



## ANÁLISE DE METABÓLITOS EM PLASMA DE PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO POR ESPECTROSCOPIA DE $^1\text{H}$ -RMN

Douglas C. Rosa <sup>1</sup>, Amanda Donatti <sup>1</sup>, Fabiana S. Oliveira <sup>1</sup>, Amanda M. Canto <sup>1</sup>, Alexandre B. Godoi <sup>1</sup>, Alessandro Sousa <sup>2</sup>, Wagner M. Avelar <sup>2</sup>, Melissa Q. Escobar <sup>3</sup>, Ljubica Tasic <sup>3</sup>, Iscia Lopes-Cendes <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Translacional, Área de Genética Médica e Medicina Genômica. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Brasil; <sup>2</sup> Departamento de Neurologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Brasil; <sup>3</sup> Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Palavras-chave: metabolômica, RMN, AVC

**Introdução:** O bloqueio do fluxo sanguíneo para o cérebro caracteriza o acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi). O AVCi é classificado em cinco etiologias, sendo a aterosclerose de grandes vasos uma das mais frequentes. Esta resulta da formação de trombos derivados de placas ateroscleróticas, levando a obstrução do lúmen vascular <sup>1,2</sup>. Durante o evento do AVCi, atuam vários mecanismos moleculares que visam a recuperação tecidual e de função <sup>3</sup>. Desta forma, com base na atuação desses processos e no tempo de recuperação, o quadro de AVCi é dividido em fases aguda, subaguda e crônica.

**Objetivos:** Determinar o perfil metabólico no plasma de pacientes em estágios diferentes da doença aterosclerótica associadas ao AVCi e de indivíduos controle a fim de identificar metabólitos que possam ser usados como biomarcadores do AVCi.

**Métodos:** Foi utilizado plasma de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP. Sangue periférico foi coletado e o plasma foi extraído em até 2 h após a coleta, sendo esta fração armazenada em  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . A casuística foi composta por pacientes na fase aguda do AVCi aterosclerótico (até 24h após o ictus,  $n=19$ ), na fase crônica do AVCi aterosclerótico (3 meses após o ictus,  $n=19$ ), e por pacientes com estenose grave assintomática de carótida interna sem AVCi (EACI,  $n = 17$ ). Os grupos de pacientes foi comparado também com um grupo controle, composto por indivíduos sem aterosclerose de carótida e sem antecedente pessoal e familiar de AVCi ( $n = 14$ ). As amostras de plasma obtidas foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 ( $^1\text{H}$ -RMN), utilizando um equipamento Ascend Avance III de 600 MHz (Bruker Inc.). Foram utilizados espectros unidimensionais (1D) com sequência de pulsos de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Para obtenção dos espectros, as amostras foram descongeladas, diluídas em proporção 1:1 com solução de TMS-Água Deuterada e mantidas em gelo até que a análise fosse realizada em temperatura ambiente. Foi utilizado o software MestreNova <sup>4</sup> para a padronização dos espectros, referenciamento de deslocamento químico padrão para sobreposição dos dados (pico de lactato em  $\delta = 1,324$ ), *binning* de  $\delta = 0,004$  e normalização por área total do espectro. Foi exportada uma matriz de dados (.csv) na qual cada *bin* representa uma variável com a intensidade de sinal absorvida relativa a cada amostra. A matriz foi tratada de forma que foram removidas as variáveis referentes aos sinais de água e EDTA, pois poderiam interferir nos cálculos devido à grande quantidade presente nas amostras de sangue. Os dados foram divididos em dois segundo as regiões de compostos alifáticos ( $\delta = 0 - 4,45$ ) e aromáticos ( $\delta = 5,10 - 9,00$ ) dos espectros. Isso foi feito visando melhorar a identificação de sinais relevantes da região

