais de pontos finais biológicos de doenças humanas são altamente desejadas para o diagnóstico de doenças, prognóstico e desenvolvimento terapêutico. Os estudos referentes às quantidades de metabólitos característicos de grupos de indivíduos que envolvem a anemia falciforme podem oferecer estas contribuições.

A AF é a doença hereditária de maior prevalência no país, afetando cerca de 0,1% a 0,3% da população negra, sendo observada também em decorrência da alta taxa de miscigenação em parcela cada vez mais significativa da população caucasiana brasileira. Estimativas indicam que 5% a 6% da população carrega o gene da Hemoglobina S (HbS) e que a incidência fica em torno de 700 – 1000 novos casos por ano. (ALMEIDA, 2017, p.131).

De acordo com Silva (2006), estima-se que no Brasil há mais de 2 milhões de portadores do gene da Hb S; desses, mais de 8 mil apresentam forma grave (SS). Kapoor (2018) afirma que em 2010, o número de recém-nascidos com DF homocigoto em todo o mundo foi de 305.800 e adverte que este número será aproximadamente 400.000 no ano de 2050. Conforme Silva (2006), a porcentagem

de mortalidade entre as crianças menores de 5 anos com anemia falciforme atinge de 25% a 30%. Assim, é necessário maior atenção para esta doença no ramo da pesquisa.

Segundo Agrawal (2014), a hidroxiureia tem muitas características de um medicamento ideal para a anemia falciforme e fornece benefício terapêutico através de múltiplos mecanismos de ação. Para este autor, a hidroxiureia emergiu como uma opção terapêutica importante para crianças e adolescentes com eventos vasculares recorrentes; documentos evidenciam benefícios de prevenção ou reversão de danos crônicos em órgãos. Diante disso, torna-se relevante o estudo do metaboloma do plasma dos pacientes falciformes que utilizam o referido medicamento, uma vez que podem ocorrer alterações no conjunto de metabólitos.

Este trabalho contempla capítulos específicos para o referencial teórico, materiais e métodos, e resultados e discussões.

No capítulo 3 encontra-se o referencial teórico com uma explanação sobre o sangue, a anemia falciforme com suas principais manifestações clínicas, diagnósticos e tratamento. No mesmo capítulo encontra-se uma abordagem sobre a hidroxiureia, a metabolômica, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), bem como o espectrômetro, deslocamento químico e multipletos.

O capítulo 4 faz uma abordagem sobre os materiais e métodos desta pesquisa, envolvendo sujeitos, coleta e liofilização das amostras, análises por RMN. É possível, ainda neste capítulo, apreciar por leitura a preparação das amostras, aquisição dos espectros de RMN e identificação dos metabólitos. Por fim, as análises metabolômicas e estatísticas.

Os resultados e discussões são apresentados no capítulo 5, com a identificação de metabólitos resultantes da análise de RMN, alinhamento de picos de RMN, análises estatísticas, Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais – PLS-DA dos grupos controle, SCD e SCD_HDU, Validação cruzada da PLS-DA dos grupos controle, SCD e SCD_HDU, VIP scores e Heat map dos grupos controle, SCD e SCD_HDU, Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais – PLS-DA dos grupos SCD e SCD_HDU, Validação cruzada da PLS-DA dos grupos SCD e SCD_HDU, VIP scores e Heat map dos grupos SCD e SCD_HDU, e alguns metabólitos e a anemia falciforme.

As amostras foram submetidas a alguns procedimentos anteriores à análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), técnica analítica

empregada em metabolômica. Para Silvertein (2007), a RMN ^1H é uma espectroscopia de absorção, onde na presença de um campo magnético a amostra absorve na região de radiofrequências em uma frequência que depende das características estruturais da amostra.

O espectro de hidrogênios em um campo magnético constante, obtido por varredura contínua (CW) ou pelo modo pulsado com transformações de Fourier (FT), é registrado como uma série de picos cujas áreas são proporcionais ao número de hidrogênios que eles representam. As áreas dos picos são medidas por um integrador eletrônico que traça uma linha em degraus cujas alturas são proporcionais às áreas dos picos. A contagem dos hidrogênios a partir da integração é útil para determinar ou confirmar fórmulas moleculares, detectar picos sobrepostos, determinar a pureza de amostras e efetuar análises quantitativas. (SILVERTEIN, 2007, p.130).

Os metabólitos foram identificados e quantificados após aplicação da técnica analítica, a qual passou pela otimização que, para a aquisição dos espectros, envolveu precipitação de proteínas. Neste conteúdo é mostrado, dentre outros sinais, o dubleto correspondente ao metabólito alanina que exemplifica as identificações realizadas no programa Chenomx suíte 8.4.

Antes da quantificação foi feito o alinhamento de picos de RMN ^1H , ambos utilizando o programa NMRProcFlow. Seguindo o planejamento experimental da análise metabolômica, foi realizada no programa MetaboAnalyst 2,0, as análises estatísticas. Estas incluem PLS-DA, Validação cruzada, VIP score e Heat map, para os três grupos de participantes e os grupos SCD e SCD_HDU.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a análise metabolômica do plasma de três grupos de crianças e adolescentes: participantes da pesquisa com anemia falciforme que não utilizam a hidroxiureia; participantes com anemia falciforme que utilizam a hidroxiureia; e participantes que não têm anemia falciforme.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Liofilizar as amostras de plasma.
- Remover as proteínas das amostras de plasma.
- Otimizar o protocolo de aquisição dos espectros de RMN ^1H .
- Realizar análise por RMN ^1H .
- Identificar os metabólitos.
- Alinhar os picos de RMN ^1H e quantificar os metabólitos.
- Realizar as análises estatísticas PLS-DA, Validação cruzada, Mapa de calor e VIP score.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O SANGUE

O tema discutido nessa pesquisa exige uma breve abordagem acerca do sangue, uma vez que o plasma sanguíneo constitui elemento de análise e de investigação por parte do referido trabalho para, dessa forma, buscar uma melhor compreensão sobre a temática em destaque, na tentativa de articular os conteúdos relacionados ao assunto em estudo.

Neste presente trabalho, por meio da metabolômica, é possível verificar as alterações na composição química do plasma sanguíneo de indivíduos acometidas pela anemia falciforme. Pois segundo Worley (2013), os metabólitos são o produto final de todos os processos celulares e são um resultado direto da atividade enzimática e proteica.

Como o sangue circula por todo o corpo, ele é o veículo ideal para o transporte de substâncias. As principais funções do sangue incluem o transporte de nutrientes provenientes do sistema gastrointestinal para todas as células do corpo e, subsequentemente, a retirada de produtos excretados por estas células para órgãos específicos, a fim de serem eliminados. Muitos outros metabólitos, produtos celulares (p. ex., hormônios e outras moléculas sinalizadoras) e eletrólitos são também carregados pela corrente sanguínea até os seus destinos finais. O oxigênio (O₂) é transportado pela hemoglobina no interior dos eritrócitos a partir dos pulmões para distribuição às células do organismo. (GARTNER, 2007, p. 455).

O sangue apresenta fundamental importância no organismo humano como sustentador da vida no que se refere ao transporte de variadas substâncias ou partículas, tais como o oxigênio, gás carbônico, nutrientes, excretas (metabólitos), anticorpos, hormônios, agentes de coagulação, entre outros; transportes estes que são essenciais e se estabelecem entre os mais variados e mesmo recônditos órgãos e tecidos do corpo humano, possibilitando às células obter nutrientes e secretar substâncias produzidas no metabolismo.

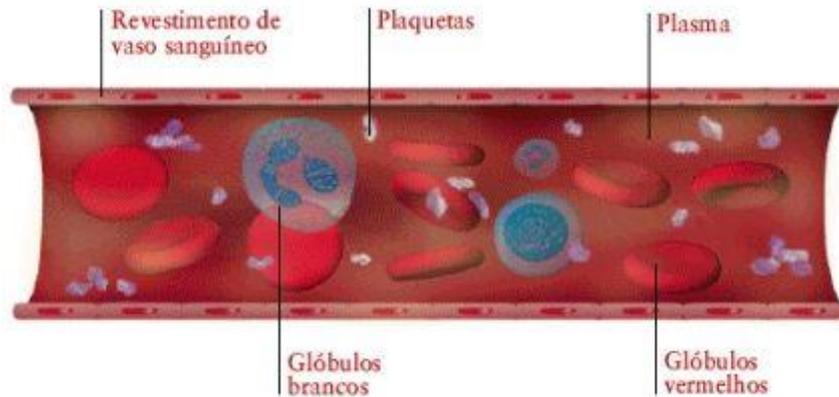
O sangue do ser humano, como de todos os mamíferos, contém uma série de células especializadas essenciais para a sobrevivência: Os eritrócitos, encarregados do transporte do oxigênio para os tecidos; as plaquetas que intervêm na coagulação e na integridade do tecido; e os leucócitos, que executam funções de defesa do host...O sangue circulante contém: 45% de elementos formados e 55% de plasma. Contém por mm^3 : 4,8-5,4 milhões de eritrócitos; 5000-10000 leucócitos; e 250000-400000 trombócitos. Os leucócitos incluem: 60%-70% de neutrófilos; 20%-25% de linfócitos; 3%-8% de monócitos; 2%-4% de eosinófilos; e 0,5%-1% de basófilos. (ATLAS DE HEMATOLOGÍA, 2002, p. 13).

Refere-se a um fluido constituído por uma parte celular correspondente aos glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos), glóbulos brancos (leucócitos) e plaquetas (trombócitos) e por outra parte líquida denominada de plasma. Ressalta-se que a parte celular representa 45% do volume sanguíneo, onde os glóbulos brancos e plaquetas representam um volume celular menor, quando comparado com o volume ocupado pelos glóbulos vermelhos. O plasma é composto por 90% de água e os restantes 10% são formados por proteínas, sais e outros compostos orgânicos dissolvidos e representa 55% do volume sanguíneo.

O plasma é uma solução aquosa contendo componentes de pequeno e de elevado peso molecular, que correspondem a 10% do seu volume. As proteínas plasmáticas correspondem a 7% e os sais inorgânicos, a 0,9%, sendo o restante formado por compostos orgânicos diversos, tais como aminoácidos, vitaminas, hormônios e glicose... As principais proteínas do plasma são as albuminas, as alfa, beta e gamaglobulinas, as lipoproteínas e as proteínas que participam da coagulação do sangue, como protrombina e fibrinogênio. (JUNQUEIRA, 2008, p. 222).

Diante disso, os glóbulos vermelhos e o plasma são os maiores constituintes do sangue (Figura 1). Para um indivíduo adulto e normal, estima-se por mL/kg de pessoa, no homem um volume de plasma de 43,5 mL, enquanto o volume de glóbulos vermelhos é de 33,0 mL. Já nas mulheres enquanto o volume de plasma é de 43,5 mL, o de glóbulos vermelhos é de 25,0 mL. A hemácia, em sua parte sólida, é formada em sua maior quantidade pela hemoglobina.

Figura 1 – Componentes do sangue



Fonte: <http://www.trabalhoscolares.net/a-composicao-do-sangue/>

O sangue está contido num compartimento fechado, o aparelho circulatório, que o mantém em movimento regular e unidirecional. O volume total de sangue numa pessoa normal é de aproximadamente 7% do peso corporal ou cerca de 5 L num indivíduo com 70 Kg de peso...O hematócrito permite estimar o volume de sangue ocupado pelos eritrócitos em relação ao sangue total. Os valores normais são de 35-49% na mulher e 40-54% no homem. (JUNQUEIRA, 2008, p. 221).

Apesar de sua complexidade e de sua importância, o sangue é um fluido biológico de fácil acesso e já é utilizado para examinar alterações no corpo humano por mais de 70 anos, inclusive com a detecção de muitos gases, íons e vários metabólitos encontrados no plasma que através da quantificação destes compostos químicos, poderá também detectar várias doenças de diversas ordens.

As análises do plasma e do soro sanguíneo são relevantes para detectar a existência de disfunções orgânicas, lesões de tecidos entre as mais diversas doenças, pois, devido a esses fatores, o plasma e o soro sanguíneo sofrem alterações em sua composição química.

O plasma é obtido a partir de uma amostra de sangue, se forem introduzidos anticoagulantes, simplesmente centrifugando a amostra e removendo ou decantando a porção mais flutuante (não celular). Se nenhum anticoagulante for adicionado e o sangue coagular, o fluido sobrenadante é chamado de soro, que é menos viscoso que o plasma e carece de fibrinogênio, protombina e outras proteínas de coagulação. (PSYCHOGIOS, 2011, p.1).

O volume do plasma varia em função do sexo, peso e altura do indivíduo e a viscosidade, que sofre influência da temperatura, se aproxima a 1,2 vezes à viscosidade da água. Na sua composição encontramos água, cátions, cloretos, fósforo, potássio, sódio, cálcio, nitrogênio, proteínas totais, albumina, globulinas, as proteínas que participam da coagulação do sangue, lipídeos totais, ácidos graxos totais, entre outros compostos. Quando desprovido das proteínas de coagulação do sangue, obtem-se o soro.

O plasma é um fluido amarelado no qual as células, plaquetas, compostos orgânicos e eletrólitos estão suspensos e/ou dissolvidos. Durante a coagulação, alguns dos compostos orgânicos e inorgânicos deixam o plasma para se tornar integrados ao coágulo. O líquido restante, o qual não contém mais aqueles componentes dissolvidos ou suspensos nele, difere do plasma, tem uma tonalidade amarelo-palha, e é conhecido como soro. O principal componente do plasma é a água, que constitui cerca de 90% do seu volume. As proteínas constituem 9%, e os sais inorgânicos, íons, compostos nitrogenados, nutrientes e gases constituem o 1% restante. (GARTNER, 2007, p. 457)

O plasma é um líquido amarelado que é obtido com a adição de anticoagulante na amostra de sangue, seguida de centrifugação, se tratando da porção mais flutuante. Com a centrifugação são separadas as células: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Quando não é adicionado anticoagulante e o sangue é deixado coagular, o fluido sobrenadante é chamado de soro, não contendo fibrinogênio, protombina e outras proteínas de coagulação.

O soro e o plasma são soluções aquosas, com aproximadamente 90% de água, contendo uma variedade de substâncias. Existem diversos estudos do soro e plasma na perspectiva de identificar o produto do metabolismo onde foram identificados e quantificados centenas de metabólitos séricos. Porém não existe um banco de dados central com todas essas informações e, para investigá-las, torna-se necessário o acesso aos diversos trabalhos científicos nos quais esses metabólitos foram objetos de estudos.

O Serum Metabolome Database (SMDB) resultante (<http://www.serummetabolome.ca>) é um recurso abrangente e acessível pela web contendo estes 4229 compostos séricos / plasmáticos confirmados e prováveis, suas concentrações correspondentes e links para associações de doenças que foram reveladas ou identificadas a partir destes esforços combinados de mineração experimental e literatura. (PSYCHOGIOS, 2011, p. 2).

Neste contexto, para facilitar futuras pesquisas em química e metabólica do sangue, é importante criar um banco de dados dos metabólitos detectáveis no sangue, plasma e soro humano, descrevendo suas respectivas concentrações e associações com doenças, bem como os principais referenciais teóricos e pesquisas que servirão de ferramentas para as conclusões obtidas.

A meta é, a partir de dados dos elementos de interesse em relação à metabólica do plasma, fazer uso da análise multivariada para obter embasamento científico que servirá de suporte para as conclusões deste trabalho.

3.2 ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é um assunto estudado pelos profissionais de saúde e demais áreas de conhecimento, incluindo a dimensão educacional e social. A maioria dos casos encontrados refere-se à população negra. De acordo com Ferreira (1999), consiste em uma doença hereditária, de incidência quase exclusiva em negros e seus descendentes.

Mas, o que vem a ser anemia falciforme? Antes de elucidar a questão, torna-se relevante observar a etimologia da palavra anemia, que é de origem grega *anaimia* e significa ausência de sangue; deficiência de hemácias ou hemoglobina no sangue circulante, causando debilidade e fraqueza dentre outros sintomas. Segundo Rey (1999), no campo da hematologia, a anemia é condição caracterizada pela redução da quantidade de hemoglobina funcional circulante total.

A anemia falciforme refere-se a um tipo de anemia em que a hemácia adquire a forma de foice. Conforme Silva (2006), é caracterizada por anemia hemolítica crônica, susceptibilidade aumentada às infecções e episódios vaso-oclusivos repetidos, associados às lesões orgânicas crônicas e crises dolorosas agudas.

Anemia falciforme – Hematol. 1. Doença natureza genética, frequente entre as populações de origem africanas, em que os pacientes apresentam hemoglobina S, isto é, com duas cadeias α normais e duas cadeias β mutantes. Nessas cadeias β , o glutamato (hidrófilo) na posição 6 encontra-se substituído por valina (hidrófoba), o que reduz grandemente a solubilidade da desoxi-hemoglobina S, levando-a a formar precipitados fibrosos que deformam os glóbulos vermelhos (hemácias falciformes). A doença só se manifesta em pacientes homocigotos com esse gene mutante. Os heterocigotos beneficiam-se disso, que os torna resistentes às infecções maláricas graves (devido ao fato de a vida mais curta dessas hemácias dificultar a produção dos plasmódios), razão pela qual esse caráter genético foi selecionado naturalmente nas regiões africanas de malária holoendêmica ou hiperendêmica. 2. O quadro clínico caracteriza-se por anemia crônica e suas complicações. *Sinon:* anemia depreanocítica; depreanocitose; anemia falciforme. *Inglês:* sickle cell anemia (or anaemia). (REY, 1999, p. 46).

A alteração do gene responsável pela hemoglobina implica na doença hereditária denominada de Anemia Falciforme (SCA). A primeira descrição médica da doença foi realizada pelo médico norte-americano James B. Herrick, em 1910 na África. No ano de 1949, E. A. Beet e J. V. Neel determinaram a origem genética. Seu nome refere-se ao fato de que as hemácias tomam uma forma de foice e a hemoglobina que apresenta a anormalidade molecular é chamada de hemoglobina S (HbS). A anemia falciforme é uma doença hereditária, que exige grande esforço da comunidade científica para buscar soluções na perspectiva de saber mais sobre esse transtorno.

Em 1949, Pauling e colaboradores descreveram a anemia falciforme como uma doença molecular, com dois outros grupos descrevendo-a de forma convincente como um transtorno hereditário. Detalhes da mutação (substituição do ácido glutâmico por valina na 6ª posição a hemoglobina [Hb] β -cadeia) foi descrita pela primeira vez por Ingram em 1956. (PARISE, 2016, p. 789).

Kapoor (2018) afirma que em 2010, o número de recém-nascidos com DF (doença falciforme) homocigoto em todo o mundo foi de 305.800 e adverte que este número será aproximadamente 400.000 no ano de 2050. Isto exige muito dos recursos globais de assistência à saúde. De acordo com Silva (2006), foi relatado que a porcentagem de mortalidade entre as crianças menores de 5 anos com anemia falciforme (AF) atinge de 25% a 30%. Esses dados enfatizam a importância da realização de diagnóstico precoce e instituição da terapia adequada para promover a redução nesse índice de morbimortalidade.

A AF é a doença hereditária de maior prevalência no país, afetando cerca de 0,1% a 0,3% da população negra, sendo observada também em decorrência da alta taxa de miscigenação em parcela cada vez mais significativa da população caucasiana brasileira. Estimativas indicam que 5% a 6% da população carrega o gene da Hemoglobina S (HbS) e que a incidência fica em torno de 700 – 1000 novos casos por ano. (ALMEIDA, 2017, p. 131).

Entre as doenças falciformes, a anemia falciforme é a que apresenta maior gravidade clínica e hematológica e maior prevalência. Conforme Silva (2006), estima-se que no Brasil há mais de 2 milhões de portadores do gene da Hb S; desses, mais de 8 mil apresentam forma grave (SS). Este autor ainda afirma que se avalia a ocorrência de setecentos a mil novos casos anuais de doenças falciformes, sendo, portanto, consideradas como importante problema de saúde pública.

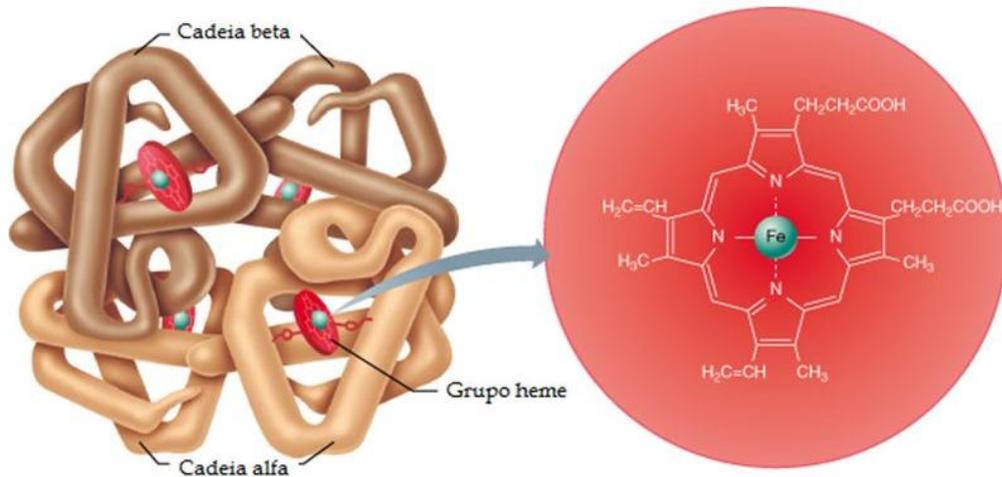
O gene S é originário da África e apresenta-se amplamente distribuído em todos os continentes, atingindo alta prevalência em população negra e seus descendentes. No Brasil, a distribuição da Hb S é heterogênea, sendo mais freqüente em regiões Norte e Nordeste. Esta variação regional está relacionada com a contribuição dos grupos étnicos formadores. (SILVA, 2006, p. 144).

Com massa molecular de 64500 dáltons, a hemoglobina possui na sua formação quatro cadeias de globina e quatro cadeias de heme. Este é constituído por uma porfirina ou protoporfina III que dispõe de quatro núcleos pirrol com pico azoto reunidos por pontes metano, oito cadeias laterais (metil, vinil ou ácido propiônico). O ferro no centro está fixado a quatro azoto do núcleo pirrol e guarda duas valências livres.

De forma mais específica, a globina é um conjunto de quatro cadeias polipeptídicas. E para cada molécula de hemoglobina (Figura 2), quatro cadeias são semelhantes duas a duas chamadas α e β para a hemoglobina A. Cada cadeia é um polipeptídeo, isto é, ela é constituída de aminoácidos (146 para a cadeia β e 141 para a cadeia α) reunidos por ligações peptídicas.

A hemoglobina, molécula presente nas hemácias, tem a função principal de transportar o oxigênio dos pulmões aos tecidos. Cada molécula de hemoglobina fixa quatro moléculas de oxigênio (O_2).

Figura 2 - Molécula de hemoglobina e um grupo heme

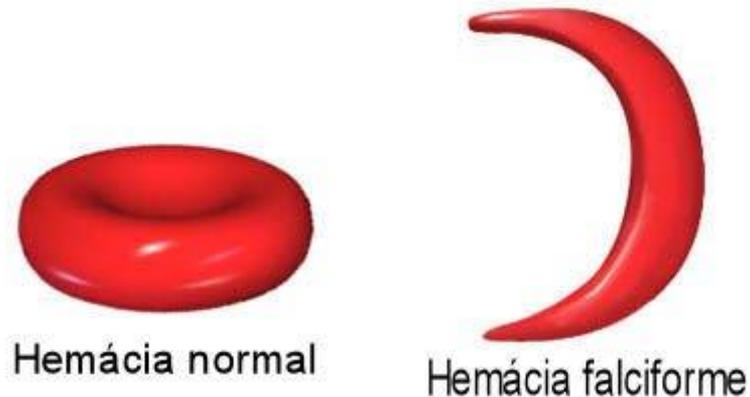


Fonte: <https://slideplayer.com.br/slide/10197295/>

A hemácia normal possui a forma de um disco bicôncavo, tem a forma circular regular e diâmetro de $7,5 \mu$ aproximadamente. De acordo com Lorenzi (1999), as hemácias em “foice” são mais rígidas e tendem a ficar estagnadas em órgãos onde a circulação é lenta. Com isso há anóxia relativa, que por sua vez, facilita a falcização de novas hemácias. A figura 3 ilustra a hemácia normal e em forma de foice.

As moléculas de HbS, por outro lado, quando desoxigenadas, se organizam em longos polímeros de filamentos duplos, que por sua vez se associam em feixes com um duplo filamento central rodeado de seis filamentos duplos de polímeros. Esses feixes de “cristais” dentro das hemácias podem ser vistos à microscopia eletrônica e determinam deformações das células. A deformação mais conhecida é provocada por feixes de polímeros se organizando mais ou menos paralelamente, dando à hemácia uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou “falcizada”, embora as hemácias anormais possam assumir um amplo espectro de alterações morfológicas. (ZAGO, 2007, p. 207).

Figura 3 - Hemácia normal e em forma de foice.



Fonte: <http://www.pcs.uem.br/drgenetica/hematologia-clinica/hemoglobinopatias/anemia-falciforme>

De acordo com Silva (2006), as consequências patológicas dos portadores de anemia falciforme fundamentam-se na polimerização da molécula de Hb S induzida por desoxigenação, com consequente afoçamento dos eritrócitos e aumento da viscosidade sanguínea. A anormalidade estrutural desta hemoglobina origina-se por uma mutação no gene da globina beta pela substituição da adenina por timina, codificando valina em lugar de ácido glutâmico na sexta posição da sequência de aminoácidos que compõe a cadeia polipeptídica beta (β). A Hb S no estado de baixa tensão de oxigênio sofre modificação em sua molécula devido à interação de natureza hidrofóbica da valina com a fenilalanina da posição 85 e com a leucina da posição 88, desencadeando a formação de polímeros em um processo de nucleação e criando uma estrutura multipolimérica.

Múltiplos mecanismos fisiopatológicos contribuem para as manifestações clínicas da DF. Sob condições de baixa tensão de oxigênio, a HbS polimeriza nos glóbulos vermelhos (RBCs) e forma hastes alongadas que alteram a reologia dos RBC. A polimerização da hemoglobina S é inicialmente reversível, mas ciclos repetidos de desoxigenação/reoxigenação causam alterações nas propriedades da superfície das hemácias, danos à membrana e hemólise. A conformação alterada das hemácias leva a vaso-oclusão, isquemia e inflamação. Os reticulócitos que contêm hemoglobina S são mais aderentes e podem prender as hemácias deformadas mais antigas nas vênulas pós-capilares, onde a tensão de oxigênio é menor. As interações patológicas entre o endotélio vascular, leucócitos e plaquetas também contribuem para a patologia da DF. Atividade endotelial aumentada de E e P-selectina, molécula de adesão intercelular RBC 4 e molécula de adesão celular basal / atividade luterana, adesão de leucócitos, ativação de plaquetas, e a depleção do óxido nítrico (NO) contribui para lesão vascular aguda e crônica e dor. Os esforços contínuos de desenvolvimento de medicamentos visam esses mecanismos. (KAPOOR, 2018, p. 1810).

Além das alterações presentes na hemoglobina das células, ocorrem modificações na membrana: fosforilação anormal; anomalia da bomba Na/K; o aumento da auto-oxidação, o que aumenta a fagocitose por parte dos macrófagos tissulares. Em ambiente com insuficiência de oxigênio, os eritrócitos falcizados também apresentam lesões de membrana que são responsáveis por perda de potássio e de água para o meio extracelular, resultando na desidratação dos mesmos.

A hemólise dos glóbulos vermelhos falciformes (RBCs) libera heme que esgota o óxido nítrico (NO) e causa a ativação de monócitos, desencadeando a ativação endotelial. O aumento da atividade da E-selectina endotelial e P-selectina resulta na adesão de leucócitos. Além disso, a expressão aumentada da molécula de adesão intercelular eritrocitária (ICAM) 4 liga-se à integrina $\alpha V\beta 3$ endotelial e a integrina $\alpha M\beta 2$ ativada expressa por leucócito (MAC-1) retém os glóbulos vermelhos contendo hemoglobina S, levando à adesão e consequente oclusão de vaso. As terapias antiadesivas podem diminuir a adesão. (KAPOOR, 2018, p. 1812).

Os fenômenos vaso-oclusivos são responsáveis pelos sintomas muito dolorosos característicos da “crise de falcização”. A vaso-oclusão é decorrente da presença física de grande número de eritrócitos falcizados no interior de pequenos vasos, além de depender de vários outros fatores. Por volta do ano 2000 foi citado que estes fatores são: aderência anormal dos eritrócitos ao endotélio; aderência a

este de seguidos neutrófilos “anormalmente” estimulados; alteração da superfície endotelial; presença de moléculas de adesão (VCAM-1, molécula de adesão celular vascular 1; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; E e P-selectinas), que permitem a aderência dos eritrócitos e neutrófilos ao endotélio; e citocinas (IL-6) do plasma que também estimulam a aderência.

3.2.1 Principais manifestações clínicas

A vaso-oclusão origina vários processos inflamatórios que estão inter-relacionados e ocorrem simultaneamente. Constitui um fenômeno em que as hemácias falciformes e os leucócitos são aderidos no endotélio vascular, as paredes internas dos vasos sanguíneos, impedindo a passagem do sangue nos pequenos vasos. Isto pode causar hipóxia, ou seja, a diminuição do oxigênio no sangue arterial ou nos tecidos e infarto tecidual.

De acordo com Almeida (2017), a forma crônica da doença é caracterizada pela inflamação recorrente no processo de vaso-oclusão. Ocorre: aumento da viscosidade sanguínea, que diminui o fluxo e, conseqüentemente, diminui a oxigenação do sangue; aumento na quantidade de hemácias falcizadas em baixas concentrações de oxigênio; o aumento de lesões teciduais e aumento da fagocitose dos eritrócitos.

