

**CAROLINE WERNER PEREIRA DA SILVA GRANDIZOLI**

**INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES INDICATIVOS DA EVOLUÇÃO DO  
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ATRAVÉS DE RMN ALIADA A QUIMIOMETRIA**

**Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutora pelo Programa de  
Pós-Graduação em Química – Área de Química  
Orgânica, do Setor de Ciências Exatas da  
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison**

**Co-orientadora: Prof. Dr.<sup>a</sup> Francinete Ramos Campos**

**CURITIBA**

**2014**

**CAROLINE WERNER PEREIRA DA SILVA GRANDIZOLI**

**INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES INDICATIVOS DA EVOLUÇÃO DO  
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ATRAVÉS DE RMN ALIADA A QUIMIOMETRIA**

**Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutora pelo Programa de  
Pós-Graduação em Química – Área de Química  
Orgânica, do Setor de Ciências Exatas da  
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison**

**Co-orientadora: Prof. Dr.<sup>a</sup> Francinete Ramos Campos**

**CURITIBA**

**2014**

**Para meu amado marido e amigo inseparável.**

**AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Andersson Barison e a Professora Francinete Ramos Campos pela orientação.

A Professora Noemi Nagata, ao Professor Fábio Simonelli e ao Professor Guilherme Ianzi Sasaki pelas discussões neste trabalho.

Ao Doutor Marcos Christiano Lange e a Felipe Trevisan Matos Novak pela colaboração neste projeto, essencial para o sucesso do trabalho.

Ao Professor Roberto Pontarolo e aos alunos do Centro de Estudos em Biofarmácia por ceder espaço em seu laboratório para armazenamento das amostras.

Aos amigos de laboratório que muitas vezes ajudaram a resolver meus problemas, especialmente a Angelita Nepel pela colaboração direta neste projeto.

Ao meu marido João Tiago, meu amado marido que me ajudou em todos os momentos e nunca me deixou desistir.

Aos meus pais Aluisio e Rosane por terem me dado a vida e ensinado a vivê-la, me apoiando e me dando a melhor herança que alguém pode dar.

A meu irmão Leonardo e sua esposa Ana Paula.

A todos meus amigos.

Ao Programa de Pós Graduação de Química da UFPR.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

A Jeová Deus acima de tudo e antes de qualquer outro.

**SUMÁRIO**

<i>AGRADECIMENTOS</i> .....	ii
<i>SUMÁRIO</i> .....	ii
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i> .....	vii
<i>LISTA DE FIGURAS</i> .....	xi
<i>LISTA DE TABELAS</i> .....	xxiii
<i>LISTA DE GRÁFICOS</i> .....	xxv
<i>RESUMO</i> .....	xxvi
<i>ABSTRACT</i> .....	xxvii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>28</b>
1.1 A Metabonômica .....	28
1.2 Doença Vascular Encefálica (DVE) .....	32
1.2.1 Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEi).....	32
1.2.1.1 Diagnóstico do AVEi .....	33
1.2.1.2 Prognóstico do AVEi .....	38
1.2.1.3 Terapia trombolítica.....	40
1.3 Biofluidos .....	40
1.4 Técnicas analíticas .....	42
1.4.1.1 A Ressonância Magnética Nuclear .....	42
1.4.1.1.1 RMN de <sup>1</sup> H e outros núcleos .....	43
1.4.1.1.2 RMN na metabonômica .....	44
1.4.2 Análises quimiométricas .....	48
1.4.2.1 Análise por Componentes Principais (PCA) .....	48
1.4.2.1.1 Análise estatística de significância .....	49
1.4.2.1.2 Quantização da separação de grupos .....	50

1.4.2.2	Análise Discriminante com calibração multivariada por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	50
1.4.2.3	Experimentos STOCYSY e RANSY .....	51
1.4.2.4	Modelos de classificação .....	53
2	OBJETIVOS.....	54
2.1	Objetivos específicos .....	54
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1	Obtenção das amostras.....	55
3.2	Perfil dos pacientes analisados .....	56
3.3	Aquisição dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H.....	61
3.4	Aquisição de espectros de RMN de outros núcleos e experimentos bidimensionais.....	62
3.5	Testes de estabilidade das amostras .....	64
3.6	Realização de análises quimiométricas .....	65
3.6.1	Discriminação entre os grupos.....	65
3.6.2	Análise estatística de significância.....	65
3.6.3	Identificação dos biomarcadores .....	66
3.6.4	Construção de modelos de classificação.....	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1	Análise das amostras de soro sanguíneo.....	68
4.1.1	Padronização do método de preparo das amostras de soro sanguíneo .....	68
4.1.1.1	Número de replicatas.....	68
4.1.1.2	Tempo de centrifugação.....	69
4.1.1.4	Liofilização .....	69