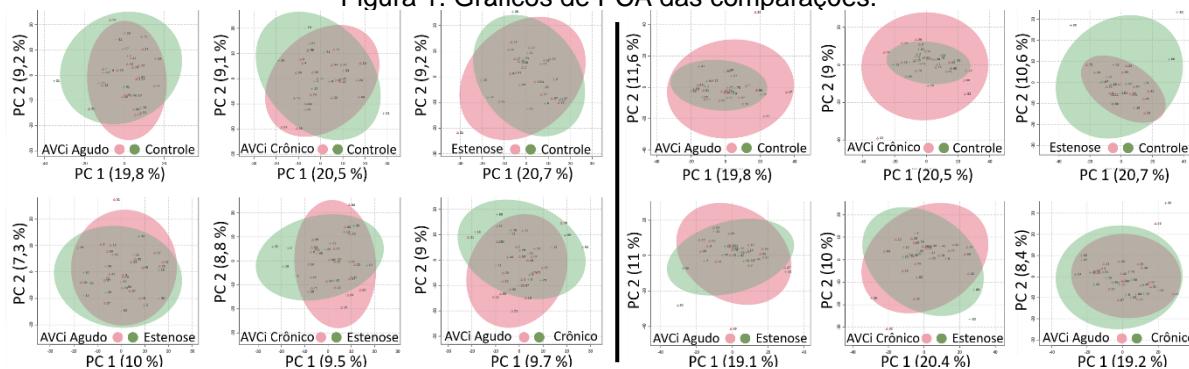


aromática, pois as intensidades dos sinais dessa região são muito menores em comparação com a região alifática. Os dados foram importados para a plataforma MetaboAnalyst 4.0<sup>5</sup> para a realização das análises multivariadas. Durante a importação, a plataforma fez um processo de auto escalonamento dos dados. Na plataforma, foram analisados grupos dois a dois (ou seja, *grupo controle x grupo AVCi agudo; controle x AVCi crônico* etc), resultando em 6 comparações. Para cada comparação, foram analisados os gráficos exploratórios de PCA e discriminativos de PLS-DA. O modelo de PLS-DA reportou as variáveis com importância para a discriminação do modelo (valores VIP). Além disso, cada variável foi testada pela análise univariada de Wilcoxon-Mann-Whitney para determinar se as medianas de seus dados são estatisticamente relevantes em cada comparação. Foram selecionadas as variáveis com p-valor nominal < 0,05 (sem uso de testes de correção) e com valor VIP > 1 para identificação de possíveis metabólitos em banco de dados HMDB<sup>6</sup> e na literatura. Em segundo momento, também foram verificadas variáveis com p-valor nominal entre 0,05 e 0,15 e valor VIP > 1 que poderiam ter sentido para identificação de possíveis metabólitos.

**Resultados e Discussão:** Foi verificado que as idades do grupo AVCi crônico apresentaram distribuição não normal pelo teste de Shapiro-Wilk (p-valor = 0,022). O teste por Kruskal-Wallis rejeitou a hipótese de igualdade de idade entre os grupos (p-valor = 0,048). Pelo teste de qui quadrado ( $\chi^2$ ), foi rejeitada a hipótese de igualdade dos grupos quanto ao gênero (p-valor = 0,033) e aos fatores de risco por dislipidemia (p-valor = 0,035) e tabagismo (p-valor = 0,012). Os testes para hipertensão arterial (p-valor = 0,372), diabetes mellitus (p-valor = 0,861) e uso de álcool (p-valor = 0,113) aceitaram a hipótese de igualdade entre os grupos. É necessário observar que esses resultados podem não refletir a distribuição verdadeira dos grupos devido à ausência de algumas informações no banco de dados.

Os gráficos exploratórios de PCA indicaram que não houve grande variação e nem clara separação entre as amostras em quaisquer regiões do espectro analisadas (aromática ou alifática). Os gráficos de PLS-DA maximizaram a separação das amostras de acordo com a classificação em que estão inseridas, como é próprio desta análise. Porém, a verificação da capacidade preditiva dos modelos de PLS-DA, que foi avaliada somente pelos valores de  $Q^2$  obtidos pela validação cruzada de *k-fold* ( $k = 10$ ), indicou que os modelos não foram adequados para predição das diferentes classes devido aos valores de  $Q^2$  terem sido negativos ou muito baixos.