Na anemia falciforme ocorre a diminuição da quantidade de hemácias que circulam no sangue. As hemólises constantes das hemácias falciformes, isto é, seus rompimentos, levam à redução da concentração de hemoglobina no sangue e diminuição anormal do volume do sangue de um indivíduo.

O quadro de anemia ocorre quando há diminuição no número de hemácias circulantes no sangue. As hemácias falciformes do indivíduo que tem AF são hemolisadas constantemente, diminuindo a concentração sanguínea de hemoglobina. As reduções rápidas na concentração de hemoglobina dão origem às crises aplásticas. A grande quantidade de hemólise na AF causa o sequestro esplênico, que aumenta o volume do baço e agrava o quadro de anemia e hipovolemia. A autoesplenectomia ocorre quando o sequestro esplênico das hemácias é recorrente, tornando-o fibrótico e calcificado... Os pacientes de AF possuem maior propensão a infecções causadas por micro-organismos no trato respiratório, como pneumonia, meningite, otite média, entre outras. Os pacientes de AF também podem apresentar: síndrome torácica aguda, episódios de crise de dor, priapismo, úlceras de perna e insuficiência múltipla dos órgãos. (ALMEIDA, 2017, p. 132).

De acordo com Ilesanmi (2010), danos crônicos de órgãos implicam em lesões crônicas de órgãos: crises de sequestro esplênico, necrose papilar aguda nos rins, complicações oftalmológicas, necrose avascular (necrose óssea asséptica) e complicações pulmonares.

3.2.2 Diagnóstico

A visualização da depreanocitose eritrocitária, isto é, o aumento de hemácias falcizadas, no sangue total, característico da anemia falciforme, pode ser fornecida pelo hemograma completo por observação no microscópio óptico. Os índices hematimétricos, ou seja, os parâmetros de avaliação do tamanho das hemácias e de distribuição de hemoglobina nestas, e a contagem leucocitária, determinantes na evolução da doença, são informações complementares fornecidos pelo aparelho automatizado de hemograma.

A anemia falciforme é considerada grave quando o RDW (índice relacionado ao tamanho eritrocitário) está acima de 19%, apesar de apresentar CHCM (concentração de hemoglobina na hemácia) normal. A presença de leucocitose (aumento leucocitário) indica aumento de hemólises, processo pelo qual os monócitos destroem as hemácias através da fagocitação. (ALMEIDA, 2017, p. 133).

A medula óssea é responsável pela fabricação dos elementos figurados do sangue periférico: hemácias, leucócitos e plaquetas. Devido ao aumento da

hemólise, acontece na medula óssea, o aumento da fabricação dos reticulócitos, eritrócitos prematuros, que é uma característica da anemia falciforme. A contagem de reticulócitos pode ser feita manualmente através da microscopia ótica ou por aparelho automatizado.

No teste de falcização em caso positivo, os eritrócitos adquirem a conformação falciforme e igualmente ao teste de solubilidade são usadas lâmina e lamínula. São técnicas da biologia molecular. Uma vez que as hemoglobinas normais são solúveis, o teste de solubilidade está baseado na insolubilidade da desoxihemoglobina S, molécula sem oxigênio. Na amostra de sangue sobre a lâmina são colocadas substâncias redutoras de oxigênio. Assim, este torna-se ausente nas hemácias acarretando a falcização. Estes testes não são indicados para recém-nascidos, os quais possuem quantidade de HbF (hemoglobina fetal) maiores que as quantidades de HbS.

Testes confirmatórios da presença de HbS após exames de triagem são recomendados, dentre eles: eletroforese alcalina, que é eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose; eletroforese ácida, que é eletroforese de hemoglobina em agarose e dosagem de hemoglobina fetal. A eletroforese da hemoglobina proporciona a identificação dos tipos de hemoglobina presente no sangue. Avalia com exatidão a ocorrência da anemia falciforme.

A Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), técnica usada na biologia molecular, detecta anomalias da hemoglobina além de realizar quantificação de variantes. A Focalização isoeétrica permite a identificação da hemoglobina, sendo uma técnica quantitativa e qualitativa. Esses métodos são mais modernos, atualmente utilizados, mais precisos e eficazes.

Existe ainda o diagnóstico feito pela PCR, reação em cadeia de polimerase, que é uma técnica de alto custo, qualitativa, pela qual é detectado o gene. Têm-se a PCR convencional, cPCR e PCR em tempo real, RT-PCR. O teste do pezinho (teste de solubilidade) e a eletroforese de hemoglobina, a qual está sendo substituída atualmente pela focalização isoeétrica e HPLC são feitos em neonatos.

3.2.3 Tratamento

Segundo Kapoor (2018), a hidroxiuréia foi o primeiro medicamento aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para o tratamento de SCD homocigoto. Este medicamento mostra um efeito eficaz, uma vez que inibe a polimerização da hemoglobina S, aumenta a produção de hemoglobina fetal (HbF) dentre outros efeitos. Além da hidroxiureia, a decitabina, pomalidomida, panobinostat e outros, aumentam a produção da hemoglobina fetal. Alguns agentes antifalciformes atuam por outros mecanismos ou por mecanismos desconhecidos.

Conforme a fisiopatologia da doença falciforme, novas drogas foram desenvolvidas dirigidas à adesão celular, inflamação, lesão oxidante, plaquetas e/ou coagulação, tônus vascular e polimerização da hemoglobina, que estão em ensaios clínicos e pré-clínicos. Kapoor (2018) afirma que a L-glutamina foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA em 2017 para prevenir episódios de dor aguda da SCD em pacientes com 5 anos de idade ou mais. Esta droga diminui a lesão oxidante dos glóbulos vermelhos.

Avanços adicionais em nossa compreensão da fisiopatologia subjacente da SCD contribuem para o desenvolvimento de novas e interessantes terapias direcionadas para prevenir e tratar complicações da SCD. Drogas que inibem a adesão celular, reduzem lesões oxidativas, danos à membrana e hemólise ou aumentam a biodisponibilidade de NO estão em ensaios clínicos, assim como novas estratégias de edição de genes que incorporam modificação e transplante autólogo de células-tronco. (KAPOOR, 2018, p. 1811).

Ensaio clínico investiga o uso dos agentes anti-falciformes: SCD-101 e Nicosan (ou Niprisan). Dentre as terapias estão: terapia de transfusão a longo prazo; transplante de células-tronco hematopoiéticas que proporciona a cura da doença falciforme; terapia de genes; terapia Antioxidante: L-glutamina, *N*-acetilcisteína, ácido α -lipóico e L-acetilcarnitina.

A goma arábica, os ácidos graxos ômega-3 e a curcumina são outros agentes antioxidantes que diminuem o estresse oxidativo na doença falciforme. Existem ainda Inibidores da P-selectina e pan-selectina: imunoglobulina intravenosa, heparina e

propranolol. Estudos são necessários para determinar definitivamente a ação eficaz dos agentes antiplaquetários nos pacientes da doença falciforme.

Procedimentos que diminuem os sintomas da doença são adotados como: uso de fármacos como o 5-azicitidina, suplementação com arginina, fito medicamentos, transfusões sanguíneas regulares, medicamentos quelantes de ferro e introdução da hidroxiureia. Como os portadores da anemia falciforme são suscetíveis às infecções, é importante que estes sejam submetidos à vacinação contra as principais doenças.

Apesar de uma longa história de conhecimento da causa genética da doença falciforme (DF), o progresso no desenvolvimento de tratamentos para prevenir crises vaso-oclusivas dolorosas e a outra miríade de sintomas associados tem sido, até recentemente, decepcionantemente lento... Apesar dessas descobertas iniciais, a expectativa de vida dos pacientes com células falciformes só começou a melhorar significativamente nos últimos 30 anos, primeiro com a introdução da penicilina profilática V nos anos 80, seguida por transfusões de sangue mais agressivas e, em 1998, com a introdução de hidroxiureia como suporte principal do tratamento. (PARISE, 2016, p. 789).

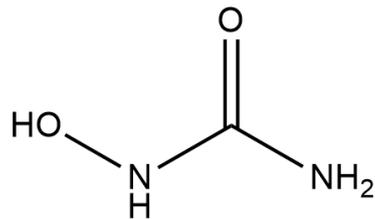
A hidroxiureia e a transfusão de sangue são as únicas terapias para complicações agudas e crônicas da doença falciforme. A única cura é o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Está em investigação a terapia gênica como uma grande estratégia de cura.

Pesquisadores têm atuado em busca de novas compreensões para os sintomas da doença anemia falciforme, em uma visão celular, plasmática e genética, o que tem aumentado nos últimos anos. Assim são almejadas novas drogas e curas no ramo da genética.

3.3 HIDROXIUREIA

A hidroxiureia (HU) mostrou ser um medicamento eficaz no tratamento da anemia falciforme, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Segundo Agrawal (2014), a hidroxiureia tem muitas características de um medicamento ideal para a

anemia falciforme (SCA) e fornece benefício terapêutico através de múltiplos mecanismos de ação. A hidroxiureia eleva a produção de hemoglobina fetal (HbF), diminui a polimerização da hemoglobina S (HbS), impede a formação de eritrócitos falciformes e evita crises vaso-oclusivas (VOC), sendo que o quadro clínico melhora antes da produção de HbF, sugerindo a ocorrência de outros eventos. Tem a seguinte fórmula estrutural:



Entretanto, a melhora clínica ocorre antes do incremento da HbF, sugerindo a possibilidade de mecanismos concorrentes. Inclui (1) redução do número de glóbulos brancos, plaquetas e contagem de reticulócitos; (2) redução da adesividade das células falciformes mediada por uma menor expressão das moléculas de adesão superficial; (3) indução da produção de óxido nítrico (NO); e (4) aumento do volume celular de eritrócitos falciformes. (SILVA-PINTO, 2013, p. 239).

O aumento do volume médio de células (MCV) acontece antes da expansão das células F (células portadoras de HbF), durante as primeiras quatro a seis semanas de uso de HU. Este parâmetro hematológico está relacionado com a diminuição dos episódios de VOC e melhora clínica.

A terapia de hidroxiureia apresenta bastante eficácia no tratamento de crianças e adultos com anemia falciforme. Vários mecanismos potenciais de ação da hidroxiureia levam à indução de HbF e benefícios adicionais. Este medicamento deve ser oferecido principalmente para pacientes jovens, antes do desenvolvimento de complicações crônicas e danos aos órgãos.

Os estudos iniciais de prova de princípio foram seguidos por estudos prospectivos de fase 1/2, demonstrando eficácia em adultos afetados, adolescentes e crianças e, mais recentemente, bebês e crianças pequenas. O estudo multicêntrico patrocinado pela Fase 3 do Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue do estudo da hidroxiureia demonstrou eficácia clínica na prevenção de eventos vaso-oclusivos agudos em adultos gravemente afetados. Com base nessa experiência cumulativa, a hidroxiureia emergiu como uma opção terapêutica importante para crianças e adolescentes com eventos vaso-oclusivos recorrentes; documentos de evidências recentes sustentaram benefícios a longo prazo com prevenção ou reversão de danos crônicos em órgãos. (AGRAWAL, 2014, p. 91).

A inibição da ribonucleotídeo redutase talvez seja o mecanismo de ação mais importante. Esta enzima está envolvida na transformação de ribonucleósidos em desoxirribonucleósidos que servem como blocos de construção para a síntese de DNA. A hidroxiureia reduz os pools de trifosfato de desoxinucleotídeo intracelular e atua como um agente específico da fase S, que é quando as células estão em fase de síntese do DNA, com inibição da síntese de DNA e eventual citotoxicidade.

A HU, em uso desde os 1960, considerada como um agente citotóxico, mutagênico, recombino gênico e antineoplásico, atua na fase S do ciclo celular com ação específica na ribonucleotídeo redutase, interferindo assim na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos e impedindo a divisão celular. (SILVA, 2006, p. 146).

A hidroxiureia inibe diretamente a subunidade ribonucleotídeo redutase M2, mas a regeneração espontânea da enzima ativa ocorre quando a hidroxiureia é removida. Por esse motivo, os efeitos in vivo da hidroxiureia na ribonucleotídeo redutase são previsivelmente transitórios, resultantes da rápida absorção, metabolismo e excreção da hidroxiureia em sistemas de mamíferos.

A hidroxiureia é um inibidor da ribonucleósido difosfato redutase usado pela primeira vez como terapia citorrredutora para doenças mieloproliferativas. A hidroxiureia aumenta a produção fetal de Hb (HbF; $\alpha_2\gamma_2$) e diminui a polimerização intracelular de HbS, um efeito que é sustentado com o uso a longo prazo, mas é reversível na descontinuação do medicamento. A descoberta de que a hidroxiureia aumenta os níveis de HbF levou a testes iniciais do medicamento em pacientes com HbSS. Os benefícios celulares secundários da hidroxiureia para pacientes com DF homozigoto incluem a diminuição da contagem de leucócitos, plaquetas e reticulócitos e alterações na expressão celular, inflamatória e da molécula de adesão que reduzem a adesão e a inflamação celular patológicas. (KAPOOR, 2018, p. 1812).

A hidroxiureia, quando na administração de uma dose diária, apresenta efeito na cinética e na fisiologia do processo de produção de eritrócitos (eritropoiese) e leva ao recrutamento de progenitores eritróides com níveis aumentados de HbF.

Além disso, este medicamento reduz a produção de neutrófilos e reticulócitos. A diminuição da contagem de leucócitos é potencialmente terapêutica, pois um leucograma elevado está relacionado à morbimortalidade da AF. Os neutrófilos causam a oclusão de vasos por adesão vascular e a expressão da superfície dos receptores desta adesão pode ser diminuída pela hidroxiureia.

Os eritrócitos sofrem inúmeras alterações durante o aumento da dose de hidroxiureia para a dose máxima tolerada (MTD), como um aumento de volume dos glóbulos vermelhos (macrocitose), aumento da hemoglobina corpuscular média, melhor hidratação, menos hemólise e menos formas falciformes. O fluxo sanguíneo é melhorado, com uma concentração mais alta de hemoglobina e níveis mais baixos de LDH (lactato desidrogenase) e bilirrubina.

Os efeitos deletérios, devido a uma concentração mais alta de hemoglobina, causando maior viscosidade do sangue, não parecem clinicamente relevantes. Pois são compensados pelo aumento da hidratação e deformabilidade celular, diminuição da adesividade e reologia geral melhorada.

A molécula de hidroxiureia passa por processos metabólicos desconhecidos que podem liberar frações de NO, uma molécula que promove efeito benéfico no endotélio, como vasodilatação local, e pode ajudar a compensar o seu consumo relacionado à hemólise. Isto pode colaborar para explicar a melhora clínica logo após iniciar o tratamento com hidroxiureia, antes de atingir o MTD com indução máxima de HbF.

A hidroxiureia é facilmente absorvida após administração oral. Somente no período compreendido entre 1 e 4 horas após uma dose oral é possível observar os

níveis plasmáticos máximos. Ao adotar doses crescentes, as concentrações plasmáticas seguem desproporcionalmente segundo observações realizadas. Sua distribuição no corpo ocorre de forma rápida. Não foi possível descrever os efeitos dos alimentos na absorção da hidroxiuréia por falta de dados.

Esta medicação é concentrada em leucócitos e eritrócitos. Vias metabólicas não totalmente caracterizadas realiza a conversão de até 50% de uma dose oral. Em uma via menor, a hidroxiuréia pode ser degradada pela urease encontrada nas bactérias intestinais. A excreção deste fármaco nos seres humanos pode ocorrer pelo metabolismo hepático e também pela excreção renal de primeira ordem.

Entre os preditores publicados de gravidade clínica, a quantidade de hemoglobina fetal (porcentagem de HbF) é o parâmetro laboratorial mais crítico. HbF é protetor contra a gravidade clínica; um baixo percentual de HbF está associado a um maior risco de desenvolver complicações vasculares, lesão de órgãos e morte precoce. Consequentemente, a indução farmacológica da HbF é um objetivo lógico do tratamento na SCA, e revisões recentes se concentraram nesse tópico. Um aumento da contagem de leucócitos também foi associado a maus resultados clínicos e, mais recentemente, elevação da desidrogenase sérica de lactato (LDH, refletindo hemólise intravascular) foi associada à morbimortalidade na SCA. A hidroxiureia emergiu como um agente terapêutico emocionante devido à sua facilidade de administração oral, perfil de toxicidade modesto, eficácia laboratorial previsível para aumentar a porcentagem de HbF e reduzir a hemólise e eficácia clínica comprovada na prevenção de eventos vasculares agudos. (AGRAWAL, 2014, p. 92).

Na década de 1990 o tratamento HU nos adultos portadores de células falciformes teve sua eficácia comprovada por meio de um estudo multicêntrico randomizado. Foi verificado que a HU promove uma série de benefícios nos pacientes que fazem o seu uso tais como redução de episódios dolorosos, tempo de internação e número de transfusões de hemácias e proporcionar uma redução na ocorrência de novos episódios de síndrome torácica aguda.

Estudos em adultos e crianças que apoiam o uso da hidroxiureia no SCD homocigoto levaram à aprovação da FDA de hidroxiureia para adultos há quase 20 anos e para crianças em 2017. O Estudo Multicêntrico de Hidroxiureia (MSH) de 1995 foi um estudo randomizado e controlado por placebo de hidroxiureia em adultos com HbSS. No MSH, aqueles tratados com hidroxiureia tiveram menos crises dolorosas e síndromes torácicas agudas (2,5 vs 4,5 crises por ano e 25 vs 51, respectivamente; $P < 0,001$), exigiram menos transfusões de sangue (usadas em 48 vs 73 pacientes; $P = .001$) e experimentou menos mortalidade geral a longo prazo (redução de 40%; $P = 0,04$) em comparação com pacientes controle que receberam placebo. Com base nos resultados do MSH, o FDA aprovou a hidroxiureia para adultos com doença por HbSS. (KAPOOR, 2018, p. 1812).

Recentemente encontramos dados de estudos observacionais e randomizados que indicam o uso da hidroxiureia em crianças. As informações anteriores apoiavam o uso a longo prazo em crianças com mais de 18 meses. As Diretrizes do Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue, em 2014, afirmam que os adultos devem iniciar tratamento com a hidroxiureia quando apresentarem doenças graves, que tenham mais de três crises de dores anualmente, que possuam história de SCA grave ou recorrente ou com dor crônica sintomática que afeta a qualidade de vida. Esta mesma medicação deve ser disponibilizada para crianças com SCA a partir dos nove meses de vida. Nos Estados Unidos, provavelmente, esta última recomendação está associada ao aumento da prescrição de hidroxiureia.

O Ensaio Clínico Pediátrico de Fase III da Hidroxiureia (BABY HUG) foi um estudo multicêntrico de hidroxiureia da fase 3, controlado por placebo, em crianças (9 a 18 meses) com HbSS. O BEBÊ HUG não alcançou seus objetivos principais: não houve diferença na função esplênica ou renal em crianças tratadas com placebo versus hidroxiureia. No entanto, a hidroxiureia diminuiu significativamente as crises dolorosas, a dactilite e a frequência e duração da hospitalização, sem resultar em toxicidade significativa. (KAPOOR, 2018, p. 1813).

Segundos relatos, o uso a longo prazo de hidroxiureia reduz a mortalidade bem como previne e trata disfunções orgânicas e, além disso, é responsável pela redução de eventos dolorosos e hospitalização de crianças e adultos. As funções esplênicas são preservadas nos bebês. É eficaz clinicamente em crianças que possuem proteinúria, danos nos órgãos, disfunção do baço, hipoxemia, hipertensão pulmonar, hiperfiltração glomerular, atraso neurocognitivo, infartos cerebrais

silenciosos, velocidades elevadas de Doppler transcraniano (TCD), prevenção primária e secundária de AVC. Além disto, nos jovens, o uso da hidroxiureia de rótulo aberto tem relação com um bom desenvolvimento no crescimento, maturação sexual, melhora do impacto familiar e combate os eventos vaso-oclusivos.

As barreiras proeminentes incluem (1) efeitos adversos, como erupção cutânea, alopecia, descoloração das unhas, dor de cabeça, náusea e ganho de peso, preocupações não resolvidas pela diminuição da fertilidade (especialmente nos homens) e teratogenicidade; (2) decidir o momento ideal para o início do tratamento em crianças; na Europa, preocupações com os efeitos desconhecidos e pouco estudados da hidroxiureia, incluindo infertilidade e carcinogênese, limitam a prescrição de hidroxiureia a crianças com doença grave; (3) desconforto do prescritor e atraso no início da terapia para pacientes elegíveis; (4) baixa adesão do paciente a um regime ao longo da vida; e (5) falta de evidências de alta qualidade para uso em pacientes com SCD variante (heterozigotos compostos) que compreendem um terço de todos os pacientes com SCD. (KAPOOR, 2018, p. 1814).

Pacientes com Doença Falciforme que começaram tratamento de hidroxiureia desde a infância deverão ser acompanhados a longo prazo visando esclarecer estudo realizado na Califórnia que obteve resultados de risco no desenvolvimento de leucemia (que está relacionado à idade) duas vezes maior (nestes pacientes tratados com hidroxiureia) quando comparado à população em geral.

3.4 METABOLÔMICA

A Metabolômica, parte integrante das ciências ômicas e utilizada em biologia de sistemas, é definida, segundo Clish (2015), como a análise abrangente de metabólitos em uma amostra biológica. A proposta da biologia de sistemas é efetuar estudo sobre como os processos biológicos de um organismo em sua totalidade são afetados pelas interações entre biomoléculas. As ciências ômicas analisam os sistemas biológicos por inteiro, reunindo diferentes áreas do conhecimento, como a bioquímica, genética, fisiologia e computação.

As abordagens anteriormente utilizadas em biologia molecular e fisiologia para adquirir informações biomoleculares e funcionais, respectivamente, forneceram dados limitados, impedindo a caracterização de um sistema biológico de forma completa e integrada. Assim o desenvolvimento das estratégias ômicas revolucionou esta área científica, e hoje em dia são utilizadas extensivamente em biologia de sistemas.

As ciências ômicas buscam o entendimento do funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. Fazem parte deste conjunto de ciências, a genômica (estudo da alteração dos genes), a transcriptômica (estudo das alterações dos transcritos), a proteômica (estudo das alterações das proteínas), e a metabolômica (estudo das alterações dos metabólitos). Metabólitos são produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica. O conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular (até 1500 Da), presentes ou alterados em um sistema biológico, é chamado de metaboloma (do inglês, metabolome). A pesquisa relacionada a metabólitos vem sendo desenvolvida há décadas, mas em 1999, Nicholson et al. definiram a metabonômica (do inglês, metabonomics), como sendo a medida quantitativa da resposta metabólica de um sistema biológico após estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas. Já o termo metabolômica (do inglês, metabolomics) foi introduzido em 2001, por Oliver Fiehn, como sendo a análise abrangente e quantitativa do metaboloma de um sistema biológico. (CANUTO, 2018, p.75).

Nas ciências ômicas, as biomoléculas estudadas podem estar contidas em um tecido biológico, célula, fluido ou organismo, e os dados gerados são avaliados por ferramentas de bioestatística e bioinformática. Dentre estas ciências estão: a genômica, a transcriptômica, a proteômica, e a metabolômica. Em décadas atrás, como resultado de pesquisa, a metabolômica foi definida, relacionada com metabolôma, um conjunto de metabólitos. Estes referem-se a moléculas que têm propriedades diferentes e estão incluídos entre eles os ácidos orgânicos polares que são muito solúveis em água.

Os metabólitos têm sido descritos como repórteres proximais da doença, porque sua abundância em espécimes biológicos geralmente está diretamente relacionada a mecanismos patogênicos (Gerszten e Wang 2008) e esse conceito é demonstrado rotineiramente nos resultados do laboratório de química clínica. Historicamente, muitas vezes uma década ou mais pode passar entre a descoberta inicial de um marcador de doença, sua validação em testes em humanos e sua implementação rotineira como teste clínico. Para realizar o potencial da medicina de precisão, precisamos acelerar a descoberta de marcadores específicos da farmacodinâmica de doenças e medicamentos, bem como perfis de metabólitos associados ao ambiente externo e suas associações com o risco de doença. (CLISH, 2015, p.3).

Através da metabolômica, podem ser avaliadas as alterações nas quantidades de metabólitos endógenos de uma amostra biológica como células, tecidos ou fluidos. Os resultados dos procedimentos metabolômicos podem indicar a ocorrência de uma doença, função genética e toxicidade de drogas. Os biomarcadores presentes nas amostras possibilitam a caracterização das patologias existentes, revelam o efeito de um medicamento e refletem eventos biológicos. As informações obtidas na análise metabolômica têm a finalidade de diagnóstico e prognóstico.

Além disso, a literatura nos apresenta outras denominações envolvendo esse campo da ciência, tais como: perfil metabólico (do inglês, *metabolic profiling*), descrito como sendo a análise de metabólitos previamente selecionados de rotas bioquímicas específicas, a impressão digital metabólica (do inglês, *metabolic fingerprinting*), que é definida como sendo “uma classificação de amostras de acordo com sua origem ou sua relevância biológica”, e, por último, análise *footprinting* (ainda sem tradução para o português), para se referir aos metabólitos excretados por uma célula em condições controladas. (CANUTO, 2018, p. 75).

O progresso de técnicas analíticas e da bioestatística ocorrido no transcorrer dos anos 80 contribuiu de forma significativa para o avanço do estudo dos perfis metabólicos, favorecendo pesquisas científicas no campo da química no que se refere às descobertas em prol da humanidade.

Os grupos de amostras são comparados de maneira que seja compreendido o fenótipo de um organismo. O metabolôma alterado pela genética, tratamento terapêutico ou por outros elementos, caracteriza o grupo teste. O grupo controle refere-se ao grupo não alterado.

Cabe ressaltar que essas abordagens sempre se referem a medidas comparativas entre grupos de amostras. A comparação do metaboloma de um grupo sujeito a alterações ambientais ou genéticas, alimentares, de tratamento terapêutico, etc. (grupo teste), com um grupo de indivíduos não alterados (grupo controle) pode fornecer informações importantes no que diz respeito ao entendimento do fenótipo de um organismo, desempenhando um papel fundamental na biologia de sistemas. (CANUTO, 2018, p. 75).

As análises metabolômicas, em suas abordagens, podem ser classificadas como: metabolômica alvo, também chamada direcionada e em inglês, targeted metabolomics; e metabolômica global ou não direcionada, em inglês, untargeted metabolomics. A metabolômica alvo envolve a análise quantitativa de um ou mais metabólitos conhecidos de vias metabólicas específicas.

A abordagem global baseia-se na análise qualitativa de um grande número de metabólitos de várias classes químicas. Segundo Schrimpe-Rutledge (2016), a interpretação biológica dos dados metabolômicos e, finalmente, os estudos de biologia de sistemas depende da capacidade de identificar com precisão os metabólitos, para que possam ser mapeados para vias e redes.

Em geral, as abordagens direcionadas visam identificar e quantificar um número limitado (dezenas a centenas) de metabólitos conhecidos, como os comumente encontrados em análises clínicas. Muitas abordagens não direcionadas, ou geradoras de hipóteses, concentram-se na aquisição de dados para o maior número possível de espécies, anotando metabólitos e revisando alterações metabólicas conhecidas e desconhecidas. (SCHRIMPE-RUTLEDGE, 2016, p.3).

A metabolômica vem sendo aplicada em diferentes áreas do conhecimento, como análises clínicas, alimentos e nutrição, esportes, ambiental, toxicologia forense, ou análise de organismos patológicos (parasitas, bactérias, fungos), entre outras. De acordo com Worley (2013), a metabolômica tem sido usada para identificar biomarcadores de doenças, para auxiliar na descoberta de medicamentos e para estudar plantas, bactérias, nutrição e o meio ambiente, entre inúmeras outras aplicações.

A metabolômica tem proporcionado um aumento na compreensão, em nível molecular, de diversas patologias. Inúmeras são as áreas de aplicações clínicas e o número de publicações relacionado ao tema cresce a cada dia, especialmente no que tange à detecção de biomarcadores, o desenvolvimento de novos tratamentos, diagnóstico, etc. (CANUTO, 2018, p. 79).

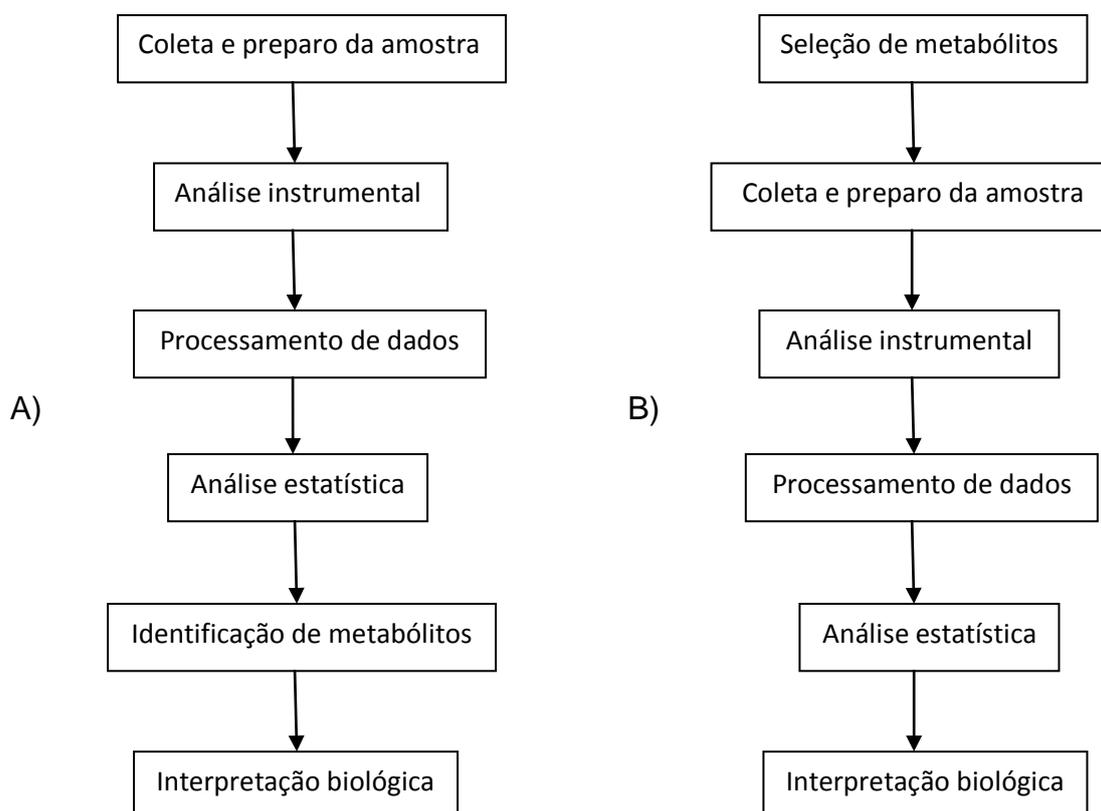
No fluxograma de trabalho encontra-se uma série de etapas para o desenvolvimento dos estudos metabolômicos. Nestes estudos é definido previamente um problema biológico por meio de questionamentos que devem ser respondidos no final. A partir da escolha da abordagem metabolômica, global ou alvo, definem-se as etapas do planejamento experimental e análise, decisões interrelacionadas. O resultado final é influenciado pelo comando de todo o experimento.