---

4.1.1.5	Uso de TMSP- $d_4$ .....	71
4.1.2	Testes de estabilidade das amostras de soro.....	72
4.1.3	Aquisição dos espectros de RMN das amostras de soro sanguíneo.....	78
4.1.3.1	Determinação das sequências de pulso utilizadas para aquisição dos espectros de RMN .....	78
4.1.3.1.1	Determinação dos parâmetros para aquisição de espectros de RMN de $^1\text{H}$ com sequência de pulso noesypr1d.....	78
4.1.3.1.2	Utilização da sequência de pulso CPMG para aquisição de espectros de RMN de $^1\text{H}$ .....	79
4.1.3.1.3	Análise de outros núcleos além de $^1\text{H}$ .....	82
4.1.3.2	Temperatura de análise.....	83
4.1.3.3	Ajuste da frequência de ressonância da água para otimização da saturação do sinal.....	84
4.1.4	Atribuição dos sinais dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{31}\text{P}$ das amostras de soro sanguíneo .....	85
4.1.5	Análise visual dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ das amostras de soro sanguíneo .....	98
4.1.6	Análises quimiométricas dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ das amostras de soro sanguíneo .....	101
4.1.6.1	Análises no AMIX .....	102
4.1.6.2	Análises no <i>muma</i> .....	110
4.1.6.3	Comparação entre os programas AMIX e <i>muma</i> - Discriminação das amostras C1 <i>versus</i> C60 <i>versus</i> C180 dos pacientes de controle .....	112
4.1.6.4	Discriminação entre amostras de paciente de acordo com sexo.....	118

4.1.6.5	Discriminação entre amostras de pacientes que sofreram AVEi ao longo do tempo.....	118
4.1.6.6	Discriminação entre amostras de paciente controle <i>versus</i> pacientes que sofreram AVEi .....	131
4.1.6.6.1	Análise dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ .....	131
4.1.6.6.2	Análise dos espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ .....	143
4.1.6.6.3	Principais metabólitos encontrados.....	149
4.1.6.7	Discriminação entre amostras de pacientes que receberam ou não tratamento trombolítico .....	152
4.1.6.8	Discriminação entre amostras de pacientes de acordo com a etiologia da doença .....	157
4.1.6.9	Discriminação entre amostras de pacientes de acordo com o prognóstico .....	158
4.2	Modelos de classificação das amostras de soro .....	166
4.3	Análise das amostras de plasma sanguíneo.....	168
4.3.1	Estabelecimento do método de preparo das amostras de plasma sanguíneo .....	168
4.3.2	Aquisição dos espectros de RMN das amostras de plasma sanguíneo .....	168
4.3.2.1	Determinação das sequências de pulso e procedimentos utilizados para aquisição dos espectros de RMN.....	168
4.3.3	Atribuição dos sinais dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ das amostras de plasma sanguíneo.....	169
4.3.4	Análises quimiométricas dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ das amostras de plasma sanguíneo .....	171

---

4.4	Limitações da técnica.....	172
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	174
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	176

**LISTA DE ABREVIATURAS**

A1	Amostras coletadas nas primeiras 24 horas após a ocorrência do AVEi
A1t	Amostras coletadas nas primeiras 24 horas após a ocorrência do AVEi e após administração do tratamento trombolítico
A7	Amostras coletadas após sete dias da ocorrência do AVEi
A30	Amostras coletadas após um mês da ocorrência do AVEi
A90	Amostras coletadas após três meses da ocorrência do AVEi
A180	Amostras coletadas após seis meses da ocorrência do AVEi
AVEi	Acidente vascular encefálico isquêmico
C1	Primeiras amostras coletadas de pacientes de controle
C90	Amostras coletadas de pacientes de controle após três meses da primeira coleta
C180	Amostras coletadas de pacientes de controle após seis meses da primeira coleta
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectroscopia de massas
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
Da	Daltons
DAC	Doença arterial coronariana (angina ou infarto cardíaco)
DM	Diabetes <i>melittus</i>
DVE	Doença vascular encefálica
DVP	Doença vascular periférica
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica

Hz	Hertz
$J$	Constante de acoplamento em Hertz (Hz)
$P_i$	Fosfatos inorgânicos
PCol	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
RD	Tempo de relaxação (d1)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMNi	Ressonância Magnética Nuclear de imagem
RMN de $^1H$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de $^{13}C\{^1H\}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 desacoplado de hidrogênio
RMN de $^{31}P\{^1H\}$	Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo 31 desacoplado de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SM	Esfingomielina
T1	Relaxação longitudinal (spin-rede)
T2	Relaxação transversal (spin-spin)
TC	Tomografia computadorizada
rt-PA	Ativador do plasminogênio tecidual recombinante
VL	Variável latente
$\delta$	Deslocamento químico