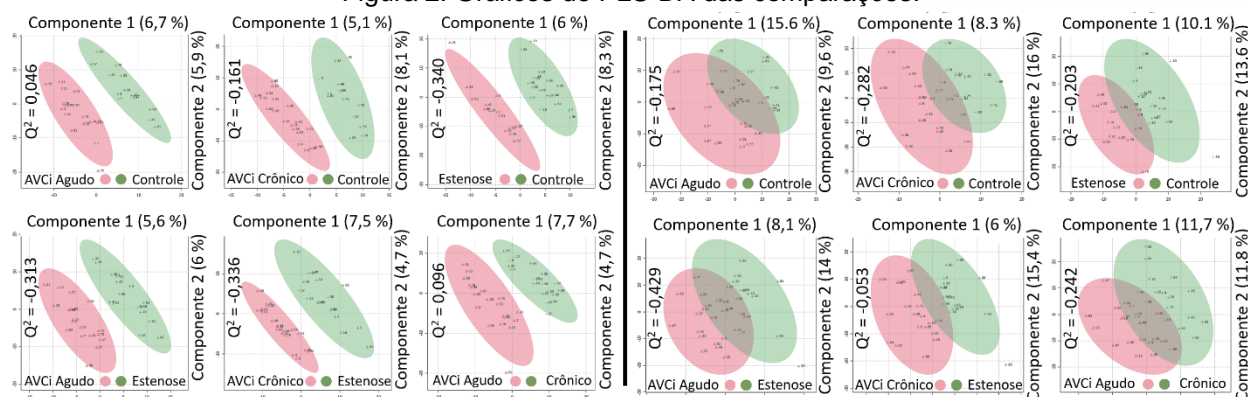
Figura 1. Gráficos de PCA das comparações.



Referentes à região alifática  $\delta = 0 - 4,45$  (esq.) e aromática  $\delta = 5,10 - 9,00$  (dir.).



Figura 2. Gráficos de PLS-DA das comparações.



Referentes à região alifática  $\delta = 0 - 4,45$  ppm (esq.) e aromática  $\delta = 5,10 - 9,00$  ppm (dir.).

Apesar da capacidade preditiva baixa, foram identificados alguns sinais de metabólitos com intensidades relativas diferentes entre os grupos e que poderiam ser discriminatórios das classes, segundo as variáveis com o p-valor e valor VIP dentro das especificações. A lista desses metabólitos, o grupo no qual foram identificados e o  $\text{Log}_2$  de *Fold Change* são apresentados a seguir.

A Tabela 1 apresenta o formato (ácido fórmico) e metionina, respectivamente, com maiores e menores intensidades relativas para pacientes com AVCi na fase. Essas relações podem indicar deficiência da via do ácido fólico e quadro de hiperhomocisteinemia, quadro importante para o desenvolvimento de aterosclerose <sup>7</sup>. A identificação de citrato e piruvato, com respectivas intensidades menores e maiores para a fase aguda em comparação aos demais grupos, pode indicar maior atuação da via glicolítica anaeróbica e deficiência da via do ácido cítrico pelo desbalanço de oxigênio durante o fluxo sanguíneo diminuído para a região cerebral <sup>7</sup>.

Tabela 1. Identificação de citrato, formato (ácido fórmico), metionina e piruvato.

Metabólito	Agudo / Controle $\text{Log}_2$ FC	Crônico / Controle $\text{Log}_2$ FC	Estenose / Controle $\text{Log}_2$ FC	Agudo / Estenose $\text{Log}_2$ FC	Crônico / Estenose $\text{Log}_2$ FC	Crônico / Agudo $\text{Log}_2$ FC
Citrato	-0,55	n.d.	-0,55; -0,42; -0,56	0,46	0,66; 0,36	0,47
Formato (ácido fórmico)	4,49; 3,03; 3,36; 23,45	n.d.	n.d.	3,57; 6,91; 22,96	n.d.	-1,44; -1,48
Metionina	1,00; -0,46; -0,61; -0,59	n.d.	n.d.	0,71; -0,49; -0,61	n.d.	0,30; 0,36; 0,86; 0,79
Piruvato	1,11	n.d.	0,98	n.d.	-0,72	-0,86

n.d. = não descrito

A Tabela 2 apresenta GlycA, que representa os sinais de glicoproteínas e/ou glucosaminas N-acetiladas das quais fazem parte as glicoproteínas de fase aguda de inflamação e que podem ter relação com eventos trombóticos e ateroscleróticos <sup>8</sup>. A maior intensidade desses sinais para AVCi na fase aguda e estenose grave pode indicar algum distúrbio dessa classe no início do evento isquêmico. A glutamina foi identificada com maiores intensidades relativas para os grupos controle, crônico e estenose em comparação com a fase aguda. Níveis menores de glutamina podem estar relacionados com maiores danos teciduais, o que poderia explicar essa relação entre os grupos <sup>7</sup>. Arginina e lisina foram identificadas com menores intensidades para a fase aguda em relação aos demais, o que pode ter relação com distúrbios dos processos regulatórios do fluxo sanguíneo <sup>9</sup>.



Tabela 2. Identificação de sinais de glicoproteínas, glutamina, arginina e lisina.