A segunda etapa do fluxograma de trabalho, o planejamento experimental, que está expresso na figura 4, envolve: a escolha do tipo de amostra que pode ser um fluido biológico, célula, tecido, etc.; a definição do número de amostras que serão avaliadas em cada grupo estudado; e como essas amostras serão coletadas e armazenadas antes de nova manipulação.

Um passo importante, geralmente realizado durante a coleta das amostras, é chamado de *quenching* metabólico, que se refere à interrupção imediata da atividade enzimática, através da adição de solventes orgânicos resfriados, ou do congelamento imediato das amostras com uso de gelo seco ou nitrogênio líquido. As amostras coletadas devem ser devidamente armazenadas, para evitar degradação ou ativação de enzimas; isso pode ser alcançado estocando-se as amostras a baixas temperaturas ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ é usualmente preferida). (CANUTO, 2018, p. 76).

As técnicas analíticas mais usadas em metabolômica são a ressonância magnética nuclear (NMR, nuclear magnetic resonance) e a espectrometria de massas (MS, mass spectrometry), importantes instrumentos analíticos que oferecem informações estruturais de vários grupos químicos.

Figura 4 - Esquema resumido do fluxograma de trabalho envolvido na análise metabolômica após definição do problema biológico. A) Metabolômica global. B) Metabolômica alvo.



Fonte: CANUTO, Gisele A. B. - **Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas**. Química Nova, Vol. 41, No. 1, 75-91.

Até o momento, as duas principais abordagens técnicas para a geração de dados metabolômicos são ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS; Fuhrer e Zamboni, 2015). A RMN é uma técnica espectroscópica rápida e altamente reproduzível, baseada na absorção e reemissão de energia dos núcleos atômicos devido a variações em um campo magnético externo (Bothwell e Griffin, 2011). Dependendo dos núcleos atômicos sendo direcionados pelo campo magnético aplicado, diferentes tipos de dados metabolômicos são gerados. (ALONSO, 2015, p. 1).

A GC-MS (gas chromatography - mass spectrometry) é uma das técnicas de análise mais empregadas em estudos metabolômicos. Atualmente, a LC-MS (liquid chromatography - mass spectrometry) vem sendo cada vez mais aplicada nos estudos, envolvendo análises metabolômicas. A CE-MS (capillary electrophoresis -

mass spectrometry) vem sendo usada como técnica complementar a LC-MS e GC-MS.

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que adquire dados espectrais na forma de uma razão massa / carga (m/z) e uma intensidade relativa dos compostos medidos. Para o espectrômetro gerar os sinais de picos para cada metabólito, a amostra biológica precisa primeiro ser ionizada. Os compostos ionizados resultantes de cada molécula irão gerar diferentes padrões de pico que definem a impressão digital da molécula original. (ALONSO, 2015, p. 2).

No tratamento de dados do estudo metabolômico global, são aplicadas etapas de alinhamento, agrupamento, correção do tempo de retenção e de linha de base, deconvolução espectral, e normalização. Atualmente diversos softwares estão disponíveis para o tratamento de dados nas análises metabolômicas. O resultado da análise metabolômica alvo acontece pela quantificação dos metabólitos pré-selecionados. Para uma quantificação mais precisa são utilizados padrões internos e padrões marcados isotopicamente. Os métodos de análise multivariada e univariada utilizados nas análises estatísticas diferenciam os grupos de amostras, classificando e discriminando os metabólitos.

São aplicados métodos não supervisionados, como análise de componentes principais (PCA, do inglês, *principal component analysis*), e métodos supervisionados, como análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, *partial least squares discriminant analysis*), e projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês, *orthogonal partial least squares discriminant analysis*). Já nas análises univariadas, as variáveis de estudo (entidades ou metabólitos) são avaliadas separadamente e, ao contrário dos métodos multivariados, são desprezadas as relações entre elas. Testes estatísticos como ANOVA, teste t de Student, ou de Mann-Whitney U, são frequentemente utilizados. (CANUTO, 2018, p. 77).

Para a identificação de metabólitos nos estudos globais são empregadas bibliotecas comerciais como a NIST (National Institute of Standards and Technology). Para determinação putativa dos metabólitos, buscas são feitas em base de dados pública online HMDB (Human Metabolome Database), Metlin, MassBank, etc. A confirmação é feita pela análise metabolômica em fluxo com o uso

de compostos marcados isotopicamente ou análise NMR-2D ou MS/MS para elucidação de estrutura, além de adição por *spiking* de padrões analíticos às amostras.

Na interpretação biológica ocorre a busca das respostas das questões formuladas no início do fluxograma de trabalho e o surgimento de novas hipóteses. Os metabólitos alterados são correlacionados com rotas metabólicas, utilizando-se bibliotecas como KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), MetaCyc, MetaboLights, entre outras. Recomenda-se uma validação biológica para confirmar a interpretação dos efeitos bioquímicos. Assim, são elaborados novos experimentos com novas amostras e estas são submetidas à análise metabolômica. Após a análise metabolômica global, pode ser feita adicionalmente a análise metabolômica alvo.

As informações relativas às vias bioquímicas são de grande importância para que aconteça o estabelecimento de novas medidas terapêuticas ou de prevenção. Para que haja a descoberta de associações inéditas com marcadores de doenças, é necessário que seja estudado e traçado o perfil metabólico, bem como as ferramentas de bioinformática. Assim, esses marcadores podem evidenciar procedimentos fisiopatológicos na DF como afirma Elsherif:

Os biomarcadores disponíveis da DRC não fornecem informações sobre as vias bioquímicas causais subjacentes, limitando a descoberta de novas medidas terapêuticas ou preventivas. O perfil metabólico e as ferramentas de bioinformática para estudá-los podem auxiliar na descoberta de novas associações com marcadores de doenças que revelam caminhos fisiopatológicos na DF. (ELSHERIF, 2018, p. 620).

3.5 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) possibilita a identificação e quantificação de metabólitos. É uma forma de espectroscopia de absorção em um campo magnético, no qual uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências (rf) com uma frequência dada pelas características estruturais da amostra e sua absorção depende do núcleo da molécula. Um espectro

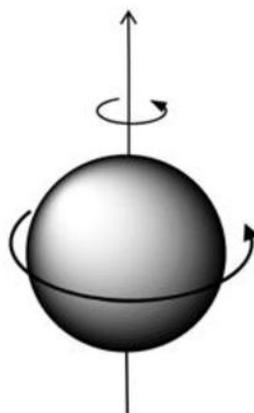
de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades.

A NMR é uma técnica simples, robusta e abrangente, que requer pouca ou nenhuma manipulação de amostra, podendo ser analisadas amostras biológicas intactas (sólidos e semi-sólidos). Tem a vantagem de precisar de pouca quantidade de amostra e não destruir a mesma após análise, apesar de contaminá-la com solventes deuterados. Em contrapartida, apresenta baixa sensibilidade e seletividade, apresentando regiões espectrais com sobreposição de sinais, comprometendo a interpretação dos resultados; além disso, são necessários equipamentos de alta resolução. (CANUTO, 2018, p. 77).

A carga dos núcleos girando em torno de um eixo nuclear (Figura 5), em alguns casos, gera um dipolo magnético ao longo do eixo. O momento angular da carga em movimento pode ser descrito em termos do número de spin I , que pode assumir os valores 0, $1/2$, $3/2$ etc. Se um núcleo não gira em torno do seu eixo temos $I = 0$.

Muitos núcleos atômicos têm a propriedade chamada *spin*: os núcleos comportam-se como estivessem girando. Na verdade, qualquer núcleo atômico que tenha massa *ímpar* ou número atômico *ímpar*, ou ambos, tem um *momento angular de spin* e um momento magnético. (PAVIA, 2010, p. 101).

Figura 5 – A circulação da carga do núcleo do hidrogênio gera um dipolo magnético.



Fonte: SILVERTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed. LTC.

A magnitude do dipolo é uma função do momento magnético μ . A tabela 1 abaixo mostra uma relação entre o número de spin I , a massa atômica e o número atômico de alguns núcleos.

Tabela 1 – Tipos de número de spin nuclear, I , com várias combinações de massa e número atômico.

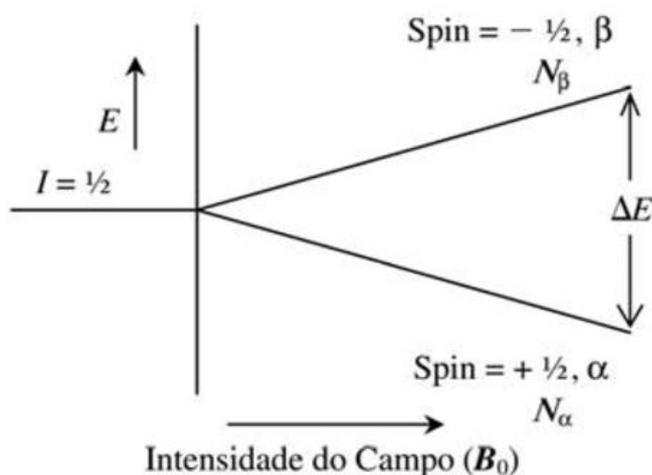
| I | Massa Atômica | Número Atômico | Exemplos de Núcleo |
|--------------|----------------------|-----------------------|--|
| Meio inteiro | Ímpar | Ímpar | ${}^1_1\text{H}(\frac{1}{2})$, ${}^3_1\text{H}(\frac{1}{2})$, ${}^{15}_7\text{N}(\frac{1}{2})$, ${}^{19}_9\text{F}(\frac{1}{2})$, ${}^{31}_{15}\text{P}(\frac{1}{2})$ |
| Meio inteiro | Ímpar | Par | ${}^{13}_6\text{C}(\frac{1}{2})$, ${}^{17}_8\text{O}(\frac{1}{2})$, ${}^{29}_{14}\text{Si}(\frac{1}{2})$ |
| Inteiro | Par | Ímpar | ${}^2_1\text{H}(1)$, ${}^{14}_7\text{N}(1)$, ${}^{10}_5\text{B}(3)$ |
| Zero | Par | Par | ${}^{12}_6\text{C}(0)$, ${}^{16}_8\text{O}(0)$, ${}^{34}_{16}\text{S}(0)$ |

Fonte: SILVERTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed. LTC.

Assim, obtém-se com facilidade o espectro de determinados núcleos que possui $1/2$ como número de spin, e um exemplo é ${}^1_1\text{H}$, ${}^3_1\text{H}$, ${}^{13}_6\text{C}$, ${}^{15}_7\text{N}$, ${}^{19}_9\text{F}$, ${}^{31}_{15}\text{P}$. Então, temos que a distribuição de carga esférica é uniforme conforme figura 6. Dentre esses, os mais amplamente utilizados na espectrometria de RMN são ${}^1_1\text{H}$.

No caso de núcleos com spin $1/2$ (Figura 6), existem dois níveis de energia com um pequeno excesso de população dos hidrogênios no estado de energia mais baixo ($N_\alpha > N_\beta$), de acordo com a distribuição de Boltzmann. Os estados são identificados como α ou β ou como $1/2$ e $-1/2$, onde ΔE é dado por $\Delta E = (h\gamma/2\pi)\mathbf{B}_o$ em que h é a constante de Plank, o que significa apenas que ΔE é proporcional a \mathbf{B}_o (Figura 6), uma vez que h , g e p são constantes. A intensidade do campo magnético é dada por \mathbf{B}_o .

Figura 6 – Dois níveis de energia dos núcleos de hidrogênio, como descrito pela mecânica quântica, em um campo magnético de magnitude B_0 . N é a população nos estados de energia mais alta (N_β) e mais baixa (N_α). A direção do campo magnético (B_0) está para cima, paralelo à ordenada, e a intensidade do campo (B_0) aumenta para a direita. Campos B_0 maiores aumentam ΔE .



Fonte: SILVERTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed. LTC.

Após estabelecer os dois níveis de energia para o núcleo de hidrogênio, pode-se introduzir a energia na forma de radiofrequência ν_1 , de modo a induzir a transição entre esses níveis de energia em um campo magnético estacionário de intensidade B_0 . A equação fundamental da RMN, que correlaciona a radiofrequência aplicada ν_1 com a intensidade do campo magnético, é

$$\nu_1 = (\gamma/2\pi)B_0$$

uma vez que

$$\Delta E = h\nu_1$$

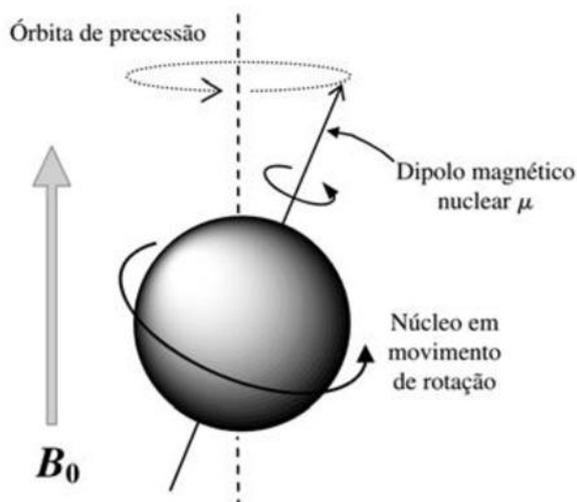
A radiofrequência ν_1 é medida em megahertz MHz e para o hidrogênio, a frequência é de 100 MHz em um campo magnético B_0 igual a 2,35 T. Nesta proporção, temos um sistema em ressonância e a energia é absorvida pelo hidrogênio, alcançando um nível elevado resultando o espectro. Por isso é usado o nome espectroscopia de ressonância magnética nuclear. A constante γ , a razão magnetogírica, é uma constante nuclear fundamental. A razão magnetogírica é a constante de proporcionalidade entre o momento magnético μ , e o número de spin I .

$$\gamma = 2\pi\mu/hI$$

A energia de radiofrequência ν_1 pode ser introduzida pela varredura de onda contínua (CW) da faixa de frequências ou por um pulso de radiofrequências que cobre a faixa de interesse. Os dois métodos correspondem a dois tipos diferentes de espectrômetro de RMN.

O problema, agora, é como transferir a energia eletromagnética (rf) para os hidrogênios alinhados segundo um campo magnético estacionário e como medir a energia absorvida quando o hidrogênio passa para o estado de maior spin. Isso pode ser mais bem explicado em termos de mecânica clássica. Imaginemos o hidrogênio girando em um campo magnético externo. O eixo magnético do núcleo de hidrogênio terá um movimento de precessão ao redor do eixo z do campo magnético B_0 , de maneira análoga à do pião (ou um giroscópio) sob a influência do campo gravitacional (Figura 7).

Figura 7 – Representação clássica de um núcleo de hidrogênio em precessão em um campo magnético de magnitude B_0 , por analogia com um pião em precessão.



Fonte: SILVERTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed. LTC.

Para entender a natureza de uma transição nuclear de *spin*, é útil a analogia com um brinquedo muito conhecido: o pião. Prótons absorvem energia porque começam a mudar de direção em um campo magnético aplicado. O fenômeno da precessão é similar ao de um pião. Por causa da influência do campo gravitacional da terra, o pião começa a cambalear, ou mudar de direção, sobre seu eixo. Um núcleo girando, sob a influência de um campo magnético aplicado, comporta-se da mesma maneira. (PAVIA, 2010, p. 105).

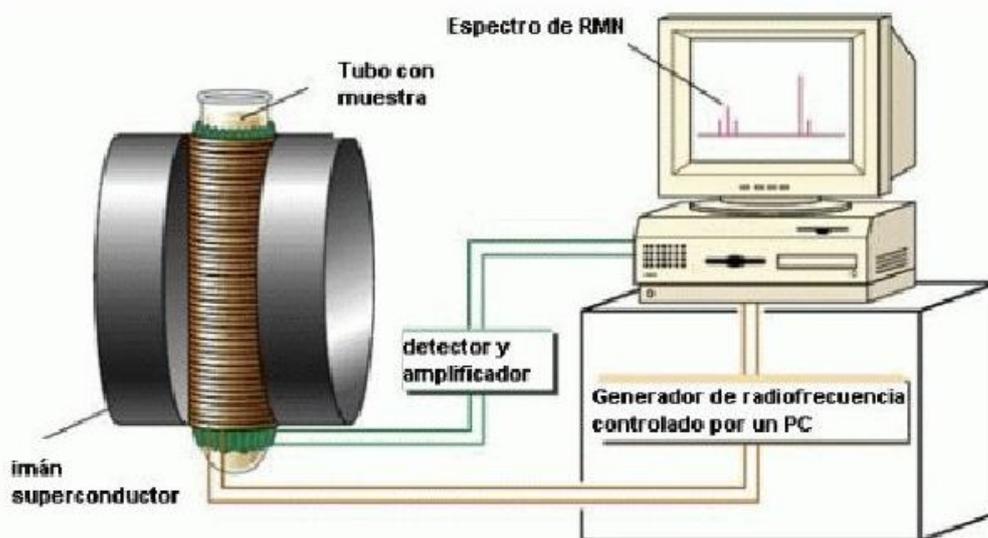
Existem dois processos de “relaxação”. O processo de relaxação longitudinal, ou processo spin-rede, caracterizado pela constante de tempo T_1 , envolve a transferência de energia do núcleo que está no estado de maior energia (“excitado”) para as moléculas mais próximas que estão vibrando nas frequências apropriadas. A relaxação transversa, ou relaxação spin-spin, é caracterizada pela constante de tempo T_2 e envolve a transferência de energia de um núcleo para outro, tendo como resultado o espalhamento (defasagem), que causa perda de sinal e alargamento do sinal de absorção.

3.5.1.O espectrômetro de RMN

Em 1953 apareceu o primeiro instrumento comercial de RMN. A necessidade de resolução e sensibilidades maiores levou ao desenvolvimento de instrumentos de 300 a 600 MHz, hoje muito disseminados. Todos os instrumentos acima de 100 MHz baseiam-se em magnetos supercondutores (solenóides) resfriados com hélio e operam no modo pulsado com transformações de Fourier (FT, Figura 8). Os outros requisitos básicos, além dos campos altos, são: a estabilidade, a homogeneidade do campo de radiofrequências e uma interface computadorizada.

No caso do espectrômetro com onda contínua (CW), a amostra é colocada em um campo magnético e irradiada por uma lente varredura da faixa de frequências de interesse. O espectro resultante é obtido pelo registro da energia absorvida em função da frequência. No espectrômetro pulsado, a amostra é colocada no campo magnético e irradiada com um pulso de energia de radiofrequência de alta potência que atinge uma faixa de frequências suficiente para cobrir a região de interesse. Esse pulso excita simultaneamente todos os núcleos da amostra. Imediatamente após o pulso, os núcleos excitados começam a voltar ao estado fundamental e a irradiar energia. Um detector coleta a energia emitida e produz o decaimento livre da indução (FID), que é a soma da radiação de todos os núcleos durante o tempo da emissão. A informação contida no FID, que é função do tempo, é convertida (transformação de Fourier, FT) em um espectro convencional, que é função da frequência. (SILVERTEIN, 2007, p. 124).

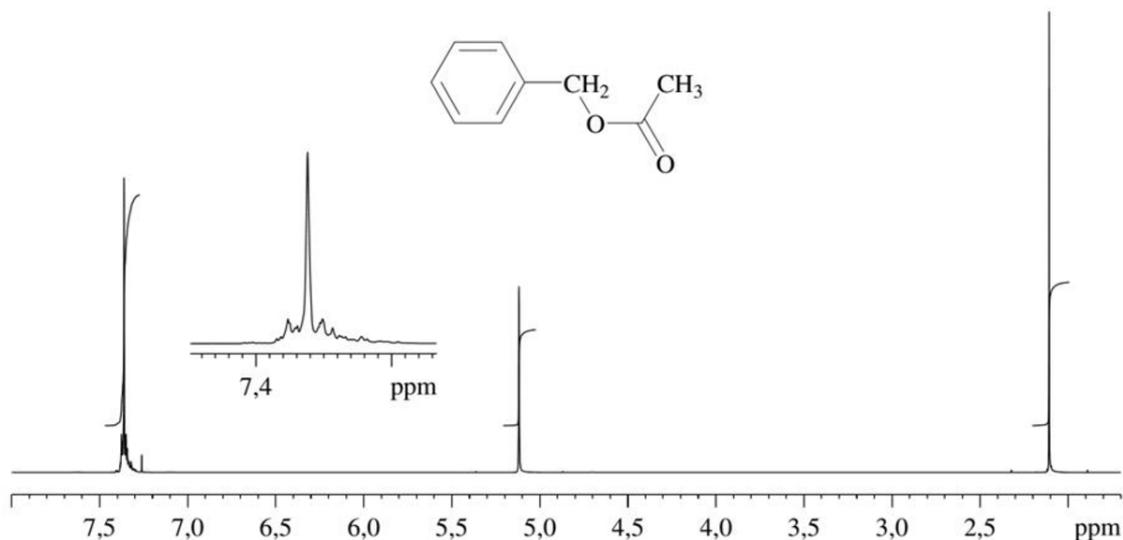
Figura 8 – Diagrama esquemático de um espectrômetro de RMN com transformações de Fourier e um magneto supercondutor.



Fonte: <http://grupo4tecn1.blogspot.com/2012/08/bases-de-la-rmn.html>

Dois métodos correspondem a dois tipos diferentes de espectrômetro de RMN. O método de varredura contínua (CW) ainda é utilizado em alguns instrumentos de baixa resolução, mas nos instrumentos modernos a técnica preferida é o método pulsado com transformações de Fourier (FT). A figura 9 retrata o espectro do acetato de benzila com as áreas dos picos medidas por um integrador eletrônico.

Figura 9 – Acetato de benzila em CDCl_3 , 300 MHz.

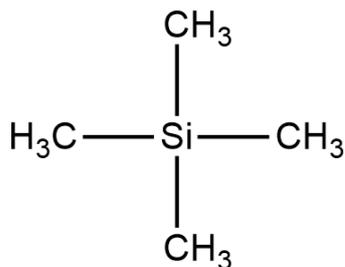


Fonte: SILVERTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed. LTC.

O espectro de hidrogênios em um campo magnético constante, obtido por varredura contínua (CW) ou pelo modo pulsado com transformações de Fourier (FT), é registrado como uma série de picos cujas áreas são proporcionais ao número de hidrogênios que eles representam. As áreas dos picos são medidas por um integrador eletrônico que traça uma linha em degraus cujas alturas são proporcionais às áreas dos picos. A contagem dos hidrogênios a partir da integração é útil para determinar ou confirmar fórmulas moleculares, detectar picos sobrepostos, determinar a pureza de amostras e efetuar análises quantitativas. (SILVERTEIN, 2007, p.130).

3.5.2 Deslocamento químico

As posições dos picos (deslocamentos químicos) são medidas em unidades de frequência a partir de um pico de referência. A diferença entre a posição de absorção de um determinado hidrogênio e um átomo de hidrogênio *padrão* é chamada de deslocamento químico do hidrogênio em questão. O composto de referência mais utilizado é o tretametil-silano (TMS):

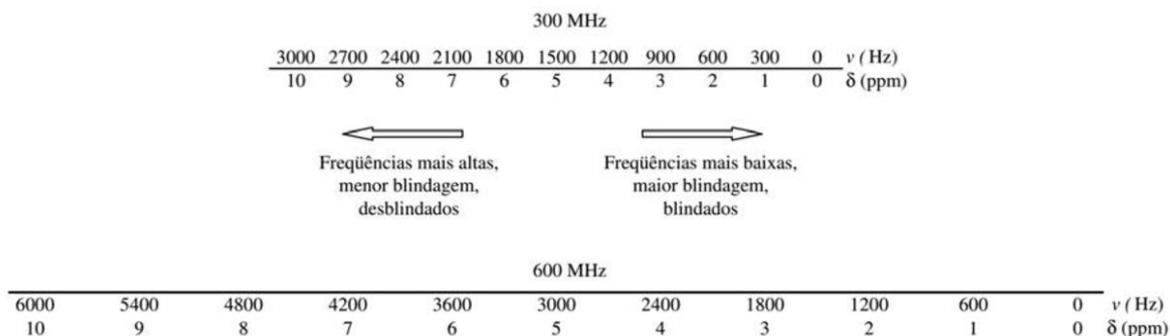


Os dados espectrais resultantes na RMN não apenas permitem a quantificação da concentração de metabólitos, mas também fornecem informações sobre sua estrutura química. As áreas espectrais dos picos geradas por cada molécula são usadas como uma medida indireta da quantidade do metabólito na amostra, enquanto o padrão dos picos espectrais que informam as propriedades físicas da molécula é usado para identificar o tipo de metabólito. (ALONSO, 2015, pag. 1)

Olhemos as escalas de RMN na Figura 10, colocando, por convenção, o pico do TMS em zero na extrema esquerda da escala. Os deslocamentos químicos podem ser expressos em unidades adimensionais (em δ ou ppm), a partir do deslocamento químico zero do TMS, e são independentes da frequência do espectrômetro usado. Isso é feito dividindo-se o deslocamento químico de um pico em Hz pela frequência do espectrômetro em MHz. Uma maior blindagem faz com que o próton absorva em uma frequência baixa (campo alto).

A blindagem dos prótons ocorre devido ao pequeno campo magnético induzido, que é gerado pelos elétrons e se opõe ao campo magnético externo, significando que o campo externo é ligeiramente maior que o campo magnético real sentido pelo próton.

Figura 10 - Escala de RMN em 300 e 600 MHz.



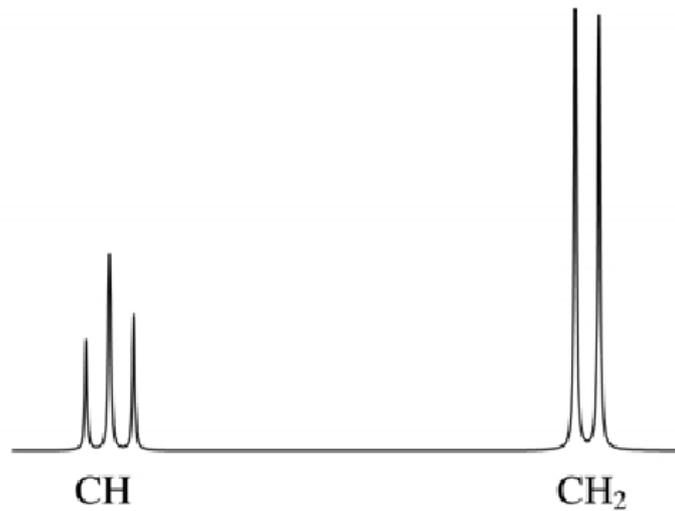
Fonte: SILVERTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed. LTC.

3.5.3 Multipletos

Em um “multipletto simples de primeira ordem”, o número de picos é determinado pelo número de hidrogênios vizinhos acoplados com a mesma constante de acoplamento (ou muito próxima, Figura 11). Os hidrogênios vizinhos podem ser geminais ou vicinais, isto é, envolvem duas ou três ligações. Um hidrogênio vizinho produz um dubleto, e dois hidrogênios igualmente acoplados produzem um triplete.

A multiplicidade é $n + 1$, em que n é o número de hidrogênios. A fórmula geral, válida para todos os núcleos, é $2nI + 1$, em que I é o número de spin. As intensidades relativas dos picos de um multipletto simples de primeira ordem dependem também de n . Os picos de um dubleto ($n = 1$) estão na proporção 1:1, os de um triplete ($n = 2$), na proporção 1:2:1, os de um quarteto ($n = 3$), na proporção 1:3:3:1 e assim por diante.

Figura 11 – Acoplamento spin-spin entre grupos CH e CH₂ com deslocamentos químicos muito diferentes.



Fonte: SILVERTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed. LTC.

A evolução dos métodos analíticos abriu a possibilidade da realização de análises detalhadas na perspectiva de caracterizar biomarcadores de doenças. A RMN é um desses métodos analíticos, e é uma técnica provida de uma eficiência no que tange ao tempo de avaliação e abrangência nas amostras biológicas humanas.

A expansão dos métodos analíticos com o objetivo de realizar análises detalhadas de biofluidos levou a caracterização de muitos biomarcadores de doenças. NMR fornece uma avaliação mais rápida e abrangente das amostras biológicas em modelos humanos. Estudos de perfis baseados em NMR que visam identificar biomarcadores para doenças específicas aumentaram significativamente nos últimos anos. Eles tentaram correlacionar fisiopatologias humanas com alterações no perfil metabólico de biofluidos comuns como urina, plasma e soro. Neste contexto, a metabolômica não direcionada baseada em NMR tornou-se um complemento importante para a identificação de biomarcadores na pesquisa de doenças, não apenas para fins de diagnóstico precoce, mas também para previsão de terapia, prognóstico ou monitoramento da progressão da doença. (SILVA, 2020, p. 1).