Siglas em inglês com a tradução entre parênteses

BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i> (Peptídeo natriurético cerebral)
c-Fn	<i>Cellular fibronectin</i> (Fibronectina celular)
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i> (Espectroscopia de correlação)

---

DQF-COSY	<i>Double quantum filter correlation spectroscopy</i> (Espectroscopia de Correlação com filtro de duplo-quantum)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imonoabsorvente ligado a enzima competitiva)
FID	<i>Free induction decay</i> (Decaimento de indução livre)
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> (Correlação heteronuclear a longa distância)
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i> (Correlação heteronuclear a ligação direta)
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
NIHSS	<i>National institutes of health stroke scale</i> (Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> (Espectroscopia de efeito nuclear Overhauser)
OPLS-DA	<i>Orthogonal partial least square discriminant analysis</i> (Análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais ortogonal)
OSC	<i>Orthogonal signal correction</i> (Correção ortogonal de sinal)
OSTOCSY	<i>Statistical total correlation spectroscopy with orthogonal signal correction</i>
PC	<i>Principal component</i> (Componentes principais)
PCA	<i>Principal component analysis</i> (Análise por componentes principais)
PLS	<i>Partial least square</i> (Mínimos quadrados parciais)
PLS-DA	<i>Partial least square discriminant analysis</i> (Análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais)
RANSY	<i>Ratio analysis NMR spectroscopy</i>

---

RMSECV	<i>Root mean square error of cross validation</i> (Raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada)
ns	<i>Number of scans</i> (Número de varreduras)
SIMCA	<i>Soft Independent Modelling of Class Analogy</i> (Modelagem independente e flexível por analogia de classe)
STOCSY	<i>Statistical total correlation spectroscopy</i> (Experimento de correlação total estatística)
States-TPPI	<i>States time-proportional phase incrementation</i>
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i> (Experimento de correlação total)
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de muito baixa densidade)

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1: Comparação de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos em espectrômetro de RMN de 400 MHz de uma mesma amostras de soro sanguíneo. O espectro de cima foi obtido sem saturação do sinal da água e está ampliado cerca de 3000 vezes. O espectro de baixo foi obtido com saturação do sinal da água usando a sequência de pulso *noesypr1d*..... 46
- Figura 2: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* comparando a primeira amostra liofilizada (Amostra A1 do paciente 1) e a correspondente sem liofilização. .... 70
- Figura 3: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* comparando a segunda amostra liofilizada (Amostra A1 do paciente 2) e a correspondente sem liofilização. .... 71
- Figura 4: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  utilizando a sequência de pulsos *noesypr1d* para saturação de sinal da água com diferentes parâmetros. Todos os espectros estão em mesma escala de intensidade..... 79
- Figura 5: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com a sequência de pulso *cpmgpr1d*, variando os valores de tempo de relaxação ( $2\tau_n$ ). Todos os espectros foram adquiridos com  $d_1$  de 1,0 s e  $n_s$  igual a 64..... 81
- Figura 6: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* com tempo de relaxação ( $2\tau_n$ ) de 80 ms variando os parâmetros utilizados. .... 82
- Figura 7: Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  obtidos com a sequência de pulso *zgpg30* variando o número de transientes utilizado..... 83

- Figura 8: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com a sequência de pulso *noesypr1d* em diferentes temperaturas. .... 84
- Figura 9: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com a sequência *zgpr* para ajuste de frequência de ressonância de pré-saturação do sinal da água. .... 85
- Figura 10: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra A1 do paciente 13 adquirido com sequência de pulso *cpmgpr1d* com atribuições segundo numeração seguida pela Tabela 1. Acima região de 0,5 a 4,5 ppm e abaixo de 5,1 a 8,6 ppm. .... 86
- Figura 11: Experimento de correlação estatística total (STOCSY) da região  $\delta$  0,4-4,5 de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* de amostras de soro sanguíneo realizado no *muma* mostrando correlações dentro do limite de 0,95. .... 94
- Figura 12: Experimento de correlação estatística total (STOCSY) unidimensional da região  $\delta$  6,0-9,0 de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* de amostras de soro sanguíneo realizado no *muma*. Barras vermelhas e laranjas mostram correlações positivas, barras azuis correlações negativas e barras verdes indicam nenhuma correlação. .... 95
- Figura 13: Experimento de correlação estatística total (STOCSY) unidimensional da região  $\delta$  4,0-9,0 (exclusão das regiões  $\delta$  1,30 a 1,37 e  $\delta$  4,0 a 5,2) de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* de amostras de soro sanguíneo realizado no *muma*. Barras vermelhas e laranjas mostram correlações positivas, barras azuis correlações negativas e barras verdes indicam nenhuma correlação. .... 96
- Figura 14: Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  da amostra A do paciente 13 adquirido com sequência de pulso *zpgg30*. .... 97