Metabólito	Agudo / Controle Log <sub>2</sub> FC	Crônico / Controle Log <sub>2</sub> FC	Estenose / Controle Log <sub>2</sub> FC	Agudo / Estenose Log <sub>2</sub> FC	Crônico / Estenose Log <sub>2</sub> FC	Crônico / Agudo Log <sub>2</sub> FC
<i>GlycA</i>	0,9	n.d.	n.d.	n.d.	-1,19	-1,66
<i>Glutamina</i>	1,00; -0,46; -0,61; -0,59	n.d.	n.d.	0,71; -0,49; -0,61	n.d.	0,30; 0,36; 0,86; 0,79
<i>Arginina</i>	-0,48; -0,42; -0,45; -0,65	n.d.	n.d.	-0,52	n.d.	0,39; 0,38; 0,52
<i>Lisina</i>	-0,48; -0,42; -0,45; -0,65	n.d.	n.d.	-0,52	n.d.	0,39; 0,38; 0,52

n.d. = não descrito

A Tabela 3 apresenta isoleucina, um aminoácido de cadeia ramificada (BCAA) e que pode ter relação com metabolismo energético e com a regulação de níveis de neurotransmissores<sup>10</sup>. A identificação de menores intensidades dos sinais desse metabólito para a fase aguda em comparação com os grupos crônico e estenose podem indicar desregulação de neurotransmissores e desbalanço do metabolismo energético, o que pode ter relação também com os achados de piruvato e citrato. Tirosina foi indicada com intensidades relativas maiores para AVCi crônico e menores para a fase aguda, as quais podem estar relacionadas ao seu uso como substrato para a produção de catecolaminas durante a lesão cerebral e estresse da fase aguda<sup>11</sup>. Serina, ureia, manose, dimetilglicina, trimetilamina e succinato tiveram maior intensidade para os grupos pacientes em comparação com grupo controle, mas não foram encontrados possíveis significados sobre a relação deles com fenótipos da doença na literatura utilizada.

Tabela 3. Identificação de isoleucina, serina, tirosina, ureia, manose, dimetilglicina, trimetilamina e succinato.

Metabólito	Agudo / Controle Log <sub>2</sub> FC	Crônico / Controle Log <sub>2</sub> FC	Estenose / Controle Log <sub>2</sub> FC	Agudo / Estenose Log <sub>2</sub> FC	Crônico / Estenose Log <sub>2</sub> FC	Crônico / Agudo Log <sub>2</sub> FC
<i>Isoleucina</i>	-0,50; -0,35; -0,26; -0,49	0,54; 0,37; 0,64	0,40; 0,63; -0,45	-0,53; -0,45	n.d.	0,67; 0,43; 0,32; 0,67
<i>Serina</i>	-0,67; -0,58; -0,69; -0,83	0,77; 0,35; -0,52	-0,52; -0,65; -0,81; -0,72	0,69; 0,97	0,35; 0,43; 0,62; 0,43; 0,38; 0,43; 0,40; 0,29; 0,29; 0,60	0,38; 0,35; 0,50; 0,62; 0,53; 0,61; 0,44
<i>Tirosina</i>	-0,84	n.d.	-0,84; -0,70; -0,93	n.d.	1,10; 0,42; 0,72; 0,62; 1,60	0,56; 0,68; 0,59; 0,75; 0,80; 1,25; 1,77
<i>Ureia</i>	-1,08; -0,75; -1,08; -0,90; -0,89; -1,33; -0,89; -1,12; -1,04	-1,05; -0,89; -0,87; -0,60; -0,71; -0,64; -0,78	n.d.	-1,39; -0,77; -1,48; -1,10; -8,13; -21,83; -1,10	n.d.	n.d.
<i>Manose</i>	0,84	0,53; 0,65; 0,57	0,46; 0,46	n.d.	0,41; 0,42; 0,30	n.d.
<i>Dimetilglicina</i>	0,69	0,72; 0,53	n.d.	n.d.	n.d.	0,53
<i>Trimetilamina</i>	0,58; 0,72; 0,65	0,72; 0,75; 0,72; 0,79	0,56; 0,51	n.d.	0,52	n.d.
<i>Succinato</i>	1,21	0,49331	0,75	n.d.	n.d.	-0,71