Desta forma, a utilização da RMN é uma excelente ferramenta para identificar os biomarcadores do diagnóstico de enfermidade, com uma série de finalidades

como diagnosticar precocemente a doença para uma intervenção eficaz de tratamento, prescrição de terapias, acompanhamento detalhado e monitoramento da evolução da doença. Uma vez que existe uma correlação das fisiopotologias humanas e as alterações no perfil metabólico de biofluidos comuns tais como urina, plasma e soro. Nesta análise, segundo Ribeiro (2021), ocorreu a predominância de lipídios de membrana, aminoácidos e ácidos orgânicos.

A preparação de amostras de sangue na análise de RMN, após a coleta do mesmo, é relatada por Pontes (2017): A amostra de sangue é coletada, seguida por uma preparação; é mantida em um freezer por pelo menos vinte minutos até que esteja coagulado; o sangue é colocado em uma centrífuga a 1500 rpm por 15 minutos; o soro sanguíneo é dividido em alíquotas (250 mL) e transferidos para tubos de propileno com 0,01% de azida de sódio (NaN_3) e armazenado a 80 °C por não mais que 14 dias; para a preparação da amostra de plasma sanguíneo, é necessário colocar alíquotas em tubos que contenham heparina-lítio ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para complexação com íons Mg^{2+} e Ca^{2+} ; no entanto, esses complexos são responsáveis pelo aparecimento dos picos característicos em regiões específicas do espectro que podem prejudicar as atribuições de picos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SUJEITOS DA PESQUISA

Os sujeitos envolvidos nesta pesquisa são a crianças e adolescentes na faixa etária de 6 a 18 anos com anemia falciforme (HbSS), recrutados no Ambulatório de Hematologia Magalhães Neto (Universidade Federal da Bahia, Brasil) e na Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (Brasil). Estão Incluídas também, crianças e adolescentes da mesma faixa etária, que formaram o grupo controle, recrutados no Ambulatório de Pediatria Magalhães Neto (Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgar Santos, Universidade Federal da Bahia) e no Ambulatório de Pediatria Geral do Hospital Geral Roberto Santos / Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Os participantes da pesquisa com anemia falciforme tinham sido confirmados com diagnóstico de HbSS, por eletroforese de hemoglobina ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Observavam os seguintes critérios de inclusão: não apresentavam manifestações agudas da doença ou eventos infecciosos por pelo menos um mês antes da participação no estudo; ausência de transfusão de sangue por pelo menos três meses. Estes participantes foram divididos em dois grupos: participantes que não utilizam a hidroxiureia, grupo designado por SCD; e participantes que utilizam este medicamento, designado por SCD_HDU. Não estavam submetidos a qualquer outra terapia, com exclusão dos pacientes em hipertransfusões.

O grupo controle considerado saudável, era composto por indivíduos que apresentavam Hemoglobina AA. diagnosticada por eletroforese de hemoglobina ou HPLC, não apresentavam comorbidade e não apresentavam patologias agudas por pelo menos um mês antes da inclusão no estudo.

4.2 COLETA DA AMOSTRA

As amostras de sangues foram coletadas com a utilização de tubos não tratados e tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para a obtenção do soro e do plasma, respectivamente. Os participantes encontravam-se em jejum de 12 horas. Os constituintes do sangue foram separados após a centrifugação, e em seguida armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O estudo envolve a coleta de 15 amostras do grupo SCD_HDU; 12 do grupo SCD; e 13 do grupo controle.

4.3 LIOFILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

A liofilização é um processo no qual podemos submeter uma amostra na perspectiva de conservar suas propriedades por um longo período de tempo. Este efeito é possível porque na liofilização é interrompida toda e qualquer reação química e biológica que este material poderia sofrer no decorrer dos tempos.

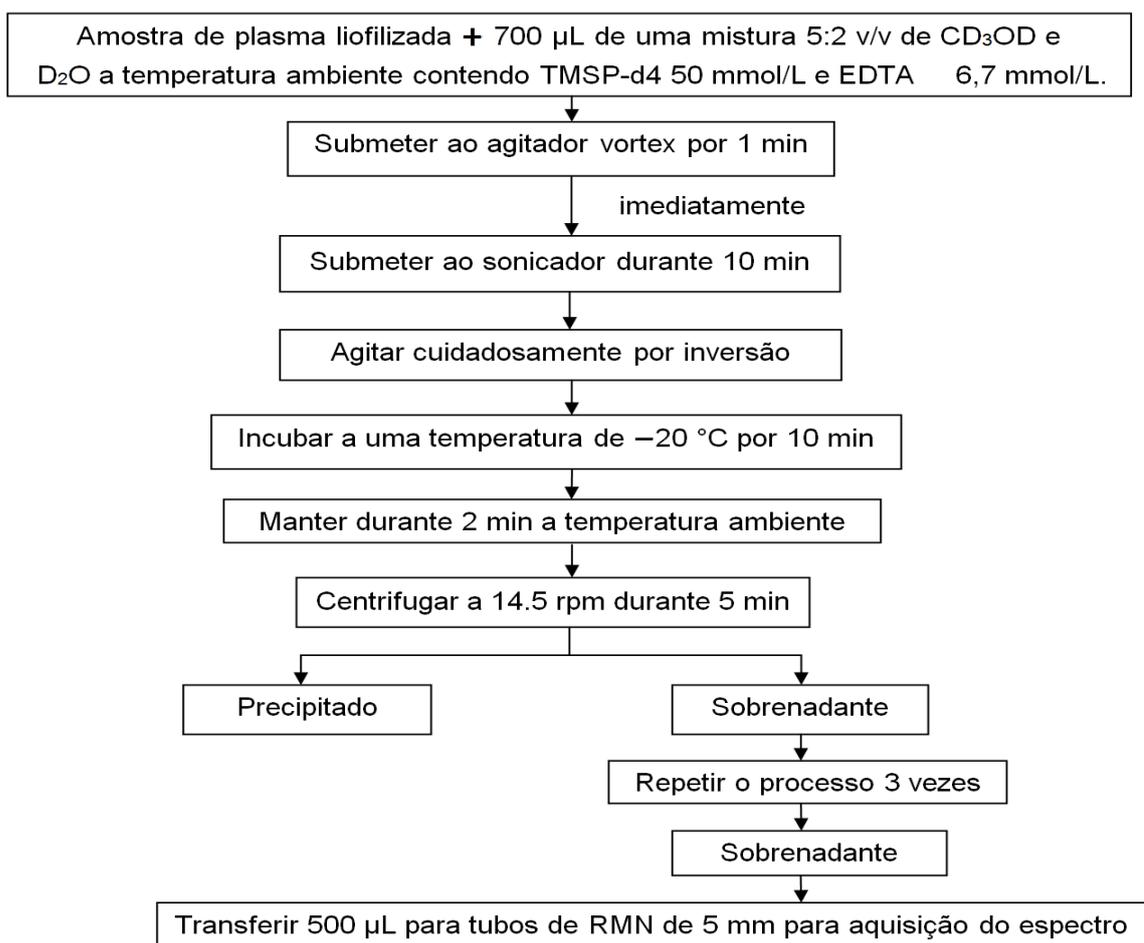
Conforme Tattini (2006), a liofilização é um processo de secagem constituído de três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. No congelamento o produto a ser liofilizado é imobilizado, interrompendo reações químicas e biológicas. Após o congelamento, o material é desidratado por sublimação seguida pela dessorção, com a utilização de baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas.

As amostras desta pesquisa passaram por este processo devido à necessidade da preservação das propriedades do material utilizado. A liofilização das amostras foi realizada em equipamento de bancada série Interpise, do Laboratório de Química Molecular (LBQM) do Instituto de Química da UFBA.

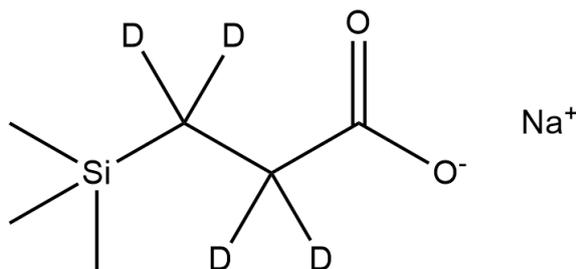
4.4 ANÁLISE POR RMN

4.4.1 Preparação das amostras

As amostras foram preparadas e analisadas conforme o fluxograma seguinte:



O TMSP-d₄, trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado, expresso no fluxograma acima, foi utilizado como padrão interno. É polar, portanto mistura-se com água e metanol que também são polares. Segundo o site do PubChem acessado em 2021, sua nomenclatura IUPAC é: sódio; 2,2,3,3-tetradeutério-3-trimetilsililpropanoato; e sua fórmula estrutural é a seguinte:



3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt (TMSP-d₄)

Durante o procedimento houve a formação de um precipitado de proteínas.

As amostras que tinham volumes finais menores que 500 μ L foram diluídas com solvente e foram feitos posteriormente, cálculos de correção da concentração.

4.4.2 Aquisição dos espectros de RMN

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III de 14,1 Tesla (600 MHz para frequência do hidrogênio), que operou a 25 °C, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da UFSCAR. O equipamento se utiliza de uma sonda de 5mm com detecção direta (BBO) e outra com detecção inversa (BBI) com gradiente de campo pulsado no eixo z e sintonia automática de frequência. Para obtenção dos espectros, foi empregado o software Topspin, versão 3,5p17.

Para otimizar o protocolo de aquisição dos espectros de RMN ¹H foram realizados vários experimentos com a obtenção dos espectros correspondentes que envolvem protocolos de precipitação de proteínas. Nos experimentos foram utilizadas sequências de pulsos e proporções de misturas de metanol deuterado (CD₃OD) e água deuterada (D₂O). Além disso, em um dos experimentos foi usada somente a água deuterada na obtenção do espectro, o que é realizado sem a precipitação de proteínas, para verificar a qualidade da água deuterada e detectar seus possíveis contaminantes. Tais experimentos estão demonstrados na tabela 2.

Os espectros obtidos foram comparados e foi escolhido o protocolo que aumenta o número de metabólitos detectados e que apresenta o mínimo de interferência de proteínas, possibilitando a quantificação correta dos metabólitos identificados. Foi selecionado o experimento em que o espectro apresenta a melhor visualização dos sinais dos metabólitos.

Tabela 2 – Otimização do protocolo de ressonância magnética nuclear de plasma sanguíneo. A tabela mostra os diferentes parâmetros de aquisição dos espectros de RMN em diferentes proporções da mistura contendo metanol deuterado (CD₃OD) e água deuterada (D₂O).

| Sequência de pulso | Número de scans (NS) | Proporção CD₃OD:D₂O (μL) |
|---------------------------|-----------------------------|---|
| <i>Zg</i> | 64 | Sem precipitação de proteínas |
| <i>Zgpr</i> | 64 | Sem precipitação de proteínas |
| <i>Zg</i> | 64 | (200:500) |
| <i>Zgpr</i> | 64 | (200:500) |
| <i>Dupla supressão</i> | 64 | (200:500) |
| <i>Zg</i> | 64 | (400:200) |
| <i>Zgpr</i> | 64 | (400:200) |
| <i>Dupla supressão</i> | 64 | (400:200) |
| <i>Noesypr 1 d</i> | 64 | (400:200) |
| <i>Zgpr</i> | 128 | (400:200) |
| <i>Lcipnf2</i> | 128 | (400:200) |
| <i>Noesypr 1 d</i> | 128 | (400:200) |
| <i>Noesypr 1 d</i> | 64 | (500:200) |

Fonte: Pesquisa da própria autora

4.4.3 Identificação dos metabólitos

Os metabólitos são identificados após a aplicação da técnica analítica. Em RMN ¹H esta identificação está de acordo com a multiplicidade que pode incluir o singlete, dubleto, tripleto e multipeto, e os valores de deslocamento químico dos sinais do espectro. Os picos, com seus valores de deslocamento químico, têm como referência, o pico do trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado (TMSP-d₄) no deslocamento químico zero. Foi utilizado o programa Chenomx suite 8.4 (Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canadá) para a identificação.

4.4.4 Análise metabolômica

Após as análises de RMN ^1H , os dados foram processados, fazendo uso do programa NMRProcFlow. O processamento de dados padrão inclui correção de linha de base, alinhamento e integração dos picos. Assim pode ser obtida a quantificação dos metabólitos. Torna-se possível a comparação das quantidades dos metabólitos no plasma dos três grupos de crianças pertencentes a esta pesquisa. As análises estatísticas são realizadas após a quantificação.

4.4.5 Análises estatísticas

A normalização assim como a correção de linha de base, constitui uma transformação de dados que está incluída entre os métodos de pré-tratamento, em que as amostras referentes às linhas da matriz de dados são preparadas para a análise. Cada amostra é pré-tratada individualmente, usando-se a mesma regra para todas elas. O pré-tratamento tem o objetivo de reduzir as variações indesejáveis que permanecem após a aquisição de dados e não são eliminadas naturalmente na realização da análise, e que podem influenciar o resultado final.

Cada uma das variáveis de uma dada amostra é dividida por um fator de normalização, assim, todas as amostras estão em uma escala pré-determinada. Podem ser removidas as variações sistemáticas associadas com o tamanho da amostra ou quando a concentração absoluta das amostras não pode ser facilmente controlada.

A PLS-DA, Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais, corresponde a um modelo de classificação, ou seja, de discriminação de grupos, na qual cada uma das colunas da matriz de dados passará pelos seguintes pré-tratamentos: centragem dos dados na média e autoescalamento. Para realizar o primeiro pré-tratamento, o valor médio de cada coluna da matriz de dados é subtraído de cada um dos valores da respectiva coluna.

No autoescalamento é subtraído de cada elemento de uma coluna de matriz de dados o valor médio da respectiva coluna, e o resultado é dividido pelo desvio-

padrão dessa coluna. O escalamento de Pareto é uma extensão do autoescalamento que ao invés do desvio-padrão, utiliza a raiz quadrada do desvio-padrão como fator de escala. Os métodos de redução de dimensionalidade, como PLS-DA, têm como objetivo a transformação do espaço das medidas originais para um de dimensão reduzida, com o menor erro possível.

Segundo Ruiz-Perez (2020), este método tem sido popular no campo da quimiometria há bem mais de duas décadas, e tem sido recomendada para uso em análises de dados ômicos. PLS-DA está ganhando popularidade na metabolômica e em outras análises ômicas. A Validação cruzada informa a exatidão e o desempenho de um modelo de predição, com a estimação de determinados parâmetros, como por exemplo, o coeficiente de determinação R^2 .

A importância e contribuição de uma variável no modelo PLS-DA são expressas pela VIP (variable influence on projection) scores. As variáveis com maiores VIP scores são as mais contributivas na discriminação de classes neste modelo. O Heat map faz uso de cores para os valores individuais de uma matriz, representando graficamente as informações. As referidas análises estatísticas foram realizadas no programa MetaboAnalyst 2,0, para duas análises: as que envolvem os grupos controle, SCD e SCD_HDU; e as que correspondem aos grupos SCD e SCD_HDU.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

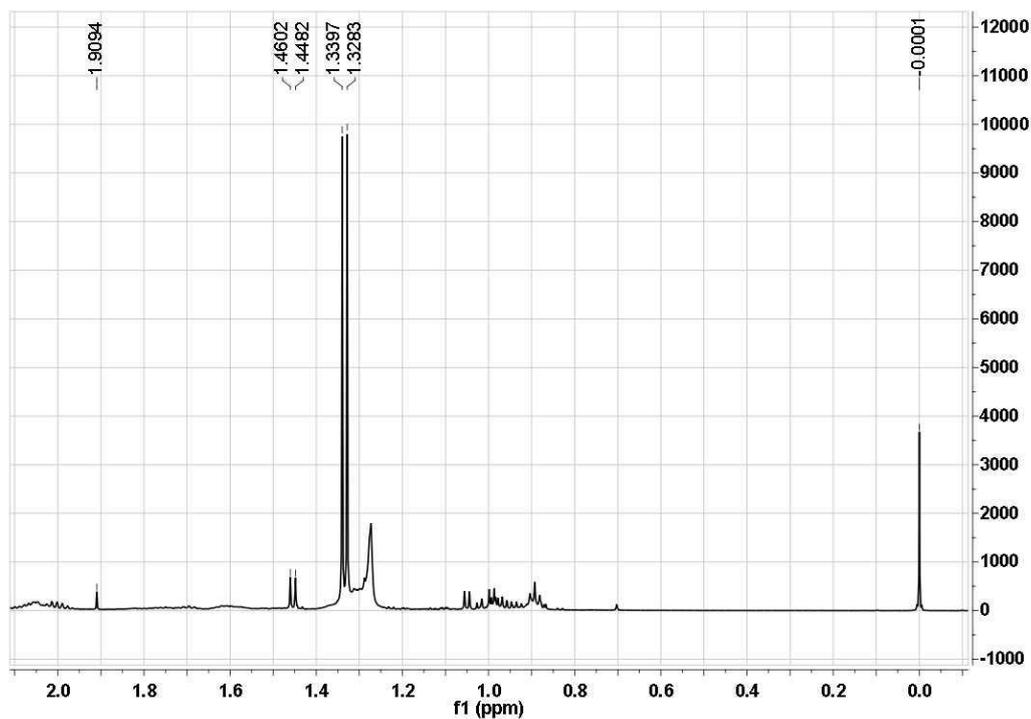
O espectro de RMN mostra os sinais dos metabólitos com os correspondentes deslocamentos químicos e multiplicidades. Pela técnica de RMN podem ser fornecidas informações de uma análise qualitativa e quantitativa. Os resultados obtidos das análises estatísticas retratam a discriminação dos grupos e a avaliação do modelo de classificação. Também são detectados os metabólitos com suas concentrações comparativas, que mais contribuem para a classificação dos grupos. No Apêndice M, N e O deste trabalho encontram-se os espectros obtidos da análise de RMN das amostras PAM/003, PAM/011 e PAM/021 pertencentes aos grupos de participantes SCD_HDU, SCD e controle, respectivamente.

5.1 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN

O experimento selecionado, dentre os realizados para a otimização do protocolo, foi aquele em que o espectro apresentou uma melhor visualização dos sinais, expressando um maior número de metabólitos e ausência dos largos sinais de proteínas, mostrado na figura 12, com os seguintes parâmetros: Noesypr 1d; número de scans: 64; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 500:200. Representou o melhor experimento cujos parâmetros foram utilizados para a obtenção dos espectros de todas as amostras a uma temperatura constante de 298 K.

Dos outros experimentos foram obtidos os espectros encontrados nos apêndices de A a L deste trabalho. Podem ser observados no espectro do apêndice A, pertencente a um experimento em que não tinham sido utilizadas quantidades de CD₃OD, os largos sinais de proteínas. A tabela 3, mostra os parâmetros de aquisição dos espectros 1D “noesy”.

Figura 12 – Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: Noesypr 1d; número de scans: 64; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 500:200.



Fonte: Pesquisa da própria autora

Tabela 3 – Parâmetros de aquisição de espectros 1 D Noesy.

| Experiência | 1 D Noesy |
|-------------------------------|---------------------|
| Sequência de pulso | <i>Noesygpr 1 d</i> |
| Tamanho do campo (TD) | 64 K |
| Dummy (DS) | 4 |
| Número de scans (NS) | 64 |
| Largura do espectro (SW) | 15,0182 |
| Tempo de aquisição (AQ) | 7,27 s |
| Ganho do receptor (RG) | 28 |
| Atenuação da potência (PLDB9) | 52,27 |
| Tempo de relaxação (d 1) | 1 s |

Fonte: Pesquisa da própria autora

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS

Os sinais dos espectros de RMN apresentam deslocamentos químicos que correspondem aos metabólitos. Tal deslocamento químico está situado no eixo horizontal do gráfico e tem como referência o TMSP-d4 no deslocamento químico 0 ppm. O sinal do metabólito demonstra certa multiplicidade, como por exemplo, um singlete. Vinte e quatro metabólitos foram identificados, incluindo dez ácidos orgânicos, oito aminoácidos e outros compostos orgânicos, que estão relacionados na tabela 4.

Tabela 4 – Dados espectrais de RMN ^1H dos metabólitos identificados em amostras de plasma sanguíneo de crianças com anemia falciforme tratadas com hidroxiureia.

| Metabólitos | Código HMDB | δ_{H} (multiplicidade) |
|---------------------------------|-------------------------|--|
| Ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico | HMDB0000407 | 0.825 (d) |
| Ácido 2-hidroxibutírico | HMDB0000008 | 0.890 (t) |
| Ácido 3-hidroxibutírico | HMDB0000357 | 1.187 (d) |
| 4-Hidroxibenzenoacetato | HMDB0000020 | 6.805 (s) |
| Acetato | HMDB0000042 | 1.906 (s) |
| Acetona | HMDB0001659 | 2.215 (s) |
| Alanina | HMDB0000161 | 1.464 (d) |
| Azelato | HMDB0000784 | 2.137 (t) |
| Colina contendo metabólitos | - | 3.183 (m) |
| Citrato | HMDB0000094 | 2.490 (d) |
| Creatina / Creatinina | HMDB0000064/HMDB0000562 | 3.044 (s) |
| Ácidos graxos | - | 5.313 (m) |
| Formato | HMDB0000142 | 8.499 (s) |
| Glicose | HMDB0000122 | 5.168 (d) |
| Glicerol | HMDB0000131 | 4.280 (m) |
| Glicina | HMDB0000123 | 3.565 (s) |
| HDL/VLDL | - | 1.260 (sl) |
| Histidina | HMDB0000177 | 7.660 (s) |
| Lactato | HMDB0001311 | 1.324 (d) |
| Leucina/Isoleucina | HMDB0000687/HMDB0000172 | 1.207 (t) |
| Fenilalanina | HMDB0000159 | 7.286 (m) |
| Prolina | HMDB0000162 | 2.040 (m) |
| N-Óxido de trimetilamina | HMDB0000925 | 3.253 (s) |
| Valina | HMDB0000883 | 1.050 (d) |

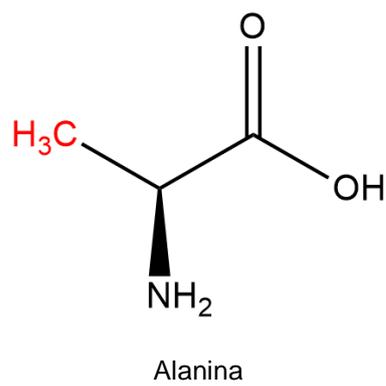
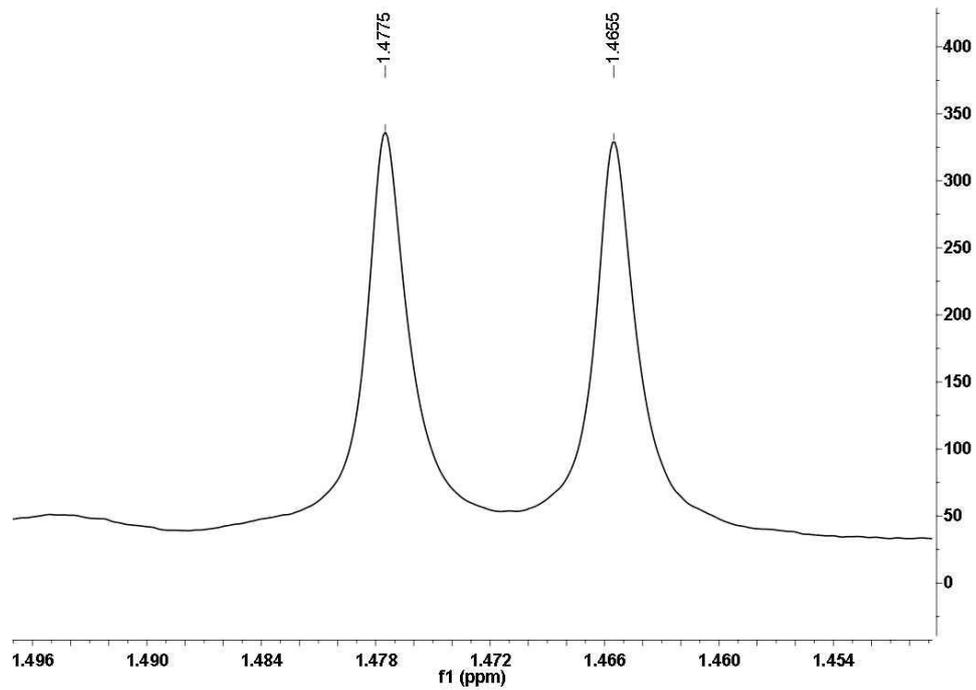
Fonte: Pesquisa da própria autora.

As identificações de metabólitos realizadas no espectro da amostra PAM/003, pertencente ao grupo de participantes SCD_HDU, são exemplificadas nos espectros das figuras 13 e 14. A Alanina apresenta um dubleto em 1,4715 ppm correspondente a absorção dos hidrogênios metílicos ligados ao carbono β -carbonílico da molécula, destacados de vermelho na estrutura, conforme o espectro da figura 13. Podemos observar a característica desta multiplicidade, que retrata dois picos. Segundo Silverstein (2007), este deslocamento químico está na faixa de Acíclicos alifáticos.

Os seguintes sinais, encontramos no espectro da Figura 14: um tripleto em 2,1529 ppm; um multipletto entre 2,0128 ppm e 2,0694 ppm; e um singleto em 1,9092 ppm; correspondentes as identificações do Azelato, Prolina e Acetato, respectivamente; observamos as características destas multiplicidades que expressam, nesta ordem, três, vários e um pico. Os hidrogênios correspondentes a absorção estão destacados de vermelho nas estruturas.

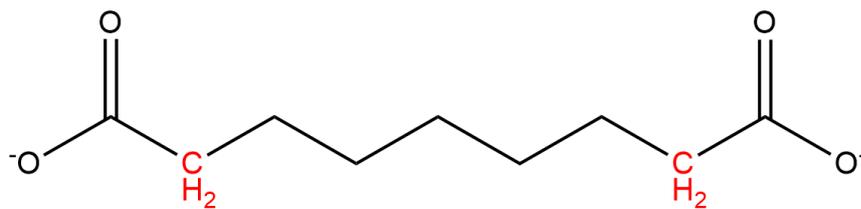
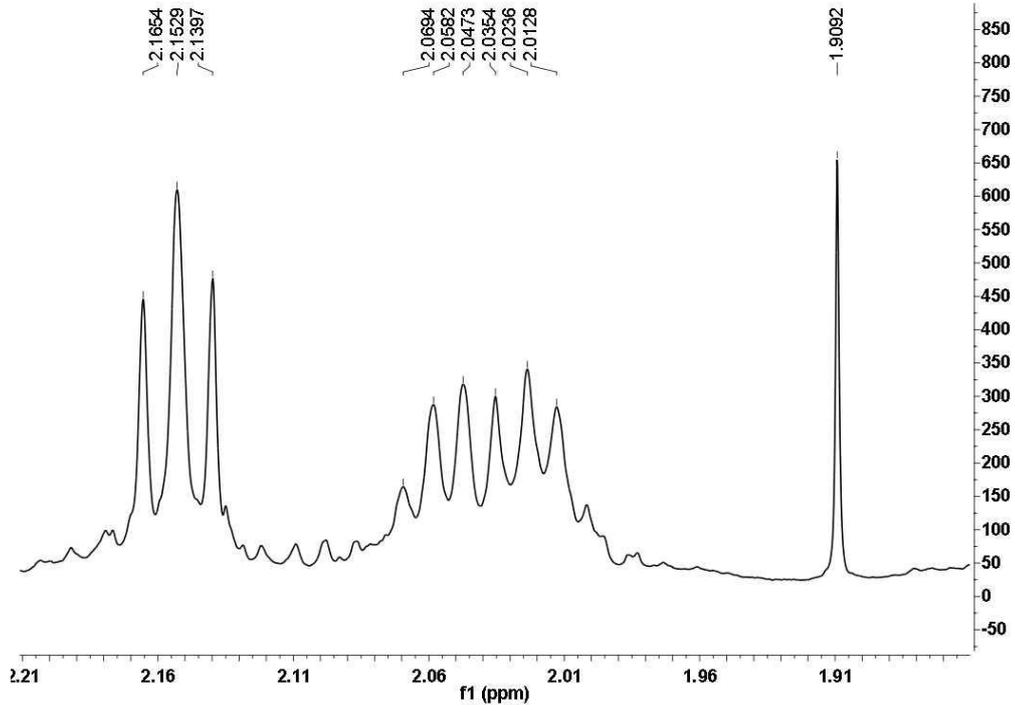
O espectro da amostra PAM/003, pertencente ao grupo SCD_HDU, observado no intervalo de deslocamento químico de 0,0 ppm a 2,5 ppm, encontra-se na figura 15. Mostra os seguintes metabólitos identificados: acetato (singleto; 1,9092 ppm), acetona (singleto; 2,2167 ppm), ácido 2-hidroxi-butírico (tripleto; 0,8932 ppm), alanina (dubleto; 1,4715 ppm), azelato (tripleto; 2,1528 ppm), citrato (dubleto; 2,4800 ppm), HDL/VLDL (singleto largo; 1,2732 ppm), lactato (dubleto; 1,334 ppm), leucina/isoleucina (tripleto; 1,1968 ppm), prolina (multipletto; 2,0128 ppm – 2,0694 ppm), valina (dubleto; 1,0608 ppm). Os sinais desses metabólitos têm como referência o pico do TMSP-d4 no deslocamento químico 0,0001 ppm.

Figura 13 – Espectro de RMN da amostra PAM/003 referente a Identificação da Alanina, dubleto em 1,4715 ppm. Fórmula estrutural deste metabólito com hidrogênios correspondentes a absorção destacados de vermelho.

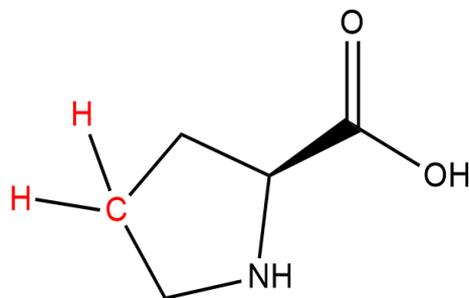


Fonte: Pesquisa da própria autora

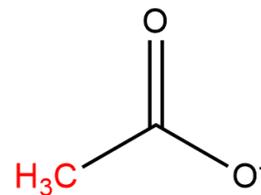
Figura 14 – Espectro de RMN da amostra PAM/003 referente as Identificações do Azelato, tripleto em 2,1529 ppm; Prolina, multiplete em 2,0128 ppm - 2,0694 ppm; e Acetato, singlete em 1,9092 ppm. Fórmulas estruturais destes metabólitos com hidrogênios correspondentes as absorções destacados de vermelho.