- Figura 15: Experimento de RANSY da região  $\delta$  0,0-7,0 de espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  de amostras de soro sanguíneo realizado no *muma* referente aos *buckets* em  $\delta$  4,52 (A) e 6,02 (B). ..... 98
- Figura 16: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* dos pacientes 11 e 13 nas primeiras 24 horas após o AVC (amostras A1) e da primeira coleta (amostra C1) do paciente de controle (paciente 52). ..... 99
- Figura 17: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* dos pacientes 11 e 13 nas primeiras 24 horas após o AVC (amostras A1) e da primeira coleta (amostra C1) do paciente de controle (paciente 52). Espectros abaixo referem-se a ampliação da região aromática  $\delta$  5,5-9,0. .... 100
- Figura 18: Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  dos pacientes 11 e 13 nas primeiras 24 horas após o AVC (amostras A1) e da primeira coleta (amostra C1) do paciente de controle (paciente 52). ..... 101
- Figura 19: (A) Gráfico de escores de PC1 (40,4%) *versus* PC2 (20,7%) referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (*noesypr1d* – região de  $\delta$  0,4 a 9,0) das amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (azul). (B) Gráfico de *X-loadings* de PC1 *versus* PC2. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto. .... 107
- Figura 20: (A) Gráfico de escores de PC1 (87,8%) *versus* PC2 (4,12%) referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (*noesypr1d* – região de  $\delta$  0,4 a 9,0) das amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (azul) considerando apenas as regiões dos *buckets* significantes da análise anterior. (B) Gráfico de *X-loadings* de PC1 *versus* PC2. *Buckets* considerados como

significantes (valor- $p <$  valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor- $p$ : azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto. .... 108

Figura 21: (A) Gráfico de escores de PC1 (49,9%) *versus* PC2 (11,1%) referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (*cpmgpr1d* – região de  $\delta$  0,4 a 4,0) das amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (azul). (B) Gráfico de *X-loadings* de PC1 *versus* PC2. *Buckets* considerados como significantes (valor- $p <$  valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor- $p$ : azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto. .... 109

Figura 22: (A) Gráfico de escores de PC1 (49,7%) *versus* PC2 (14,9%) referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (*cpmgpr1d* – região de  $\delta$  0,4 a 4,0) das amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (azul) considerando apenas *buckets* significantes da análise anterior. (B) Gráfico de *X-loadings* de PC1 *versus* PC2. *Buckets* considerados como significantes (valor- $p <$  valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor- $p$ : azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto. .... 109

Figura 23: (A) Gráfico de escores de PC1 (42,1%) *versus* PC2 (25,8%) referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com sequência *noesypr1d* das amostras C1 (preto), C90 (azul) e C180 (verde) de pacientes de controle. (B) Gráfico de *X-loadings* correspondente. *Buckets* considerados como significantes (valor- $p <$  valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor- $p$ : azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto. .... 113

- Figura 24: (A) Gráfico de escores da componente 1 (26,4%) *versus* componente 2 (26,2%) referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com sequência *noesypr1d* das amostras C1 (preto), C90 (vermelho) e C180 (verde) de pacientes de controle. O círculo representa a elipse de confiança um nível de 95%. (B) Gráfico de *X-loadings* correspondente..... 114
- Figura 25: Gráficos Volcano das comparações entre os grupos 1 (amostras C1) e 2 (amostras C90), grupos 1 e 3 (amostras C180) e grupos 2 e 3, respectivamente. Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de *p* de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas. 115
- Figura 26: (A) Gráfico de escores de PC1 (49,1%) *versus* PC2 (17,0%) discriminando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A1 (preto), A1t (azul), A7 (verde), A30 (vermelho), A90 (laranja) e A180 (roxo) obtidos com sequência *cpmgpr1d* da região  $\delta$  0,4 a 4,0. (B) Gráfico de *X-loadings* correspondente. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto. .... 120
- Figura 27: (A) Gráfico de escores de PC1 (54,0%) *versus* PC2 (20,6%) discriminando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A1 (preto), A7 (azul), A30 (verde), A90 (vermelho) e A180 (laranja) obtidos com sequência *cpmgpr1d* da região  $\delta$  0,4 a 4,0. (B) Gráfico de *X-loadings* correspondente. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto. .... 121