n.d. = não descrito

A Tabela 4 apresenta leucina, glutamato e glicose. Estes foram identificados com relações contrárias às indicadas na literatura. Leucina também é uma BCAA, mas, contrário à isoleucina, teve níveis maiores para o grupo agudo. Glutamato foi descrito na literatura como aumentado na fase aguda do AVCi e com associação à quadro de neurotoxicidade, excitação neural e processo isquêmico<sup>11</sup>. Porém, nossos resultados indicaram que



glutamato teve níveis maiores para o grupo na fase crônica. E por fim, quadros de hiperglicemia durante a fase aguda do AVCi já foram discutidas anteriormente<sup>12</sup>, porém, nossos resultados indicaram os sinais de glicose com menores intensidades para a fase aguda. É importante ainda ressaltar que não foram analisadas o uso de fármacos hipoglicemiantes ou de outras classes pelos indivíduos, o que pode influenciar nos resultados. E também não foram identificados, em nossos resultados, metabólitos descritos na literatura como possíveis marcadores para quadro de estenose.

Tabela 4. Identificação de leucina, glutamato e sinais de glicose.

Metabólito	Agudo / Controle Log <sub>2</sub> FC	Crônico / Controle Log <sub>2</sub> FC	Estenose / Controle Log <sub>2</sub> FC	Agudo / Estenose Log <sub>2</sub> FC	Crônico / Estenose Log <sub>2</sub> FC	Crônico / Agudo Log <sub>2</sub> FC
<i>Leucina</i>	0,63; 0,82; 0,86	0,62	-0,45; -0,48; 0,66	n.d.	0,44	n.d.
<i>Glutamato</i>	n.d.	0,97; 0,70; 0,70; 0,56; 0,88	0,66; 0,62	n.d.	0,78; 0,61	0,40; 0,55; 0,67; 0,82; 0,54
<i>Glicose</i>	-0,63; -0,41; -0,72; 0,60; -0,61; -0,52; -0,45	-0,70; 0,53; -0,96; 0,65; 0,53; -0,84	-0,74; 0,64; -0,90; 0,65	-0,61; -0,70; -0,68; -0,35; -0,50; -0,48	n.d.	0,57; 0,66; 0,31; 0,36; 0,34; -0,90; -1,20

n.d. = não descrito

**Conclusão:** Nós encontramos metabólitos com intensidades de sinais diferenciais em grupos específicos da doença aterosclerótica associada ou não ao AVCi. Esses metabólitos estão envolvidos principalmente na via glicolítica anaeróbica e metabolismo energético, quadros de inflamação e regulação de fluxo sanguíneo. Vale salientar que também encontramos metabólitos que não tiveram a relação com o fenótipo para AVCi e/ou a aterosclerose descritos na literatura, ou mesmo que tiveram relações de intensidade em direção oposta ao já descrito na literatura. Consideramos que nossos resultados são promissores, mas devido à característica de sinais aglomerados em 1D <sup>1</sup>H-RMN, é necessário realizar análises adicionais para a validação dos metabólitos encontrados, como RMN bidimensional (2D). Além disso, nossos resultados tiveram uma baixa capacidade preditiva do modelo multivariado usando o perfil metabólico global dos diferentes grupos, o que pode ser consequência do número amostral limitado ante a grande variabilidade individual apresentada pelos pacientes.

Comitê de Ética (número 12112913.3.0000.5404/Parecer 257.020).  
FAPESP (#2019/00048-0). Projeto vinculado ao CEPID-BRAINN.

#### Referências:

1. Markus HS. doi:10.1186/1741-7015-10-113
2. Love BB, Bendixen BH. doi:10.1161/01.STR.24.1.35
3. Dobkin BH, Carmichael ST. doi:10.1177/1545968315604400
4. Willcott MR. doi:10.1021/ja906709t
5. Chong J, Wishart DS, Xia J. doi:10.1002/cpbi.86
6. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, et al. doi:10.1093/nar/gkx1089
7. Jung JY, Lee H-S, Kang D-G, et al. doi:10.1161/STROKEAHA.110.598789
8. De Meyer SF, Denorme F, Langhauser F, et al. doi:10.1161/STROKEAHA.115.011238
9. Lee Y, Khan A, Hong S, Jee SH, Park YH. doi:10.1039/c6mb00732e
10. Kimberly WT, Wang Y, Pham L, et al. doi:10.1161/STROKEAHA.111.000397
11. Wang D, Kong J, Wu J, Wang X, Lai M. doi:10.1016/j.neulet.2017.01.039
12. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC. doi:10.1161/hs1001.096194