Azelato



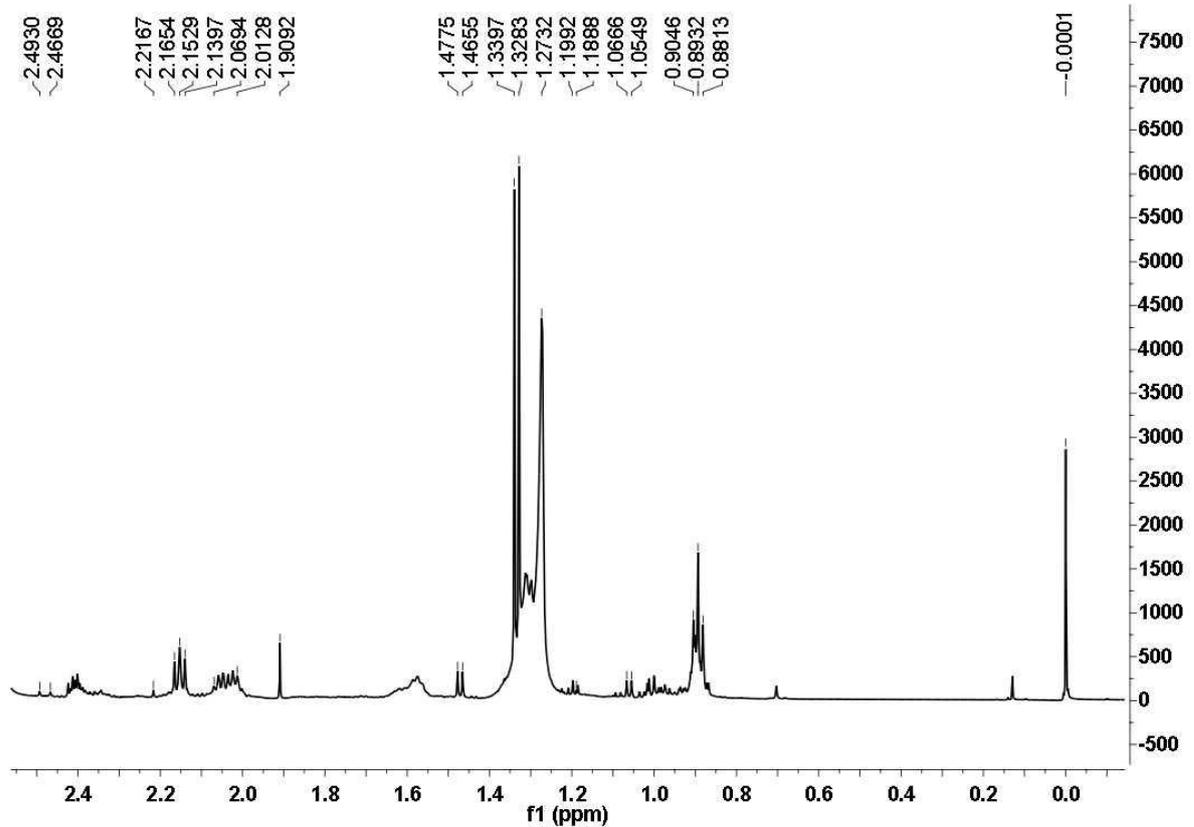
Prolina



Acetato

Fonte: Pesquisa da própria autora

Figura 15 – Espectro de RMN da amostra PAM/003, pertencente ao grupo SCD_HDU, observado no intervalo de deslocamento químico de 0,0 ppm a 2,5 ppm. Identificação dos seguintes metabólitos: acetato (singleto; 1,9092 ppm), acetona (singleto; 2,2167 ppm), ácido 2-hidroxibutírico (triplete; 0,8932 ppm), alanina (dubleto; 1,4715 ppm), azelato (triplete; 2,1528 ppm), citrato (dubleto; 2,4800 ppm), HDL/VLDL (singleto largo; 1,2732 ppm), lactato (dubleto; 1,334 ppm), leucina/isoleucina (triplete; 1,1968 ppm), prolina (multiplete; 2,0128 ppm – 2,0694 ppm), valina (dubleto; 1,0608 ppm). Pico de referência: TMSP-d4 (0,0001 ppm).



Fonte: Pesquisa da própria autora.

5.3 ALINHAMENTO DE PICOS DE RMN

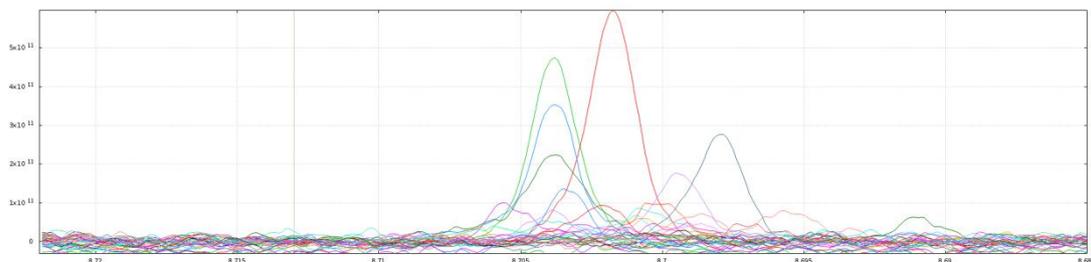
Antes da quantificação dos metabólitos, é feito o alinhamento de picos que está retratado nas figuras de 16 a 19 e nos apêndices de P a AE, incluindo os seguintes picos desalinhados e alinhados: Pico de metabólito não identificado 1; Picos de metabólitos não identificados 2 e 3; do Lactato (Dubleto; 1,334 ppm); da Alanina (Dubleto; 1,4715 ppm); do Acetato (Singleto; 1,9092 ppm); do Formato (Singleto; 8,5024 ppm); da Histidina (Singleto; 7,6753 ppm) e outros picos de metabólitos não identificados; da Fenilalanina (Multiplete; 7,2666-7,3763 ppm); do

Ácido graxo insaturado (Multipletto; 5,3351-5,4085 ppm); da Glicose (Dubleto; 5,1745 ppm).

De acordo com Silvertein (2007), as áreas dos picos são proporcionais ao número de hidrogênios que eles representam e são medidas por um integrador eletrônico que traça uma linha em degraus cujas alturas são proporcionais às áreas dos picos. A integração é útil para a quantificação de metabólitos.

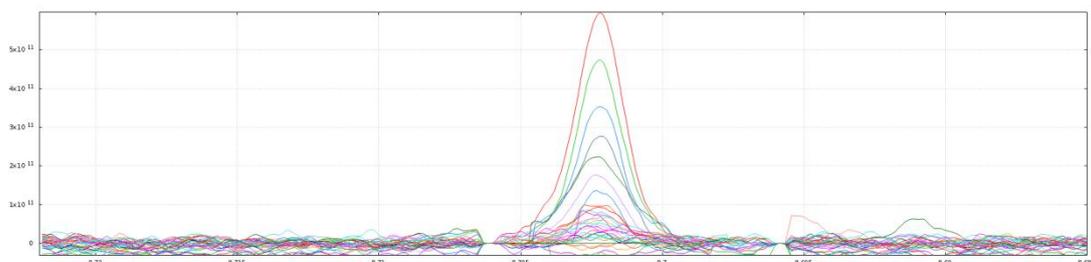
Conforme Ferreira (2015), os desalinhamentos nos deslocamentos químicos nos espectros de RMN surgem mesmo em uma análise padronizada devido às interações intermoleculares, pH e temperatura, além das variações instrumentais. Para ele, algumas regiões dos espectros são mais ou menos sensíveis a estes fatores e esses desalinhamentos devem ser eliminados ou reduzidos, pois para a análise os dados, as variáveis devem descrever cada uma o mesmo atributo.

Figura 16 - Picos de metabólito não identificado 1 desalinhados.



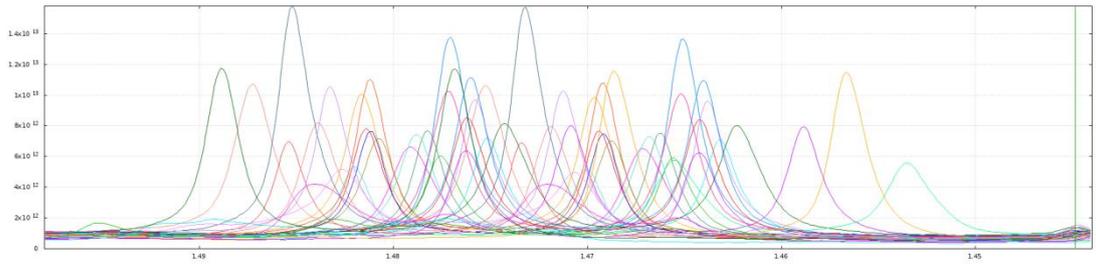
Fonte: Pesquisa da própria autora.

Figura 17 - Picos de metabólito não identificado 1 alinhados.



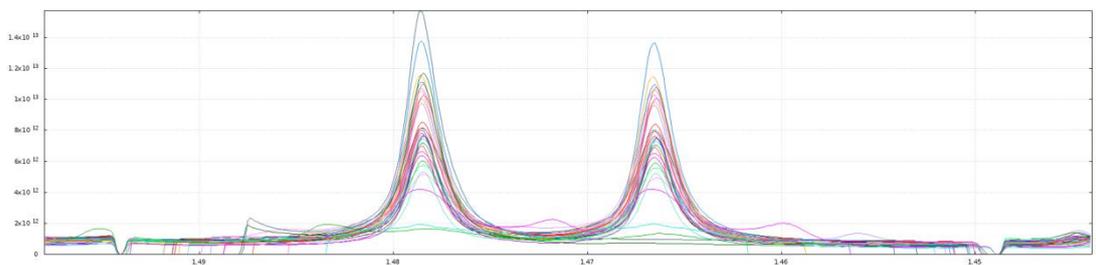
Fonte: Pesquisa da própria autora.

Figura 18 - Picos da Alanina (Dubleto; 1,4715 ppm) desalinados.



Fonte: Pesquisa da própria autora.

Figura 19 - Picos da Alanina (Dubleto; 1,4715 ppm) alinhados.



Fonte: Pesquisa da própria autora.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

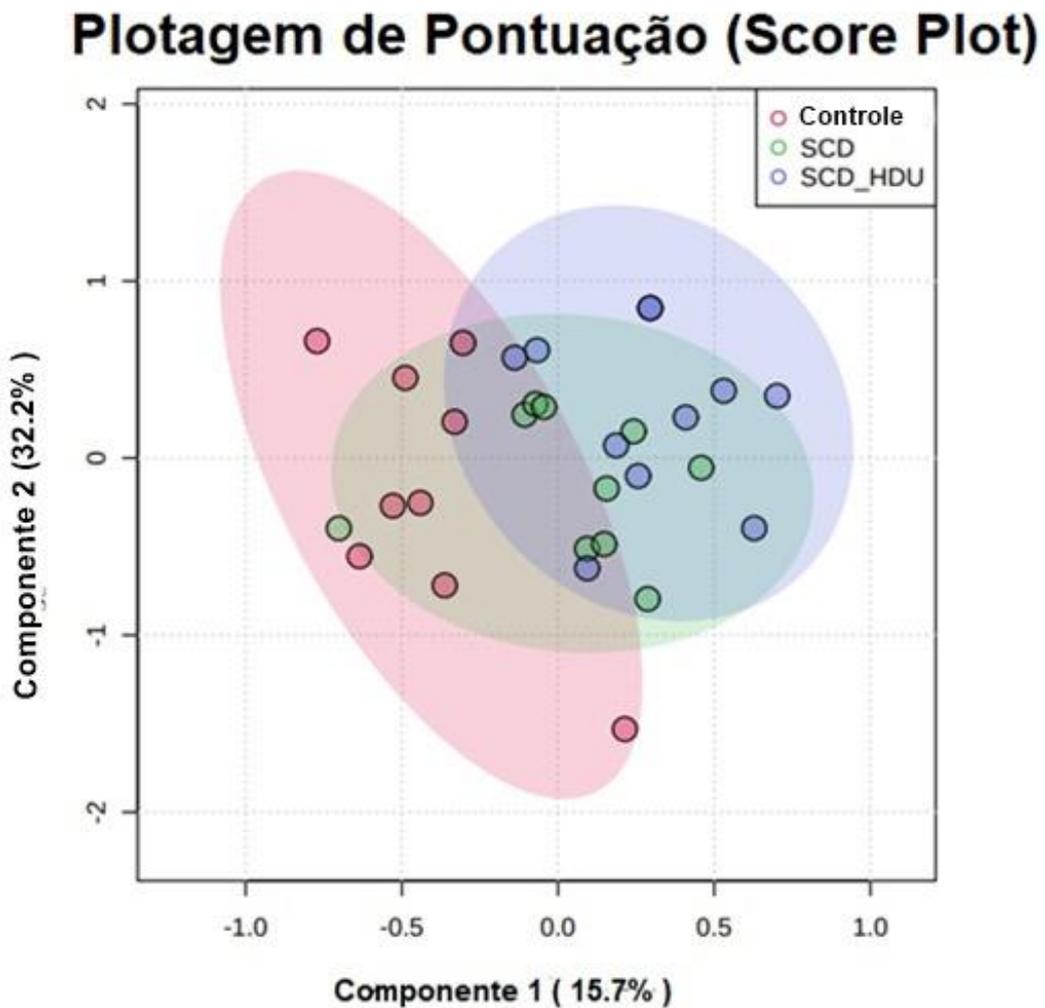
5.4.1 Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais – PLS-DA dos grupos controle, SCD e SCD_HDU

Os espectros foram submetidos à correção de linha de base e a normalização, e após esse pré-tratamento foi realizada uma análise de componentes principais nos dados espectrais centrados na média, para verificar as tendências com respeito aos três grupos de participantes. Na figura 20, as amostras dos três grupos se encontram dispersas no gráfico de escores de componente 1 *versus* componente 2, descrevendo 47,9 % da variância total dos dados.

O gráfico de escores de componente 1 *versus* componente 2 descreve 15,7 % e 32,2 % da informação dos dados originais, respectivamente, revelando a

similaridade e a dissimilaridade dos grupos. Uma linha vertical na origem evidencia alguma tendência na distribuição: 6 amostras do grupo SCD e 8 amostras do grupo SCD_HDU tendem a ter escores positivos, e 8 amostras do grupo controle, negativos. Pode ser observada a similaridade no perfil metabólico dos grupos SCD e SCD_HDU, que difere do perfil metabólico do grupo controle.

Figura 20 – Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais – PLS-DA. Gráfico de escores de componente 1 *versus* componente 2, descrevendo 47,9 % da variância total dos dados. Similaridade e dissimilaridade dos grupos controle, SCD e SCD_HDU.



Fonte: Pesquisa da própria autora.

Baseada na informação contida nas variáveis, as componentes principais não estão obrigatoriamente relacionadas com as diferenças entre os grupos, contribuindo na descrição dos mesmos. O método PLS-DA foi usado como um modelo de discriminação, em que os dados são centrados na média e são autoescalados pelo escalamento de Pareto, um pré-processamento sugerido para o tratamento de dados metabolômicos.

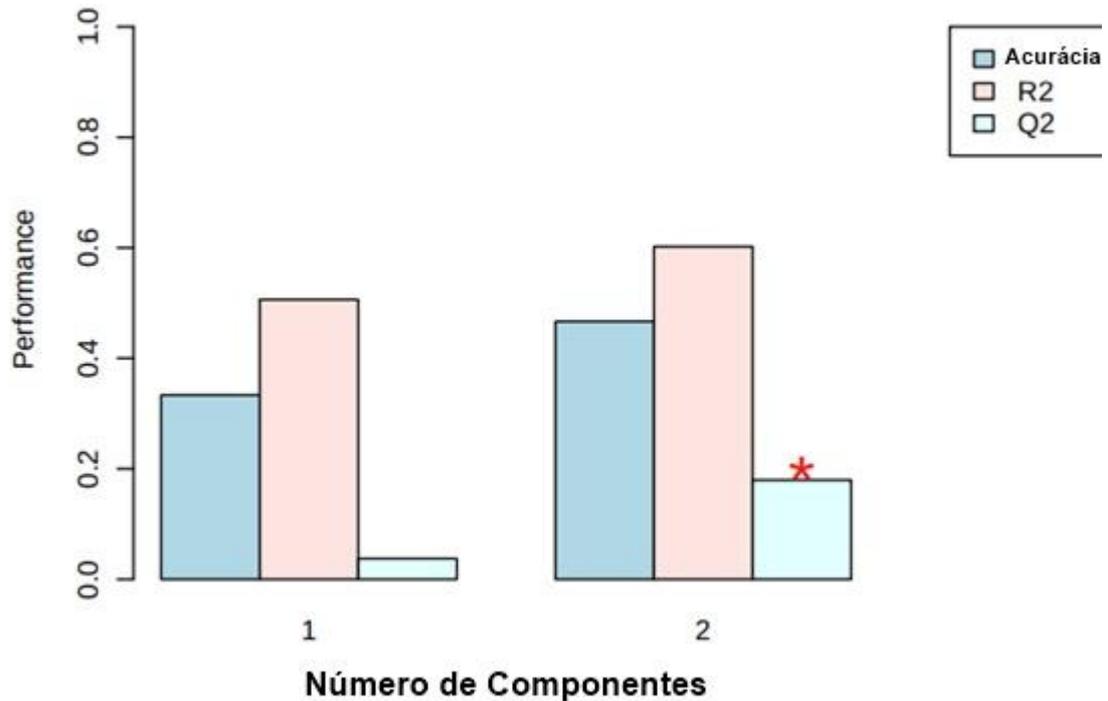
5.4.2 Validação cruzada da PLS-DA dos grupos controle, SCD e SCD_HDU

A PLS-DA foi testada pelo método da validação cruzada e obteve-se um gráfico que mostra o desempenho da acurácia, R^2 e Q^2 das componentes 1 e 2, apresentado na figura 21, no qual o desempenho máximo é 1.

A acurácia expressa o quanto os valores obtidos se aproximam dos valores de referência. Conforme Ferreira (2015), O parâmetro R^2 informa o quanto a PLS-DA se ajusta aos dados. Este autor afirma que o parâmetro Q^2 é uma medida de quanto cada amostra ajusta-se ao novo subespaço definido pelas componentes principais. Este parâmetro informa a respeito da falta de ajuste de cada amostra, isto é, quanto ela se afasta do subespaço das componentes.

Podem ser observados no gráfico da figura 21, para a componente 2: acurácia = 0,46667; $R^2 = 0,60211$; e $Q^2 = 0,17956$. Estes parâmetros são melhores quando os seus desempenhos estão mais próximos de 1. O asterisco vermelho no gráfico sinaliza o melhor Q^2 .

Figura 21 – Validação cruzada da PLS-DA dos grupos controle, SCD e SCD_HDU. Desempenho da acurácia, R^2 e Q^2 das componentes 1 e 2.



Fonte: Pesquisa da própria autora.

5.4.3 VIP scores e mapa de calor dos grupos controle, SCD e SCD_HDU

A VIP (variable influence on projection) scores é uma medida da importância dos metabólitos, os quais com maiores VIP scores, contribuem para a separação dos grupos na PLS-DA. Quanto maior for esta medida maior será a contribuição. As VIP scores da figura 22, variam aproximadamente, de 1,0 a 2,0, e referem-se aos seguintes metabólitos: leucina/isoleucina, prolina, ácidos graxos, creatina/creatinina, histidina, ácido 3-hidroxi-butírico, glicerol, acetona, azelato e citrato.

Os metabólitos que possuem VIP scores maiores ou iguais a 1,0 são: a leucina/isoleucina e depois a prolina, sendo os metabólitos que têm os mais altos VIP scores, um pouco acima de 2,0; logo depois vem ácidos graxos, próximos de 1,4, creatina/creatinina, próximo de 1,3, histidina, próximo de 1,2, ácido 3-hidroxi-butírico, próximo de 1,1 e glicerol e acetona, próximos de 1,0. Encontramos o

mapa de calor na Figura 23, que apresenta as concentrações dos metabólitos nos três grupos através de um gradiente de cores representado pela faixa de numeração de -1 a 1, onde a concentração é crescente. De acordo com o mapa de calor, a leucina/isoleucina, prolina, ácidos graxos, creatina/creatinina e glicerol possuem maiores concentrações no grupo SCD_HDU, e a histidina, ácido 3-hidroxi-butírico e acetona possuem maiores concentrações no grupo controle. A leucina/isoleucina, prolina, ácidos graxos e glicerol têm baixas concentrações no grupo controle. A leucina/isoleucina, creatina/creatinina e histidina têm baixas concentrações no grupo SCD. O ácido 3-hidroxi-butírico e acetona têm concentrações baixas no grupo SCD_HDU.

Os metabólitos expressos no Heat map, inclusive os que possuem VIP scores maiores ou iguais a 1, são diferenciados por apresentarem os seguintes níveis de concentração em determinados grupos: alto, intermediário ou baixo. A leucina/isoleucina está em nível alto no grupo SCD_HDU, e baixo nos grupos SCD e controle. A prolina possui nível alto no grupo SCD_HDU, intermediário no grupo SCD, e baixo no grupo controle.

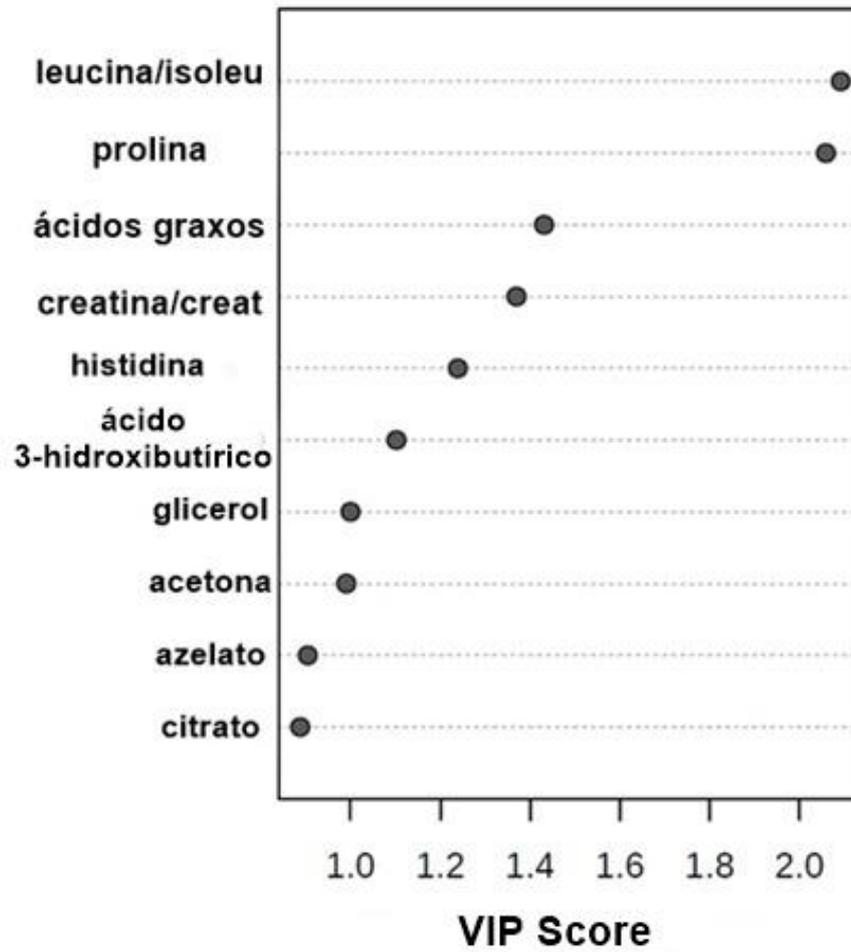
Os ácidos graxos têm nível alto no grupo SCD_HDU, intermediário no grupo SCD e baixo no grupo controle. A creatina/creatinina possui nível alto no grupo SCD_HDU, intermediário no grupo controle e baixo no grupo SCD. A histidina apresenta nível alto no grupo controle, intermediário no grupo SCD_HDU e baixo no grupo SCD.

O ácido 3-hidroxi-butírico tem nível alto no grupo controle, intermediário no grupo SCD e baixo no grupo SCD_HDU. O glicerol possui nível alto no grupo SCD_HDU, intermediário no grupo SCD e baixo no grupo controle. A acetona apresenta nível alto no grupo controle, intermediário no grupo SCD e baixo no grupo SCD_HDU.

Na anemia falciforme ocorre o aumento dos níveis de prolina, ácidos graxos e glicerol, e a redução dos níveis de creatina/creatinina, histidina, ácido 3-hidroxi-butírico e acetona.

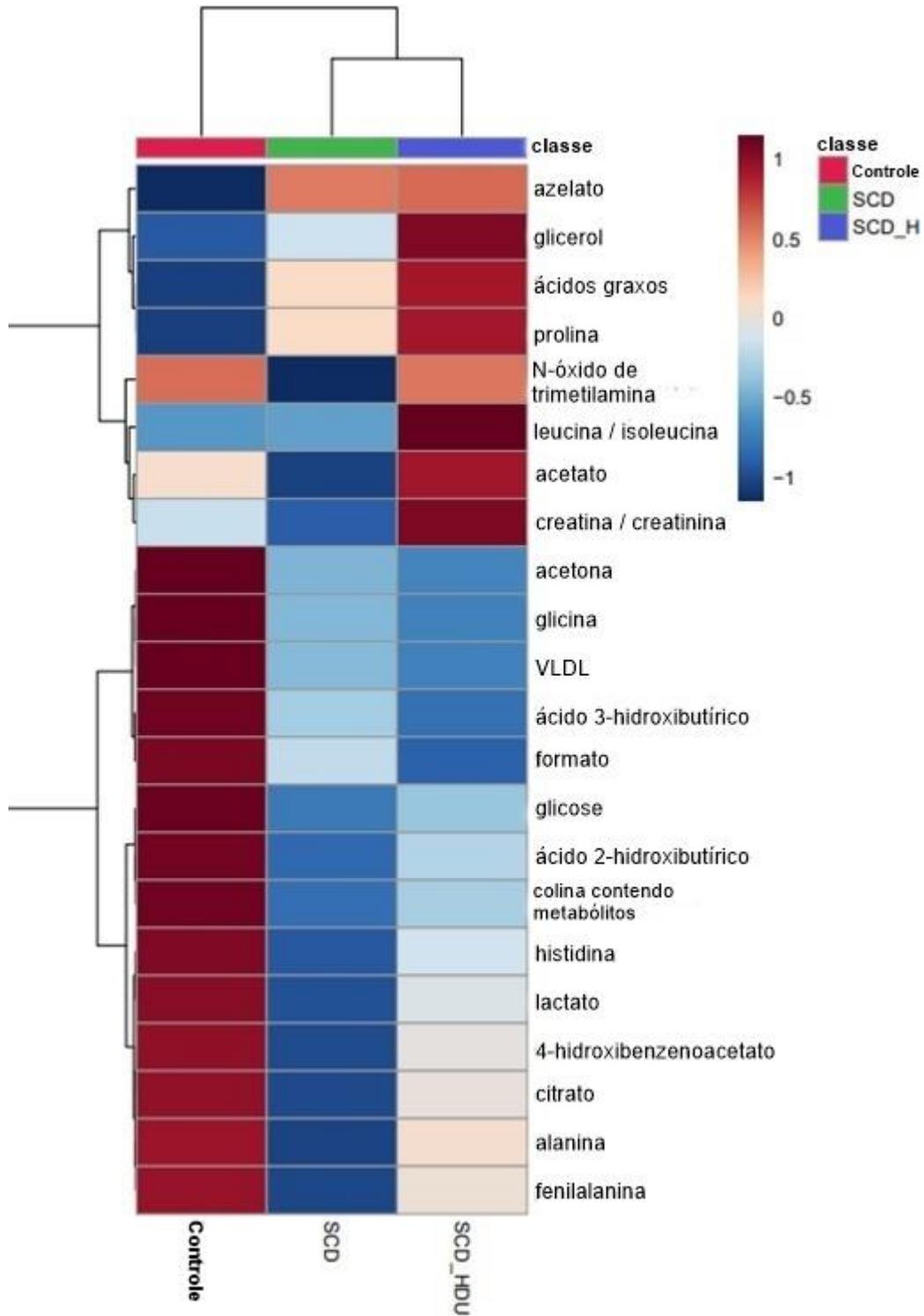
O uso da hidroxiureia elevou os níveis de leucina/isoleucina, prolina, ácidos graxos, creatina/creatinina, histidina e glicerol. E reduziu os níveis de ácido 3-hidroxi-butírico e acetona.

Figura 22 – VIP (variable influence on projection) scores. Metabólitos contributivos para a separação dos grupos controle, SCD, SCD_HDU na PLS-DA.



Fonte: Pesquisa da própria autora

Figura 23 – Heat map. Concentrações dos metabólitos nos grupos controle, SCD, e SCD_HDU, apresentadas através de um gradiente de cores, representado pela faixa de numeração de -1 a 1, onde a concentração é crescente.

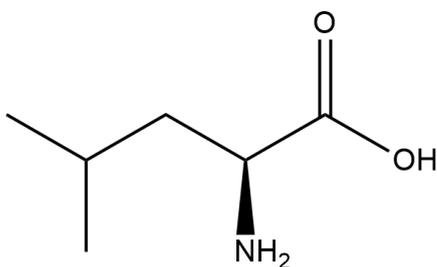


Fonte: Pesquisa da própria autora

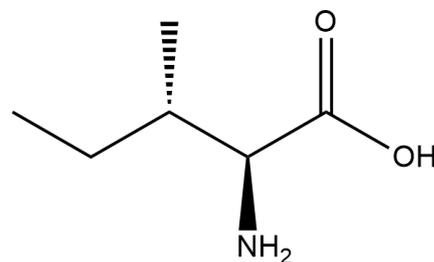
Observando o mapa de calor, entre todos os metabólitos, o azelato está em maior nível no grupo SCD. Depois vêm os metabólitos que têm níveis intermediários em ordem decrescente de concentração: os ácidos graxos e prolina, que possuem o mesmo nível; glicerol e formato também no mesmo nível; ácido 3-hidroxi-butírico; e acetona, glicina e VLDL, no mesmo nível. Os demais metabólitos deste grupo estão em níveis baixos.

Tratando-se do grupo controle, os seguintes metabólitos apresentam níveis baixos em ordem crescente: o azelato; glicerol, ácidos graxos e prolina, no mesmo nível e leucina/isoleucina. A creatina/creatinina e acetato, que estão em ordem crescente, possuem níveis intermediários. Os demais metabólitos encontram-se em níveis altos.

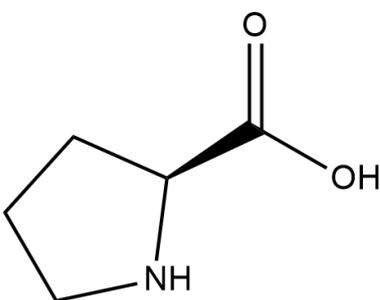
Os seguintes metabólitos têm níveis altos em ordem decrescente no grupo SCD_HDU: glicerol, leucina/isoleucina, e creatina/creatinina, no mesmo nível; ácidos graxos, prolina e acetato, no mesmo nível; e azelato e N-óxido de trimetilamina, no mesmo nível. Em níveis intermediários em ordem decrescente estão: alanina; 4-hidroxi-benzoato, citrato e fenilalanina, no mesmo nível; lactato; histidina e glicose, ácido 2-hidroxi-butírico e colina contendo metabólitos, no mesmo nível. Os demais metabólitos estão em níveis baixos. Seguem nomes e fórmulas estruturais dos metabólitos que possuem VIP scores que variam aproximadamente de 1,0 a 2,0.



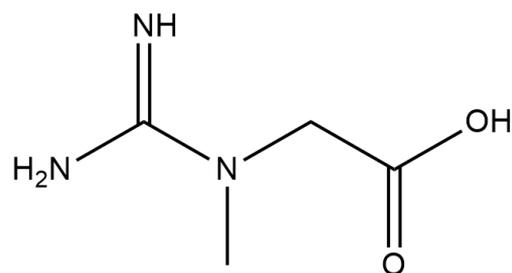
Leucina



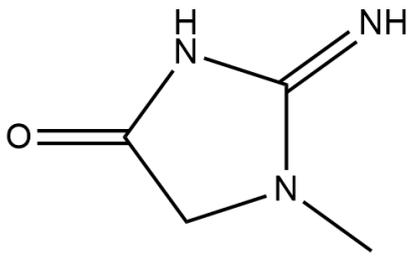
Isoleucina



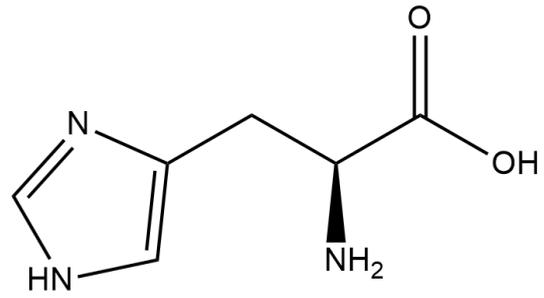
Prolina



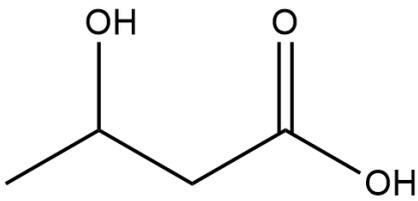
Creatina



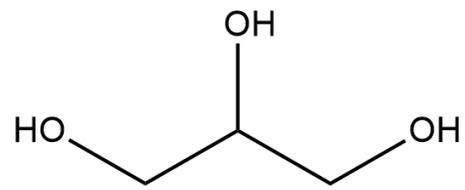
Creatinina



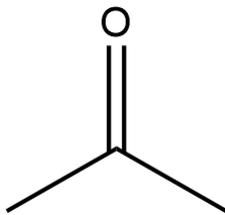
Histidina



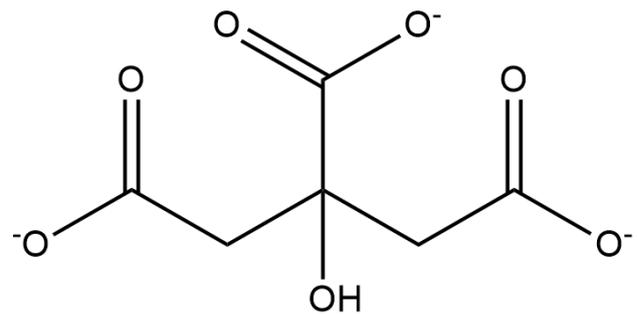
Ácido 3-Hidroxibutírico



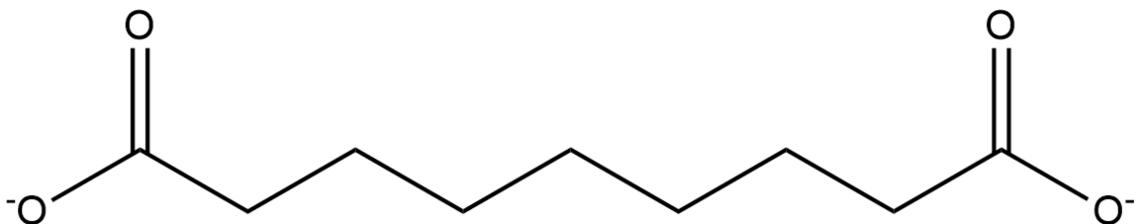
Glicerol



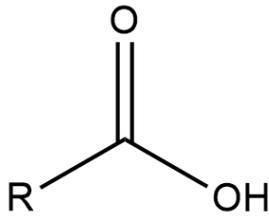
Acetona



Citrato



Azelato

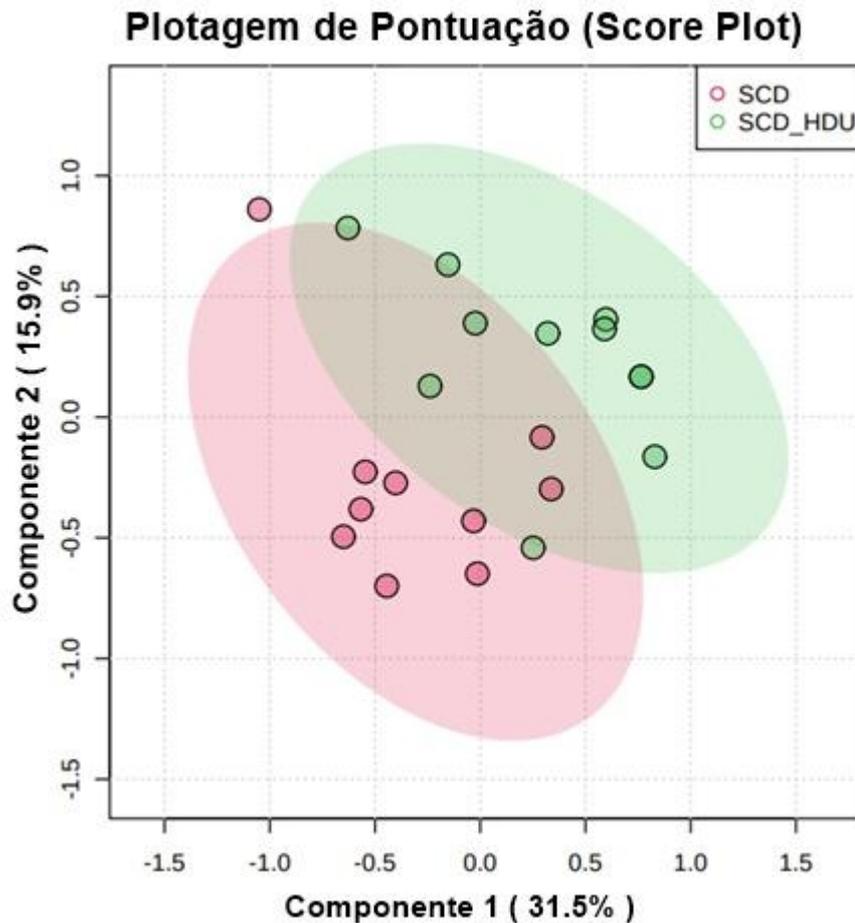


Ácido graxo

5.4.4 Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais – PLS-DA dos grupos SCD e SCD_HDU

Uma análise de componentes principais foi feita nos dados dos espectros pré-tratados e centrados na média, para verificar as tendências com respeito aos grupos SCD e SCD_HDU. Na Figura 24, as amostras dos dois grupos estão dispersas no gráfico de escores de componente 1 *versus* componente 2, descrevendo 47,4 % da variância total dos dados. O gráfico de escores de componente 1 *versus* componente 2 descreve 31,5 % e 15,9 % da informação dos dados originais, respectivamente. Uma linha vertical na origem mostra alguma tendência na distribuição: 6 amostras do grupo SCD_HDU tendem a ter escores positivos e 6 amostras do grupo SCD tendem a ter escores negativos. Pode ser observada a dissimilaridade do perfil metabólico dos grupos SCD e SCD_HDU. Para a discriminação dos grupos foi usado o método PLS-DA, com os dados centrados na média e autoescalado pelo escalamento de Pareto, usado para o tratamento de dados metabólicos.

Figura 24 – Análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais – PLS-DA. Gráfico de escores de componente 1 *versus* componente 2, descrevendo 47,4 % da variância total dos dados. Dissimilaridade dos grupos SCD e SCD_HDU.



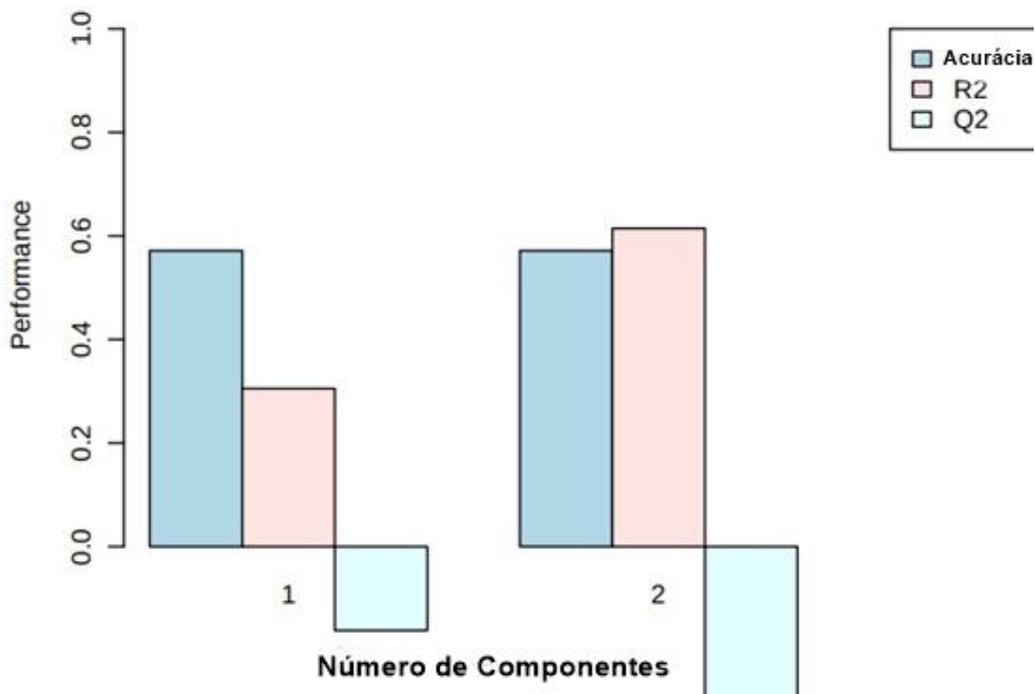
Fonte: Pesquisa da própria autora.

5.4.5 Validação cruzada da PLS-DA dos grupos SCD e SCD_HDU

A validação cruzada foi feita para testar a PLS-DA dos grupos SCD e SCD_HDU, e obteve-se um gráfico que mostra o desempenho da acurácia, R^2 e Q^2 das componentes 1 e 2, apresentado na Figura 25.

Podem ser observados no gráfico da Figura 25, para a componente 2: acurácia = 0,57; R^2 = 0,62; e Q^2 = -0,33. Estes parâmetros são melhores quando os desempenhos estão mais próximos de 1.

Figura 25 – Validação cruzada da PLS-DA dos grupos SCD e SCD_HDU. Desempenho da acurácia, R^2 e Q^2 das componentes 1 e 2.



Fonte: Pesquisa da própria autora.

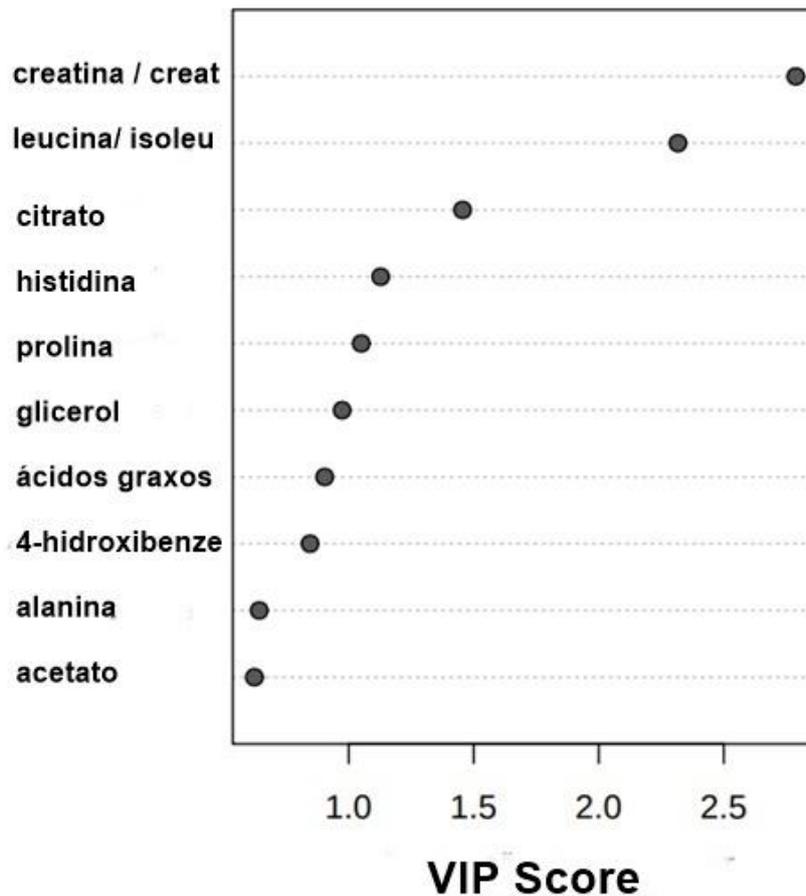
5.4.6 VIP scores e Heat map dos grupos SCD e SCD_HDU

Os metabólitos com maiores VIP scores são os que mais contribuem para a separação dos grupos SCD e SCD_HDU na PLS-DA. As VIP scores mostradas na Figura 26, variam aproximadamente, de 0,5 a 2,75, para os seguintes metabólitos: creatina/creatinina, leucina/isoleucina, citrato, histidina, prolina, glicerol, ácidos graxos, 4-hidroxibenzenoacetato, alanina e acetato.

Os seguintes metabólitos possuem VIP scores maiores ou iguais a 1,0: a creatina/creatinina, que possui VIP score mais alto, próximo de 2,75; logo depois vem a leucina/isoleucina, próximo de 2,3; o citrato, próximo de 1,4, histidina, próximo de 1,1 e a prolina, próximo de 1,0. O mapa de calor (Figura 27) apresenta as concentrações dos metabólitos nos dois grupos através do gradiente de cores representado pela faixa com numeração de -0,6 a 0,6, onde a concentração é crescente. De acordo com o Heat map, a creatina/creatinina, leucina/isoleucina,

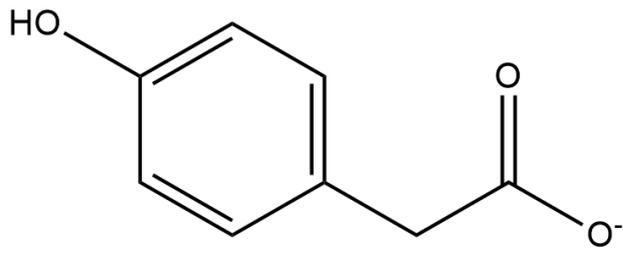
citrato, histidina e prolina estão em altas concentrações no grupo SCD_HDU e baixas no grupo SCD. O uso da hidroxiureia eleva as concentrações da creatina/creatinina, leucina/isoleucina, citrato, histidina e prolina .

Figura 26 – VIP (variable influence on projection) scores. Metabólitos contributivos para a separação dos grupos SCD e SCD_HDU na PLS-DA.

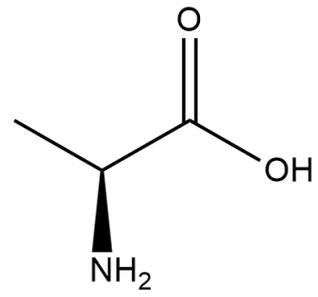


Fonte: Pesquisa da própria autora.

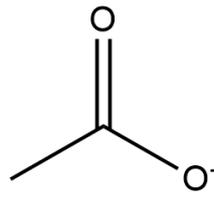
No mapa de calor, os seguintes metabólitos estão em concentrações altas no grupo SCD e baixas no grupo SCD_HDU: glicina, VLDL, formato, ácido 3-hidroxi butírico e acetona. Os demais metabólitos possuem concentrações altas no grupo SCD_HDU e baixas no grupo SCD. Seguem nomes e fórmulas estruturais dos metabólitos que possuem VIP scores que variam aproximadamente de 0,5 a 2,75. A creatina/creatinina, leucina/isoleucina, citrato, histidina, prolina, glicerol e ácidos graxos encontram-se na seção 5.3.3.



4-Hidroxibenzenoacetato

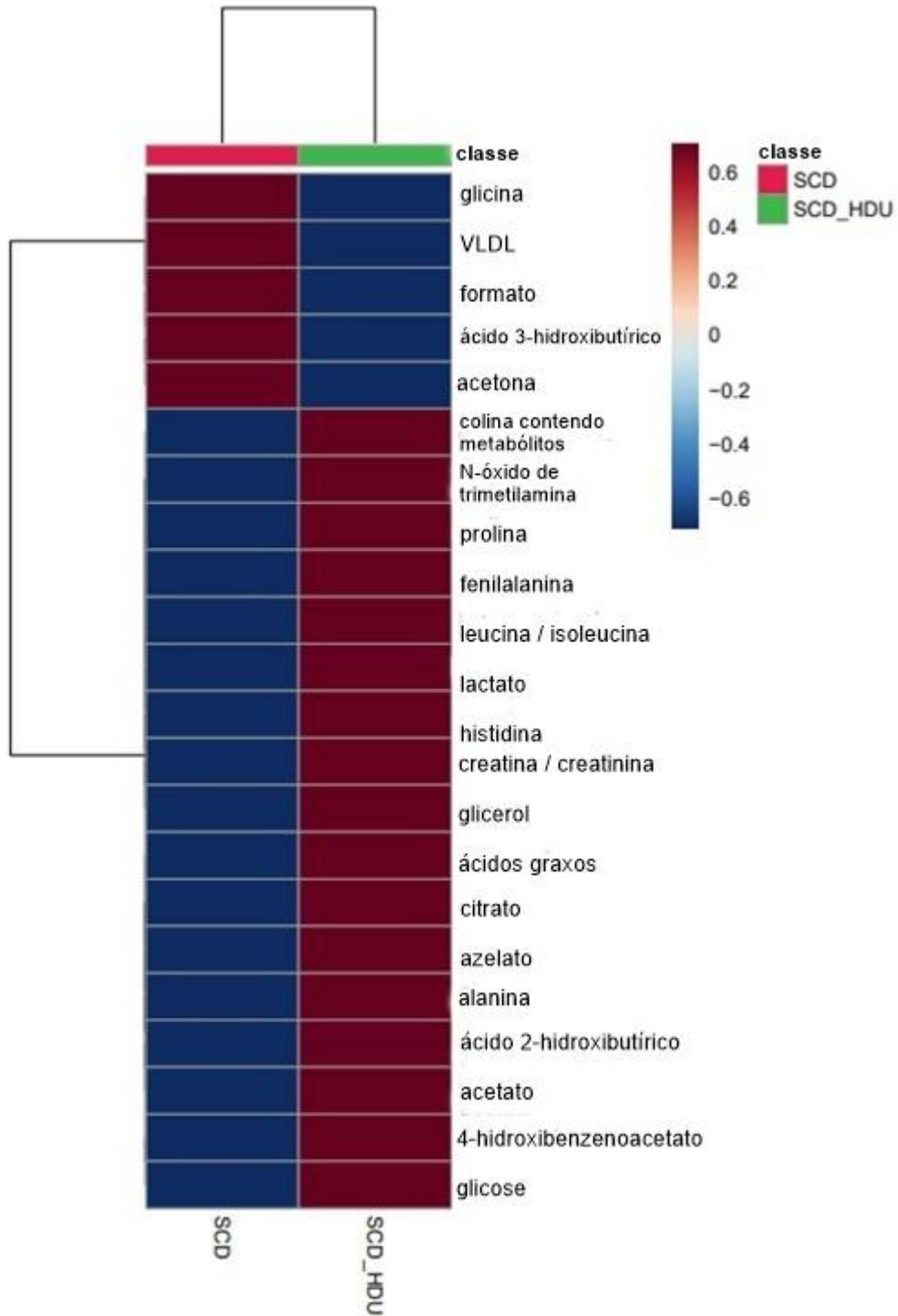


Alanina



Acetato

Figura 27 – Mapa de calor. Concentrações dos metabólitos nos grupos SCD e SCD_HDU, apresentadas através de um gradiente de cores, representado pela faixa de numeração de -0,6 a 0,6, onde a concentração é crescente.



Fonte: Pesquisa da Própria autora.

5.5 ALGUNS METABÓLITOS E A ANEMIA FALCIFORME

A leucina/isoleucina, prolina, creatina/creatinina e a histidina são metabólitos que entre outros, contribuem para a discriminação na análise dos três grupos e dos grupos SCD e SCD_HDU. A alanina contribui apenas na segunda análise. De acordo com Santos (2019), o consumo isolado de aminoácidos de cadeia ramificada, dentre eles a leucina e isoleucina, associado ao exercício físico resistido, estimula a síntese de proteínas muscular, e segundo Albaugh (2017), a prolina, outro aminoácido, é importante para a biossíntese, estrutura e força do colágeno. Este, para Silva (2012), é uma proteína fibrosa encontrada nos tecidos conjuntivos do corpo, tem a função de contribuir com a resistência e elasticidade dos tecidos.

Albaugh (2017) afirma que a disponibilidade de nutrientes, especialmente aminoácidos, é crítica para a cicatrização de feridas e pode ser medida por uma série de fatores, incluindo cura concluída com sucesso e ausência de infecção ou outras complicações. A leucina/isoleucina e a prolina encontram-se em altas quantidades no grupo de participantes que utilizam a hidroxiureia, o que sugere a atuação deste medicamento em prevenir e remediar ulcerações de pernas e danos crônicos em órgãos ocorridos na anemia falciforme.

Conforme Dembélé (2020), os níveis de prolina e alanina foram relativamente diminuídos durante a crise vaso-oclusiva. Assim, os altos níveis de prolina e alanina no grupo SCD_HDU resultantes das análises, estão associados à diminuição de crise vaso-oclusiva. Além disso, este autor afirma que no plasma, uma característica marcante da assinatura metabólica, foi a alteração de NO. De acordo com Nahavand (2000), estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador, pode ser parcialmente responsável pelo efeito benéfico do HU.

De acordo com esta pesquisa, Ribeiro (2021) afirma que os níveis de prolina aumentam nos grupos SCD e SCD_HDU sugerindo uma resposta metabólica anti-estresse potencial para coexistir com os estados inflamatórios e oxidativos produzidos pela anemia falciforme.

Segundo Gualano (2008), a creatina é uma amina nitrogenada sintetizada no fígado, rins e pâncreas a partir dos aminoácidos glicina e arginina, tendo também metionina como doadora de metila. De acordo com Clark (1998), a creatina é convertida espontaneamente em creatinina, a qual é excretada pelos rins. Nesta

pesquisa as altas quantidades de creatina/creatinina nos participantes que utilizam a hidroxiureia implicam na existência de reservas de arginina e conforme Ribeiro (2021), o NO é produto do catabolismo deste aminoácido, o que demonstra um efeito benéfico da hidroxiureia.

Clark (1998) afirma que o excesso de creatina obtida pela suplementação geraria uma sobrecarga ao ser excretada, prejudicando a função renal, porém não há evidências sustentáveis. Assim, não pode ser afirmada a disfunção renal nestes participantes por possuírem altas quantidades de creatina/creatinina. E ainda, de acordo com Kapoor (2018), para o Ensaio Clínico Pediátrico de Fase III da Hidroxiureia não houve diferença na função renal em crianças tratadas com placebo versus hidroxiureia.

Para Jennings (2015), vários aminoácidos, incluindo histidina, mostraram modulares as concentrações de óxido nítrico, um potente vasodilatador. A histidina apresenta baixa concentração no grupo SCD, o que pode ter como consequência a ocorrência da vaso-oclusão.

6 CONCLUSÃO

A análise metabolômica possibilitou uma avaliação do plasma sanguíneo de crianças e adolescentes com anemia falciforme e um estudo da hidroxiureia. Este é um medicamento singular usado no tratamento desta doença que atinge certa parte da população brasileira. Os objetivos desta pesquisa foram alcançados, seguindo-se o planejamento experimental da análise metabolômica.

Através da liofilização, as propriedades das amostras de plasma foram conservadas e na otimização de protocolo de aquisição dos espectros de RMN ^1H foi selecionado um experimento com determinados parâmetros que permitiu a obtenção de um gráfico com uma melhor visualização dos sinais, expressando um maior número de metabólitos e ausência dos largos sinais de proteínas.

A análise por RMN ^1H permite por meio dos deslocamentos químicos e da multiplicidade dos sinais, a identificação de metabólitos. O alinhamento dos picos antecede a quantificação dos metabólitos, que é fornecida pela integração dos picos. Os metabólitos identificados no plasma sanguíneo dos três grupos variavam em quantidades.

Ao realizar as análises estatísticas, a PLS-DA evidenciou uma tendência de separação do grupo controle dos outros dois grupos, causada pela diferença do perfil metabólico desses. A separação entre os grupos SCD_HDU e SCD também foi revelada. A validação cruzada foi utilizada para testar as análises PLS-DA, obtendo-se gráficos de desempenho da acurácia, R^2 e Q^2 .

Os metabólitos com VIP scores maiores ou iguais a 1 são os que mais contribuem para a separação dos grupos de participantes. Na análise dos três grupos, estes metabólitos são: a leucina/isoleucina, prolina, ácidos graxos, creatina/creatinina, histidina, ácido 3-hidroxiбутírico, glicerol e acetona. De acordo com o Heat map, a leucina/isoleucina, prolina, ácidos graxos, creatina/creatinina e glicerol possuem maiores concentrações no grupo SCD_HDU, e a histidina, ácido 3-hidroxiбутírico e acetona possuem maiores concentrações no grupo controle.

Analisando os grupos SCD e SCD_HDU, os metabólitos que possuem VIP scores maiores ou iguais a 1,0 são: a creatina/creatinina, leucina/isoleucina, citrato, histidina, e a prolina. De acordo com o mapa de calor, a creatina/creatinina,

leucina/isoleucina, citrato, histidina e prolina estão em altas concentrações no grupo SCD_HDU e baixas no grupo SCD.

Os resultados mostram a dissimilaridade dos grupos controle e SCD. A ocorrência da anemia falciforme aumenta os níveis de prolina, ácidos graxos e glicerol, e reduz os níveis de creatina/creatinina, histidina, ácido 3-hidroxibutírico e acetona. O tratamento com hidroxureia eleva os níveis de leucina/isoleucina, prolina, ácidos graxos, creatina/creatinina, histidina e glicerol. E reduz os níveis de ácido 3-hidroxibutírico e acetona.

Assim, houve uma alteração das vias metabólicas de certos metabólitos, que levaram a um aumento das quantidades dos mesmos no grupo SCD_HDU. Tais metabólitos podem ser considerados como biomarcadores. A presença da hidroxureia possibilita mudanças nas vias metabólicas alterando as concentrações dos metabólitos no plasma, podendo ser percebidas também as diferenças de concentrações de metabólitos no plasma dos grupos controle e SCD.

Os altos níveis de leucina/isoleucina e prolina nos participantes que utilizam a hidroxureia sugerem a atuação deste medicamento em prevenir e remediar ulcerações de pernas e danos crônicos em órgãos ocorridos na anemia falciforme. Os altos níveis de prolina e alanina no grupo SCD_HDU resultantes das análises, estão associados à diminuição de crise vaso-oclusiva. Além disso, uma característica marcante da assinatura metabólica no plasma é a alteração de NO, que é um potente vasodilatador e pode ser parcialmente responsável pelo efeito benéfico da HU.

Os níveis de prolina aumentados nos grupos SCD e SCD_HDU sugere uma resposta metabólica anti-estresse coexistindo com os estados inflamatórios e oxidativos produzidos pela anemia falciforme. As altas quantidades de creatina/creatinina nos participantes que utilizam a hidroxureia implicam na existência de reservas de arginina que produz o NO, demonstrando um efeito benéfico da hidroxureia.

Nesta pesquisa, devido às altas quantidades de creatina/creatinina nos participantes que utilizam a hidroxureia, a disfunção renal não pode ser afirmada. Não houve diferença na função renal em crianças tratadas com placebo versus hidroxureia. No grupo SCD a histidina apresenta baixa concentração, o que pode ter como consequência a ocorrência da vaso-oclusão devido à diminuição da concentração de óxido nítrico.

O conjunto de metabólitos do plasma de crianças e adolescentes com anemia falciforme pode ser estudado, assim como a hidroxiureia, fazendo-se uma avaliação metabólica. Desta maneira, foi possível encontrar metabólitos com suas quantidades comparativas característicos desta doença, como também perceber o efeito da hidroxiureia no conjunto de metabólitos dos pacientes.

Esta pesquisa demonstra que a hidroxiureia contribui no tratamento de pacientes com anemia falciforme, já que este medicamento acarreta o aumento das quantidades de determinados metabólitos no plasma, que propiciam melhor qualidade de vida destes pacientes.

O presente estudo é considerado relevante, pois revela que, através da análise metabólica, podem ser obtidas informações sobre a anemia falciforme, assim como a utilização da hidroxiureia. Além disso, servirá para futuras investigações científicas relacionadas com o tema desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, Rohit Kumar. **Hydroxyurea in sickle cell disease: drug review**. Indian J Hematol Blood Transfs., v. 30 (2), 91-6, 2014 Jun.

ALBAUGH, Vance L. - **Proline precursors and collagen synthesis: biochemical challenges of nutrient supplementation and wound healing**. The Journal of Nutrition , volume 147, Issue 11, Pages 2011–2017, November 2017.

ALMEIDA, Renata A. de. - **Anemia Falciforme e abordagem laboratorial: uma breve revisão de literatura**. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 49 (2), 131-134, 17 fev 2017.

ALMEIDA, T.M.C. - **Sickle cell disease on children: a descriptive study**. Online braz j nurs, 11 (3), 763-77, 2012 Dec.

ALONSO, Arnald. **Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015**. Frontiers in bioengineering and biotechnology, volume 3, article 23, March 5, 2016.

Atlas de hematologia. Año1- Edición 1, Buenos Aires, Argentina: E.C. S.A., 2002.

BERNARD, Jean; LÉVY, Jean-Paul. - **Hematologia**. 9. ed. - Rio de Janeiro: MEDSI, 2000.

CANUTO, Gisele A. B. - **Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas**. Química Nova, Vol. 41, No. 1, 75-91, 2018.

CLARK, J. F. **Creatine: A review of its nutritional applications in sports**. Nutrition, v. 14, n. 3, p. 332-324, 1998.

CLISH, Clary B. - **Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine**. Cold Spring Harbor Molecular Case Studies, 1 (1), 2015 out.

DEMBÉLÉ, Klétigui Casimir. **Sickle Cell Disease: Metabolomic Profiles of Vaso-Occlusive Crisis in Plasma and Erythrocytes**. Journal of Clinical. Medicine, 2020, 9, 1092, 11 April 2020.

ELSHERIF, Laila. **Metabolomic analysis of plasma in patients with sickle cell disease with albuminuria - an exploratory study**, British Journal of Haematology, 2019, 185, 563-633, September 10, 2018.

ESPINDOLA, Foued S. – **Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas como genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica**. Biosci. J., Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 463-477, Mai/Jun 2010.

FERREIRA, Aurélio Buarque de Holanda. **Novo Aurélio século XXI: O dicionário da Língua Portuguesa**. 3. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.

FERREIRA, Márcia Miguel Castro. **Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas – São Paulo: Editora da Unicamp, 2015.

GARTNER, Leslie P.; HIATT, James L. – **Tratado de histologia em cores**. 3. ed. – Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2007.

GOWDA, GA Nagana. **Metabolomics-Based Methods for Early Disease Diagnostics: A Review**. Expert Rev Mol Diagn, 8(5), 617–633, 2008 September.

GUALANO, B. **A suplementação de creatina, prejudica a função renal?**. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v. 14, n. 1, p. 69-71, 2008.

GUALANO, B. **Effects of creatine supplementation on glucose tolerance and insulin sensitivity in sedentary healthy males undergoing aerobic training**. Amino Acids, v. 34, n.2, p.45-50, 2008.

ILESANMI, Oluwatoyin Olatundun. **Pathological basis of symptoms and crises in sickle cell disorder: implications for counseling and psychotherapy**. Hematology Reports, 2 (1), 10-23, January 26, 2010

JENNINGS, Amy. **Amino Acid Intakes Are Inversely Associated with Arterial Stiffness and Central Blood Pressure in Women.** The Journal of Nutrition, Volume 145, Issue 9, Pages 2130–2138, September 2015.

JOBARD, Elodie. **A Systematic Evaluation of Blood Serum and Plasma Pre-Analytics for Metabolomics Cohort Studies.** Int J Mol Sci, 17(12), 2016 Dec 5.

JÚNIOR, J. F. H; ANDERSON, R. E; TATHAM, R. L; BLACK, W. C. **Análise Multivariada de Dados.** Tradução: Adonai Schlup Sant'Anna e Anselmo Chaves Neto. – 5. Ed. – Porto Alegre: Ed. Bookman, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. **Histologia básica.** 11. ed. - Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan S. A., 2008.

KAPOOR, Sargam. **Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease.** Mayo Clinic Proceedings, 93(12), 1810-1824, 2018 Dec.

LORENZI, Therezinha F. - **Manual de hematologia.** Propedêutica e clínica. 2. ed. - Rio de Janeiro: MEDSI, 1999.

LYRA, Isa Menezes. **Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 21(4), 1287-1290, jul-ago, 2005.

MORA-ORTIZ, Marina. **NMR metabolomics identifies over 60 biomarkers associated with Type II Diabetes impairment in *db/db* mice.** Metabolomics, 15 (6), 89, 2019 June 10.

NAHAVAND, Masoud. **Nitric oxide metabolites in patients with sickle cell anemia after oral administration of hydroxyurea.** Hematology, 5 (4), 335-339, July 27, 2000.

PARISE, Leslie V. - **Sickle cell disease: challenges and progress.** Blood, 127(7), 789, 2016 Feb 18.

PAVIA, Donald L. et al. **Introdução à espectroscopia.** São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PONTES, João Guilherme M. - **NMR-based metabolomics strategies: plants, animals and humans**. Analytical Methods, 9 (7), 1078-1096, 2017 February.

PSYCHOGIOS, Nikolaos. **The Human Serum Metabolome**. PLoS ONE, Volume 6, Issue 2, February 2011.

REY, Luís. **Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

RIBEIRO, Paulo R. **Blood plasma metabolomics of children and adolescents with sickle cell anaemia treated with hydroxycarbamide: a new tool for uncovering biochemical alterations**. British Journal of Haematology, p. 922-931, 2021.

RUIZ-PEREZ. **So you think you can PLS-DA?** BMC Bioinformatics, 21, 2, 2020.

SANTOS, Carina de Sousa. **Consumo isolado de aminoácidos de cadeia ramificada e síntese de proteína muscular em humanos: uma revisão bioquímica**. Einstein, São Paulo, vol.17, no.3, 2019.

SCHRIMPE-RUTLEDGE, Alexandra C. - **Untargeted metabolomics strategies – Challenges and Emerging Directions**. J Am Soc Mass Spectrom, 27(12), 1897–1905, 2016 December.

SILVA-PINTO, Ana Cristina. **Clinical and hematological effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients: a single-center experience in Brazil**. Revista Paulista de Medicina, 131(4), 238-243, October 2013.

SILVA, Michelle C. - **Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São José do Rio Preto, vol.28, no.2, 144-148, Apr./June 2006.

SILVA, Ruan A. **¹H NMR-based metabolite profiling for biomarker identification**. Clinica Chimica Acta, v. 520, p. 269-279, 2020.

SILVA, Tatiane Ferreira da. **Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012.

SILVERTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X. - **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. - Rio de Janeiro: LTC, 2007.

TATTINI JR., Virgílio. **Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 42, n. 1, p. 127-136, jan. /mar., 2006.

WORLEY, Bradley. **Multivariate Analysis in Metabolomics**. Curr Metabolomics, 1(1), 92–107, 2013.

XU, Zhe-rong. **The efficacy of leucine in the synthesis of muscle protein, lean body mass and increased lean body mass in the elderly: a systematic review and meta-analysis**. Br. J. Nutr. 113 (1), 25-34, 2015 jan 14.

YIN, Peiyuan. **Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies**. Anal Bional Chem., 407(17), 4879–4892, 2015 Mar 4.

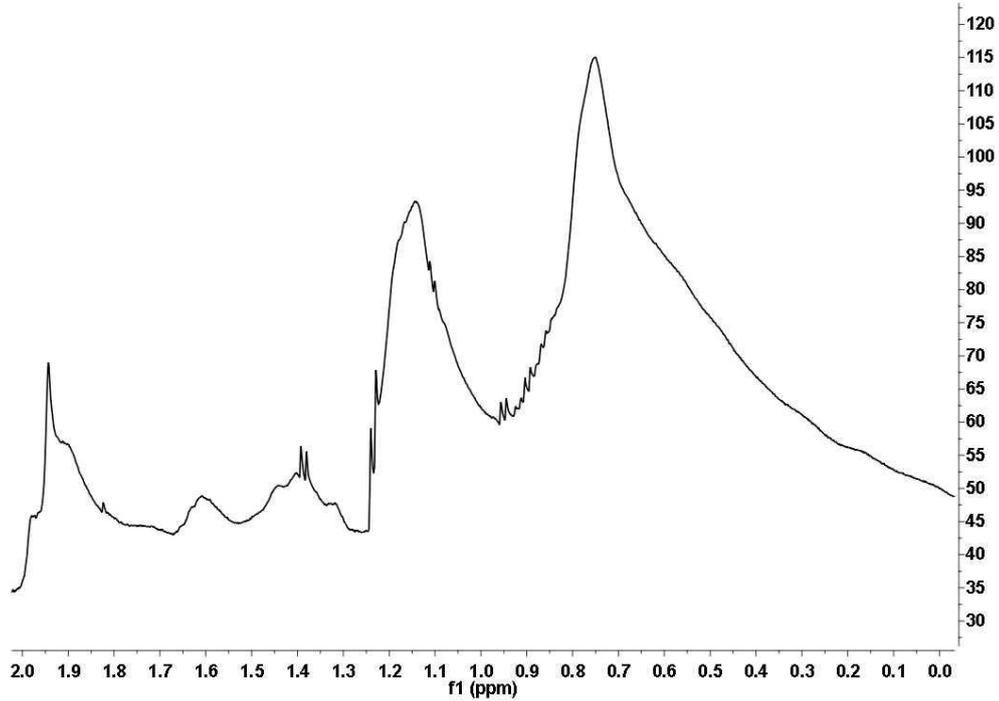
ZAGO, Marco Antonio. **Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos**. Revista brasileira de hematologia e Hemoterapia, 29(3), 207-214, set 2007.

TMSP-d4. Disponível em:

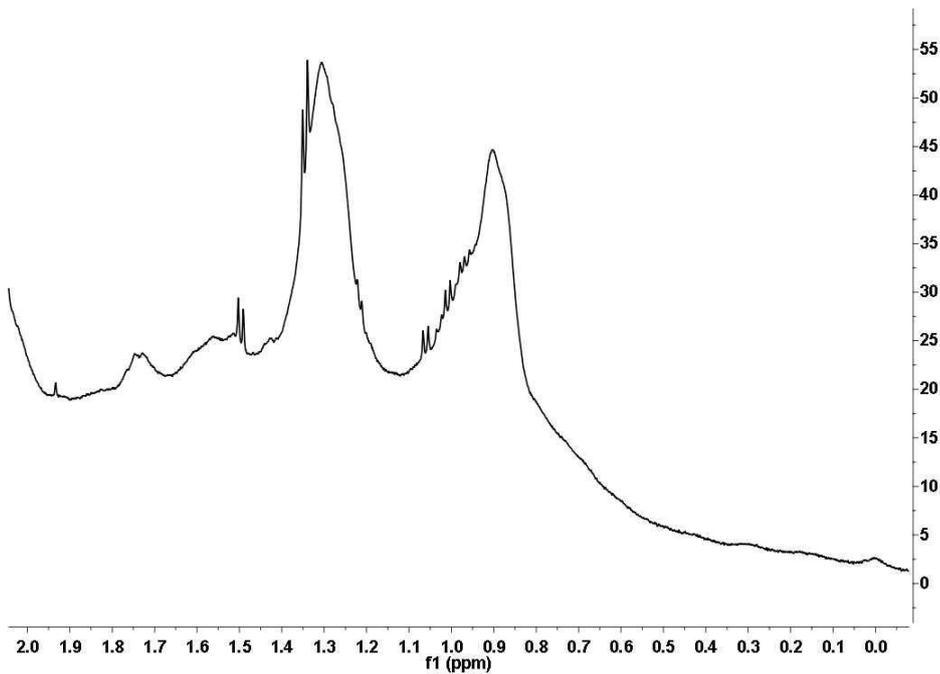
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23688921#section=Synonyms>. Acesso em: 29 mar 2021.

APÊNDICES

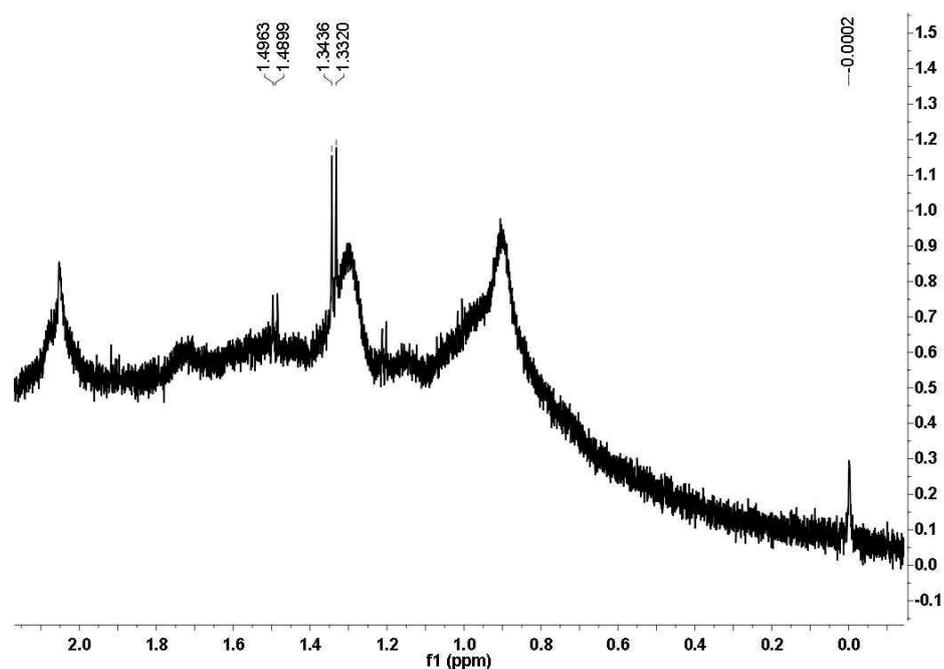
APÊNDICE A - Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Zg*; número de scans: 64; somente com D₂O.



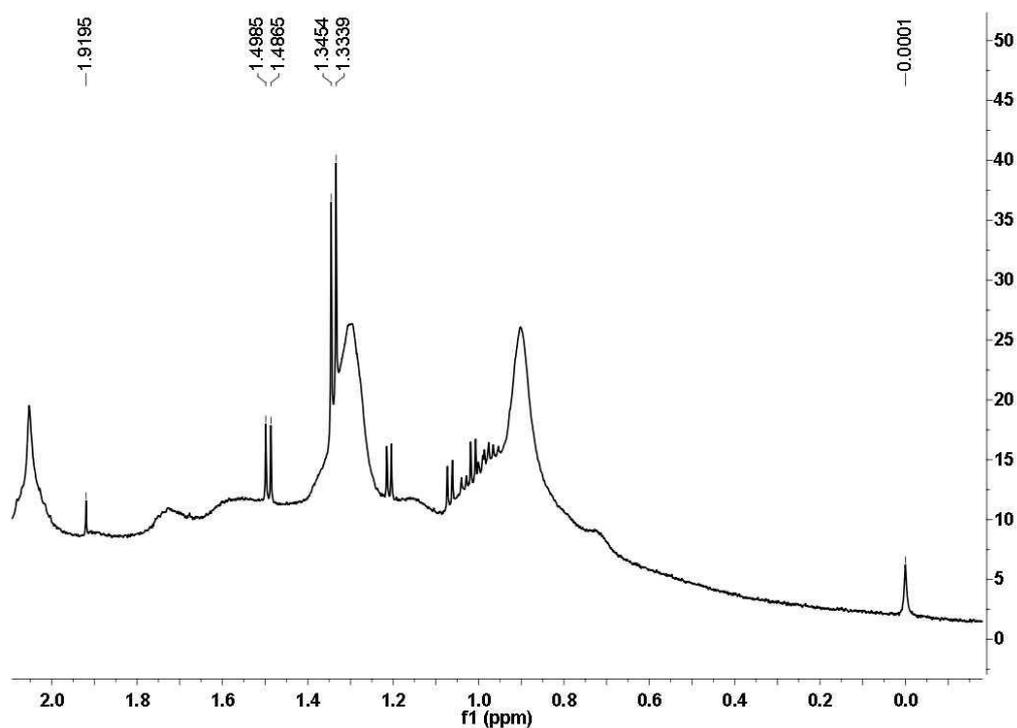
APÊNDICE B - Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Zgpr*; número de scans: 64; somente com D₂O.



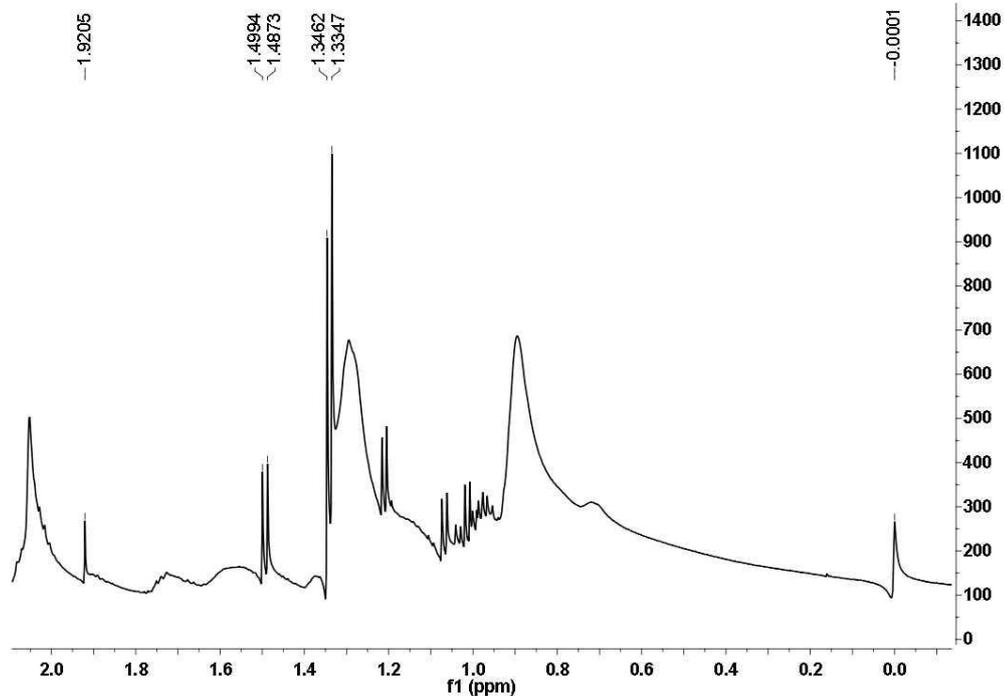
APÊNDICE C – Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Zg*; número de scans: 64; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 200:500.



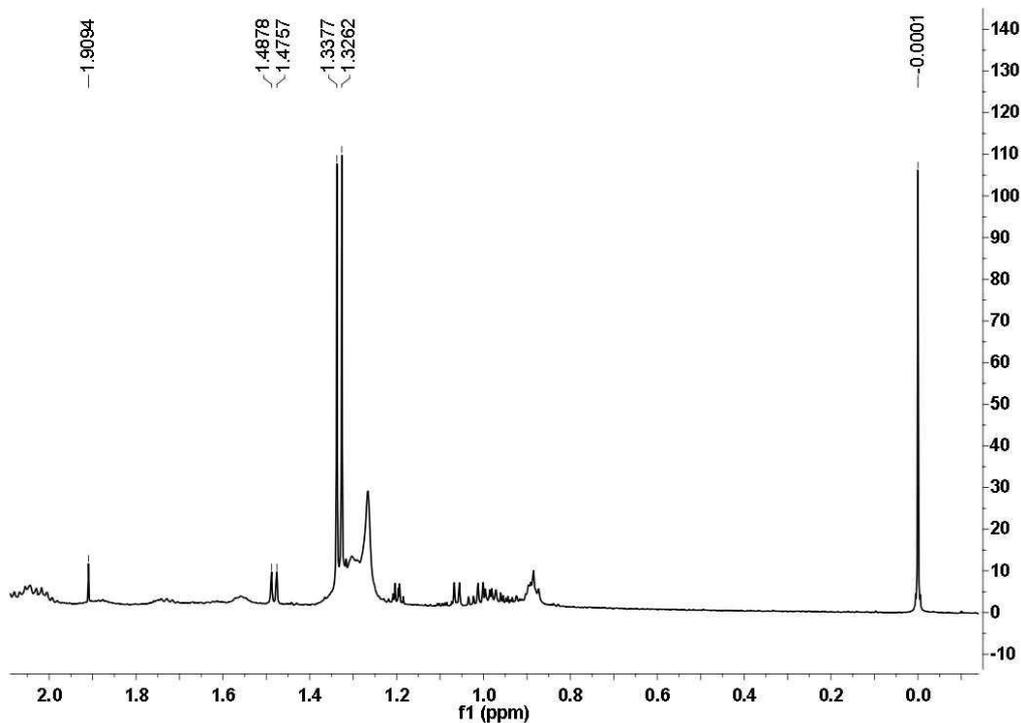
APÊNDICE D – Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Zgpr*; número de scans: 64; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 200:500.



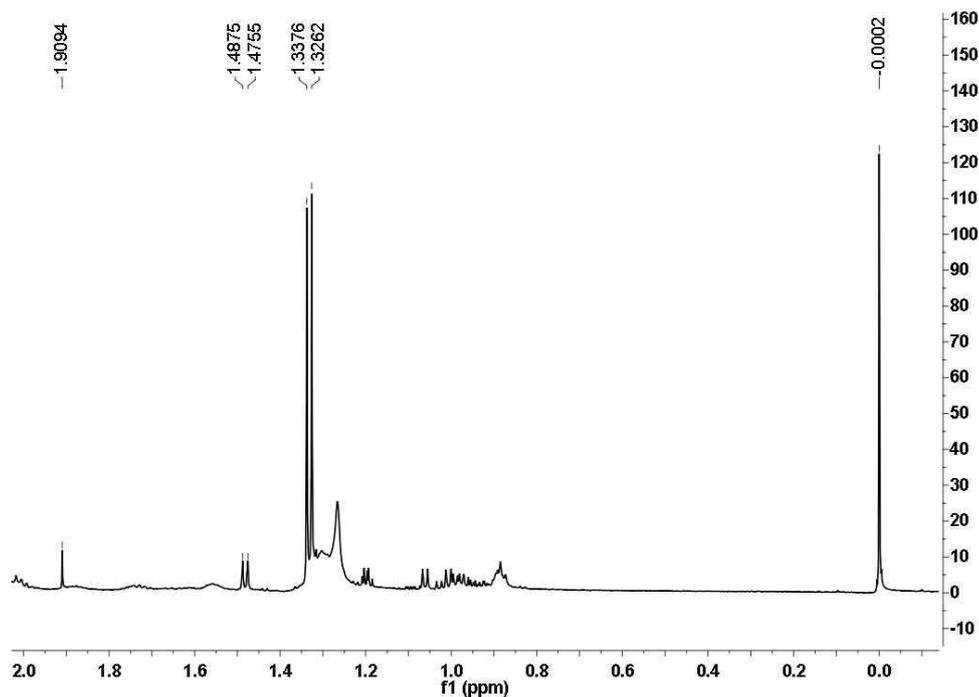
APÊNDICE E – Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Dupla supressão*; número de scans: 64; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 200:500.



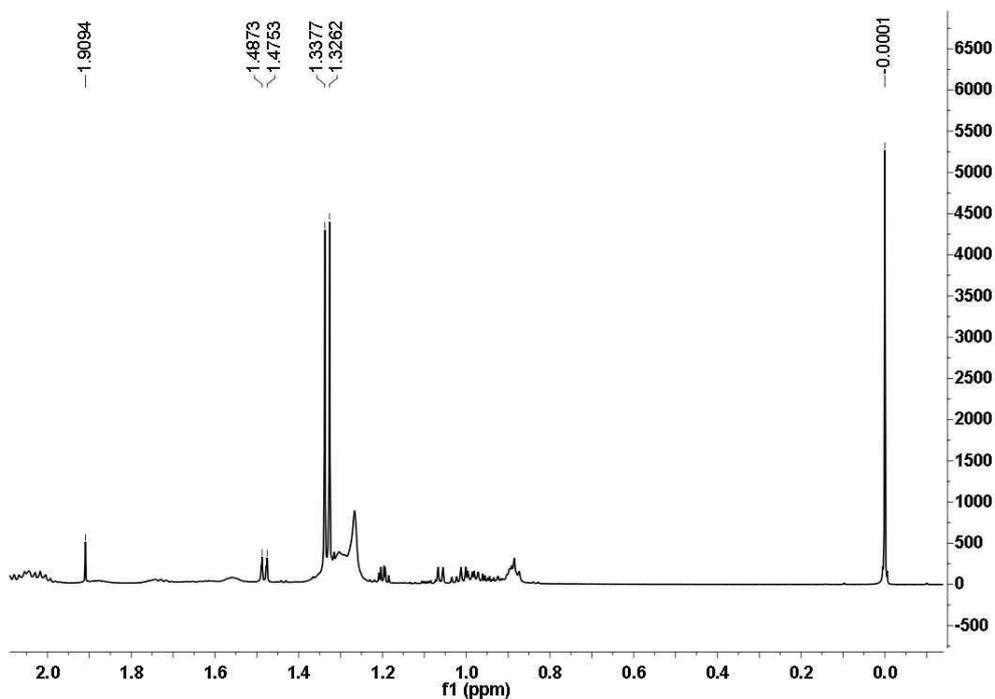
APÊNDICE F – Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Zg*; número de scans: 64; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 400:200.



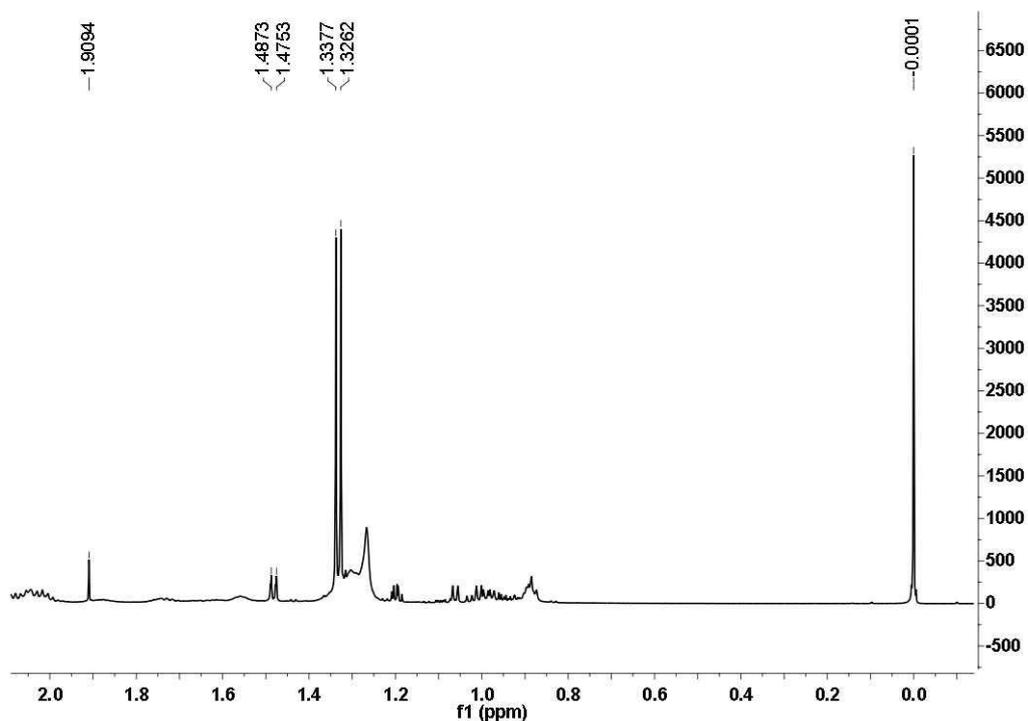
APÊNDICE G – Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Zgpr*, número de scans: 64; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 400:200.



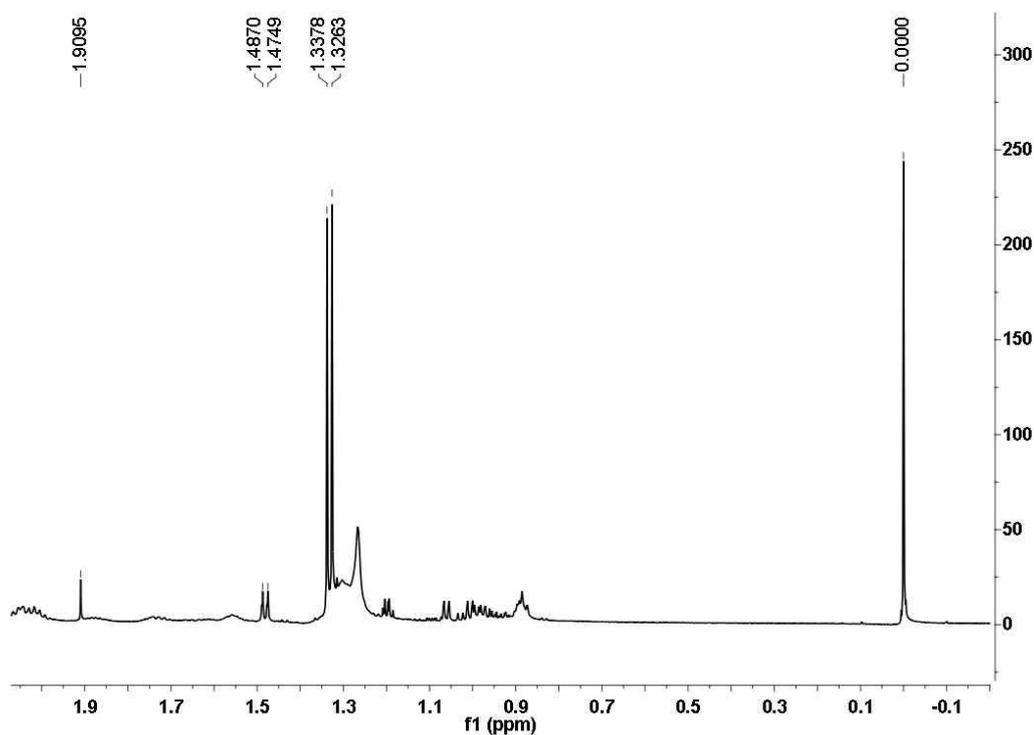
APÊNDICE H – Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Dupla supressão*, número de scans: 64; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 400:200.



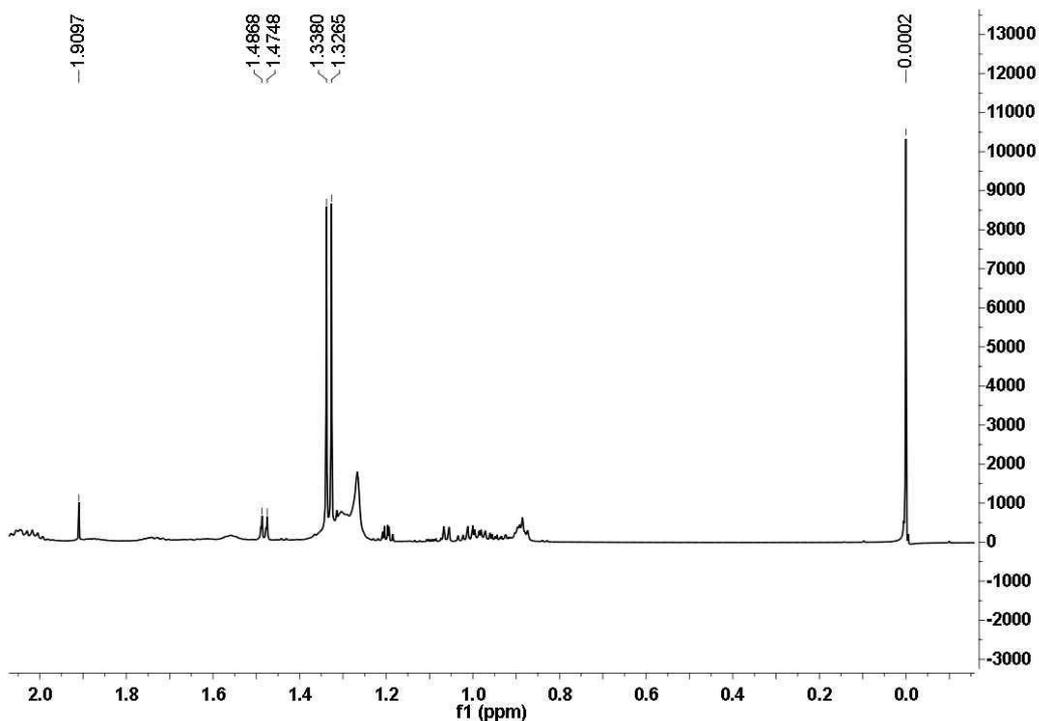
APÊNDICE I – Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Noesypr 1 d*; número de scans: 64; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 400:200.



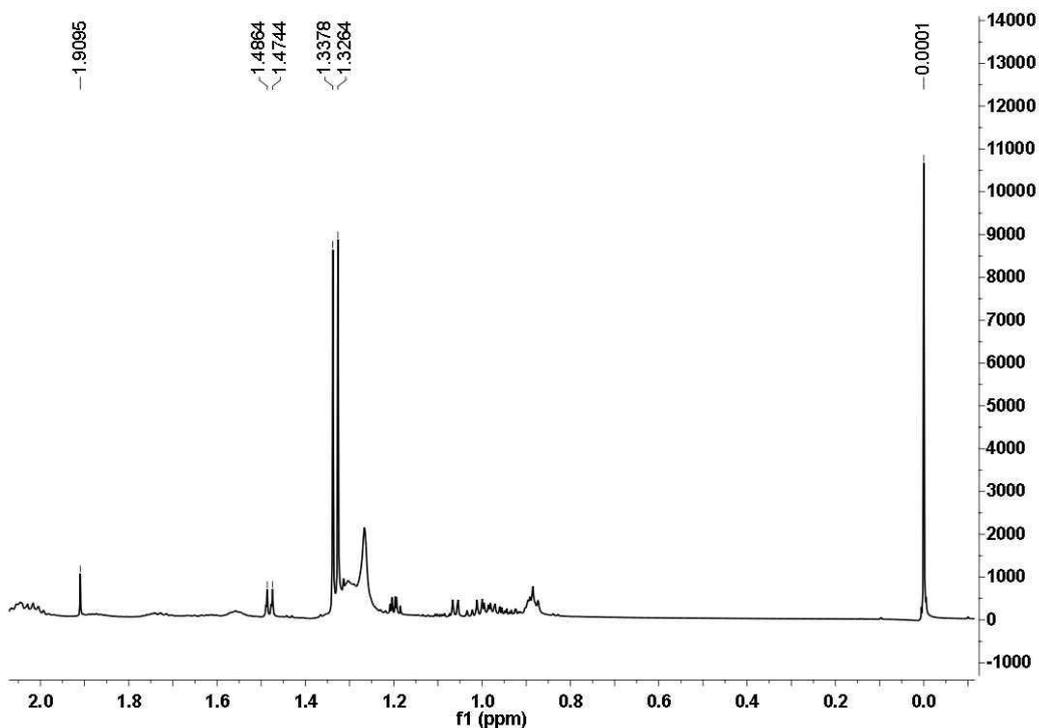
APÊNDICE J – Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Zgpr*; número de scans: 128; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 400:200.



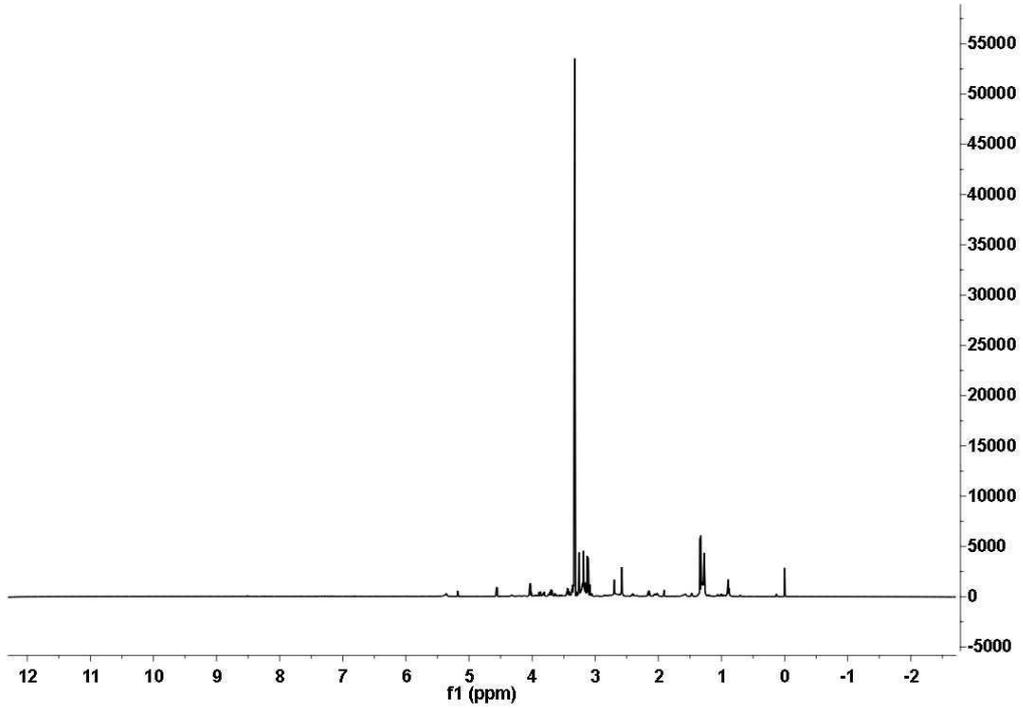
APÊNDICE K – Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Lcipnf2*; número de scans: 128; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 400:200.



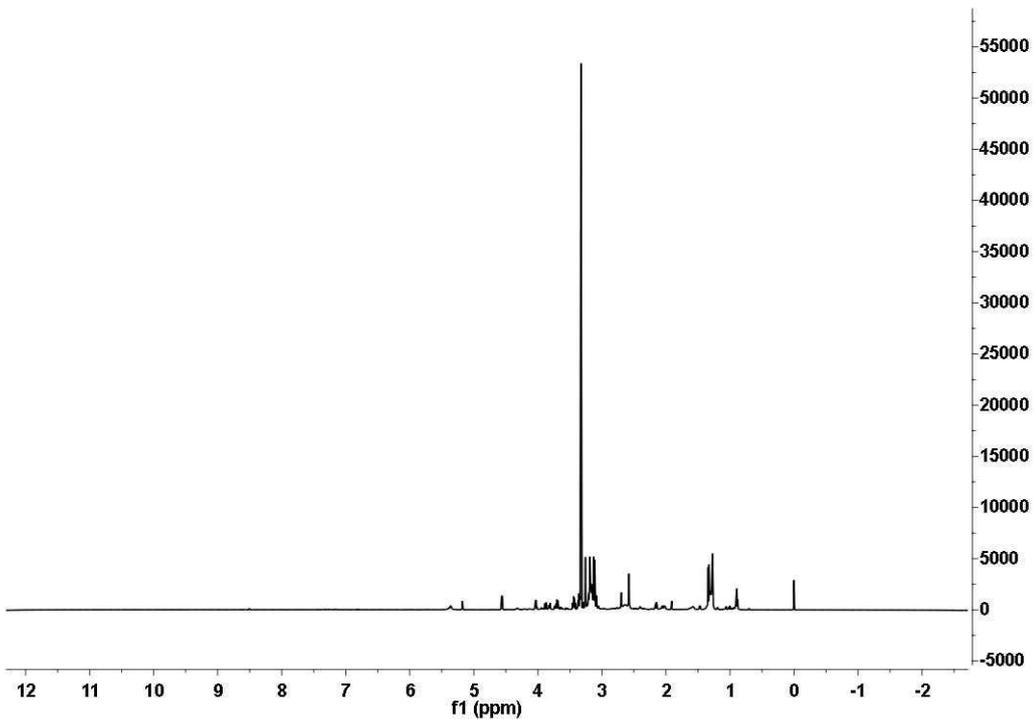
APÊNDICE L – Espectro de RMN obtido do experimento realizado para otimização de protocolo cujos parâmetros são: sequência de pulso: *Noesypr 1 d*; número de scans: 128; proporção CD₃OD:D₂O (μL): 400:200.



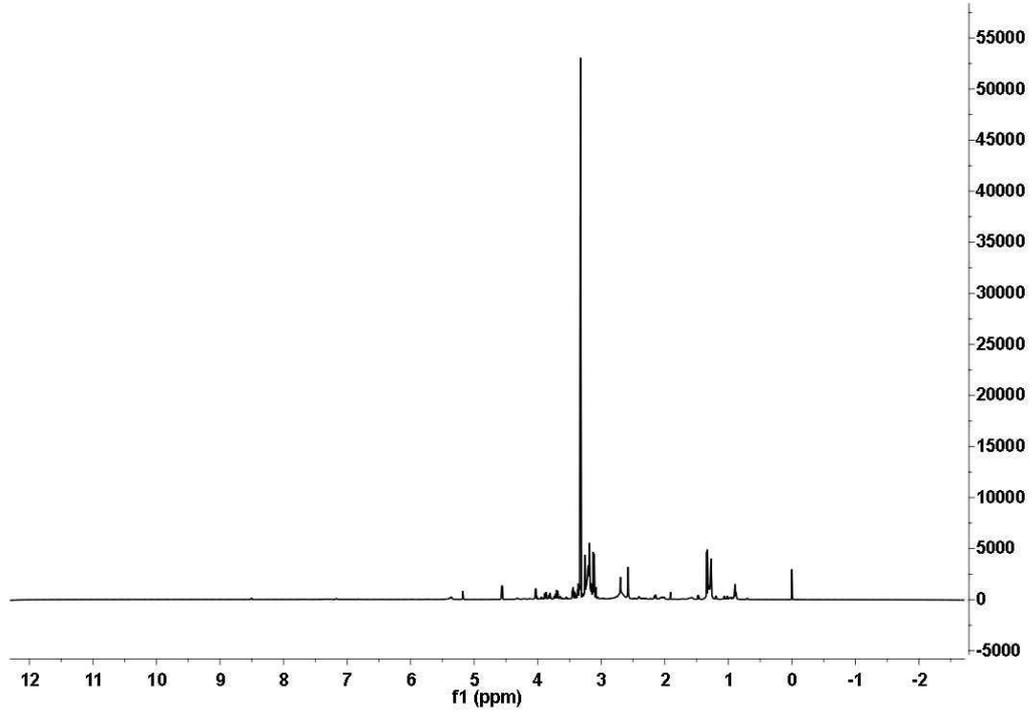
APÊNDICE M – Espectro de RMN obtido da análise da amostra PAM/003, pertencente ao grupo SCD_HDU.



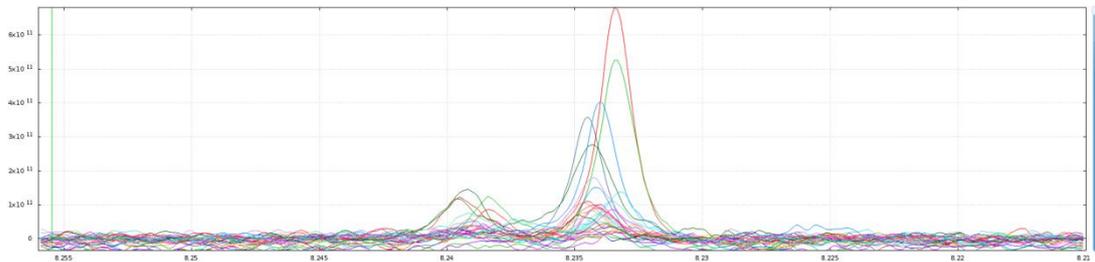
APÊNDICE N – Espectro de RMN obtido da análise da amostra PAM/011, pertencente ao grupo SCD.



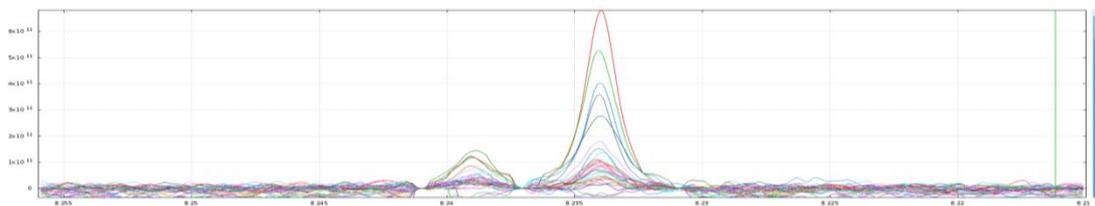
APÊNDICE O – Espectro de RMN obtido da análise da amostra PAM/021, pertencente ao grupo controle.

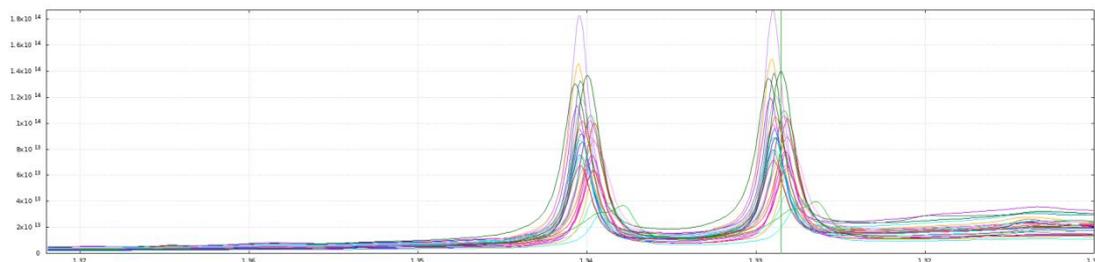
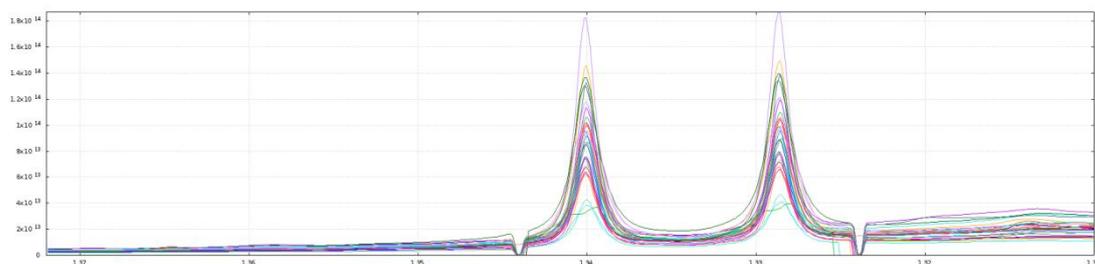
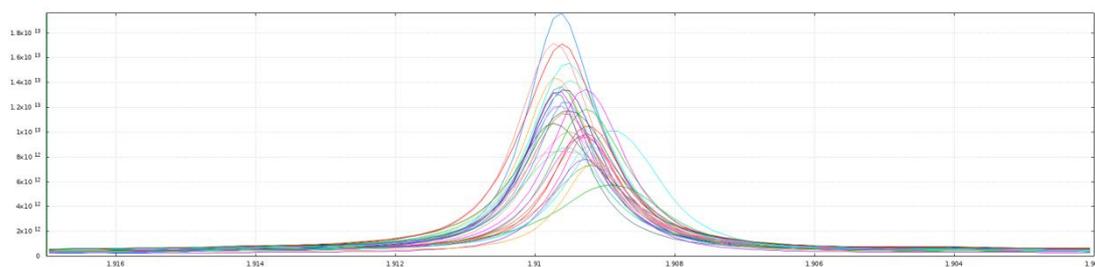
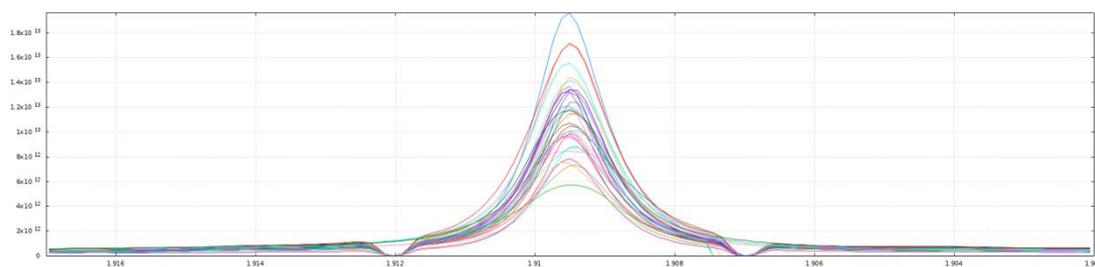


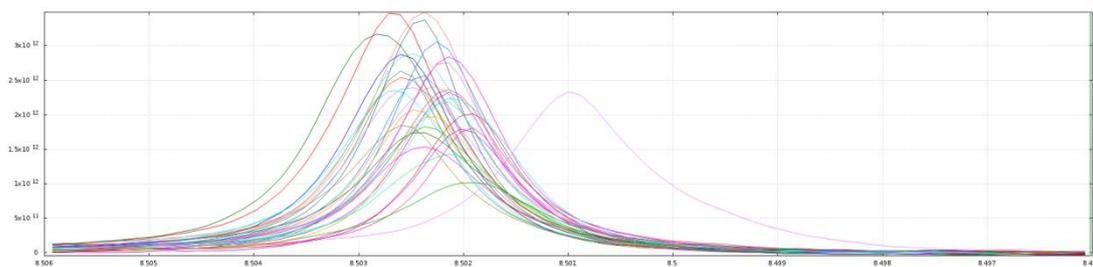
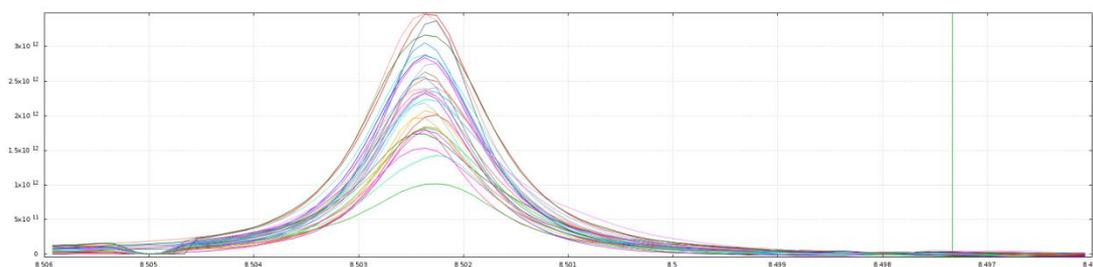
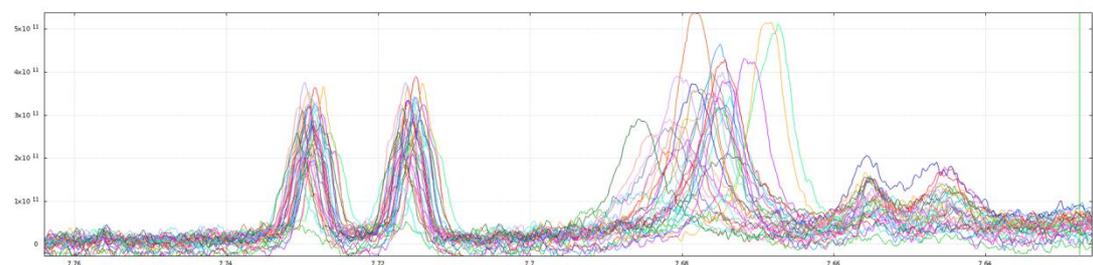
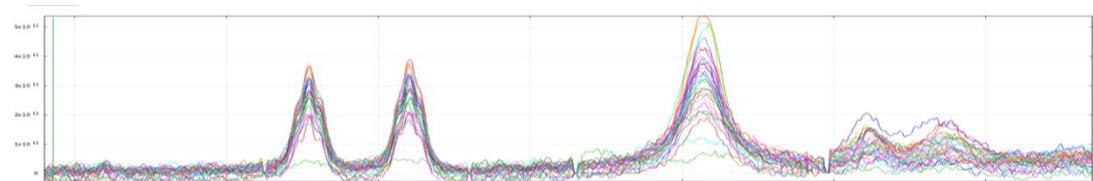
APÊNDICE P – Picos de metabólitos não identificados 2 e 3 desalinhados.

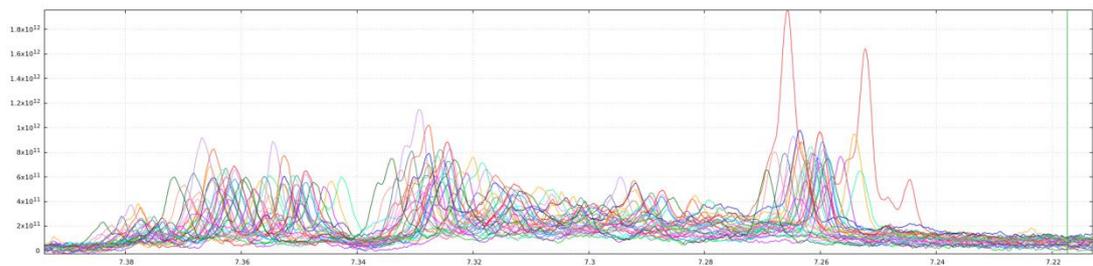
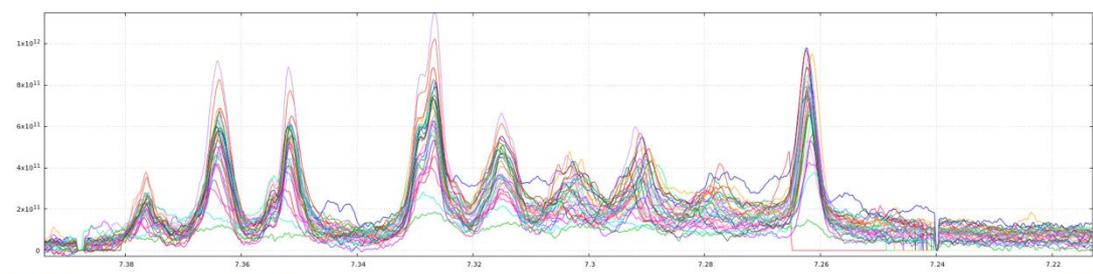
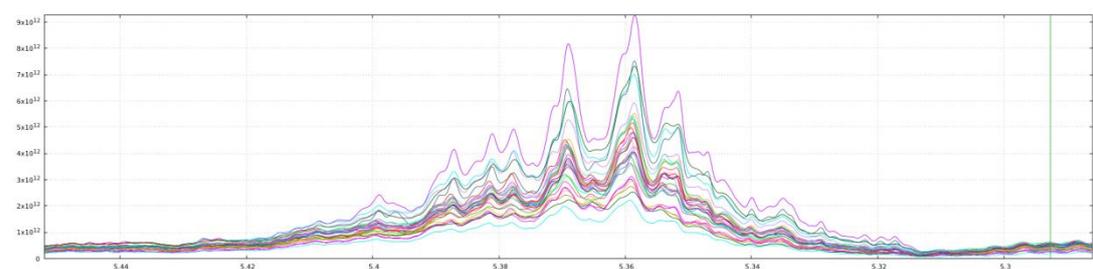
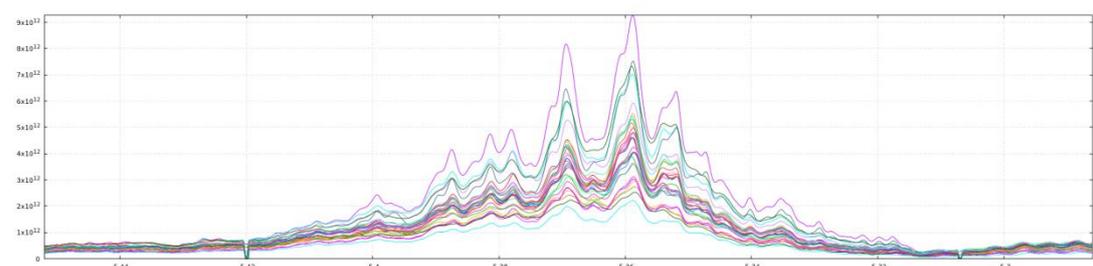


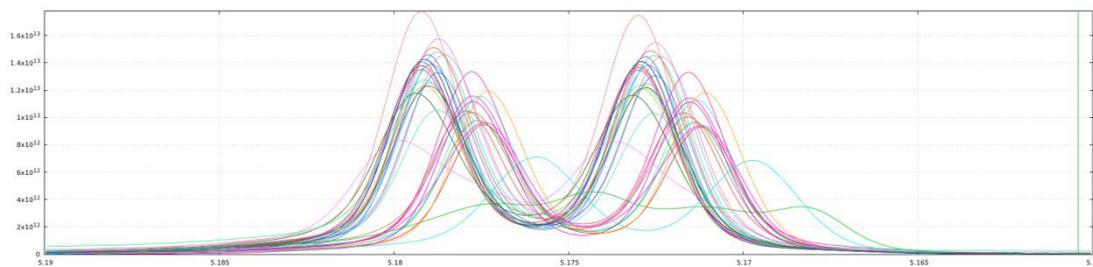
APÊNDICE Q - Picos de metabólitos não identificados 2 e 3 alinhados.



APÊNDICE R - Picos do Lactato (Dubleto; 1,334 ppm) desalinhados.**APÊNDICE S - Picos do Lactato (Dubleto; 1,334 ppm) alinhados.****APÊNDICE T - Picos do Acetato (Singleto; 1,9092 ppm) desalinhados.****APÊNDICE U - Picos do Acetato (Singleto; 1,9092 ppm) alinhados.**

APÊNDICE V - Picos do Formato (Singleto; 8,5024 ppm) desalinhados.**APÊNDICE W** - Picos do Formato (Singleto; 8,5024 ppm) alinhados.**APÊNDICE X** - Picos da Histidina (Singleto; 7,6753 ppm) e outros picos de metabólitos não identificados desalinhados.**APÊNDICE Y** - Picos da Histidina (Singleto; 7,6753 ppm) e outros picos de metabólitos não identificados alinhados.

APÊNDICE Z - Picos da Fenilalanina (Multipletto; 7,2666-7,3763 ppm) desalinhados.**APÊNDICE AA** - Picos da Fenilalanina (Multipletto; 7,2666-7,3763 ppm) alinhados.**APÊNDICE AB** - Picos do Ácido graxo insaturado (Multipletto; 5,3351-5,4085 ppm) desalinhados.**APÊNDICE AC** - Picos do Ácido graxo insaturado (Multipletto; 5,3351-5,4085 ppm) alinhados.

APÊNDICE AD - Picos da Glicose (Dubleto; 5,1745 ppm) desalinhados.**APÊNDICE AE - Picos da Glicose (Dubleto; 5,1745 ppm) alinhados.**