- Figura 28: Gráfico Volcano das comparações entre os grupos 1 (amostras A1) e 2 (amostras A180). Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas. .... 126
- Figura 29: (A) Gráfico de escores da componente 1 *versus* componente 2 referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com sequência *cpmgpr1d* das amostras A1 (preto) e A180 (vermelho) de pacientes não-trombólise. O círculo representa a elipse de confiança um nível de 95%. (B) Gráfico de *X-loadings* (*S-plot*) correspondente. .... 127
- Figura 30: Gráficos Volcano das comparações entre o grupo 1 (amostras A1) e cada um dos grupos coletados com o passar do tempo, sendo grupo 2 (amostras A7), grupo 3 (amostras A30), grupo 4 (amostras A90) e grupo 5 (amostras A180). Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas. 128
- Figura 31: Gráficos Volcano das comparações entre o grupo 2 (amostras A7) e cada um dos grupos coletados com o passar do tempo, sendo grupo 3 (amostras A30), grupo 4 (amostras A90) e grupo 5 (amostras A180). Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas..... 129
- Figura 32: Gráficos Volcano das comparações entre o grupo 3 (amostras A30) e cada um dos grupos coletados com o passar do tempo, sendo grupo 4 (amostras A90) e grupo 5 (amostras A180). Variáveis são coloridas de acordo com um limite

- duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas. .... 130
- Figura 33: Gráficos Volcano das comparações entre o grupo 4 (amostras A90) e grupo 5 (amostras A180). Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas. .... 130
- Figura 34: Gráficos de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (vermelho) considerando a região de 0,4 a 4,0 ppm do espectro obtido com a sequência de pulso *noesypr1d* e a parte aromática ( $\delta$  6,5 a 9,0) do espectro obtido com a sequência de pulso *cpmgpr1d*. Análises realizadas no *muma*. .... 140
- Figura 35: Gráfico Volcano das comparações entre as amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi e amostras C1 de controle. Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas. .... 141
- Figura 36: *Boxplots* dos *buckets* centrados em 0,82, 1,01, 3,22 e 8,47 (de baixo para cima) das análises entre amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (vermelho). O *boxplot* representa o valor médio (linha cinza dentro da caixa), o desvio padrão (limites da caixa), a faixa de valores (linha pontilhada) e as amostras anômalas (círculos acima e abaixo da caixa). . 142

- Figura 37: Gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 referentes aos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  das amostras A7 de pacientes que sofreram AVEi (A) não-trombólise e (C) trombólise (preto) e amostras C1 de controle (azul). (B e D) Gráficos de *loadings* de PC1 respectivos. Elipses mostram níveis de confiança de 95%. Análises realizadas no AMIX..... 144
- Figura 38: Gráfico de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  das amostras A7 de pacientes que sofreram AVEi (não-trombólise) (preto) e amostras C1 de controle (vermelho) (acima) e as amostras A7 de pacientes que sofreram AVEi (trombólise) (preto) e amostras C1 de controle (vermelho) (abaixo). Análises realizadas no *muma*. ..... 145
- Figura 39: Gráficos Volcano das comparações entre os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  das amostras de soro sanguíneo dos pacientes (A) não-trombólise e controle, (B) trombólise e controle, (C) não-trombólise e trombólise. Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor-*p* máximo de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas..... 147
- Figura 40: *Boxplots* dos *buckets* centrados em 1,70, 2,34, 4,94 e 4,98 (de baixo para cima) das análises entre pacientes não-trombólise *versus* controle (coluna da esquerda) e entre pacientes trombólise *versus* controle (coluna da direita). O *boxplot* representa o valor médio (linha cinza dentro da caixa), o desvio padrão (limites da caixa), a faixa de valores (linha pontilhada) e as amostras anômalas (círculos acima e abaixo da caixa)..... 148
- Figura 41: Gráficos de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A7 de pacientes que sofreram AVEi trombólise (preto) e não-trombólise (vermelho). Análises realizadas no *muma*. . 153

- Figura 42: *Boxplots* dos *buckets* centrados em  $\delta$  6,90, 7,37, 7,76, 8,20 e 8,48 das análises entre pacientes não-trombólise (vermelho) *versus* pacientes trombólise (preto). O *boxplot* representa o valor médio (linha cinza dentro da caixa), o desvio padrão (limites da caixa), a faixa de valores (linha pontilhada) e as amostras anômalas (círculos acima e abaixo da caixa). ..... 154
- Figura 43: Gráficos de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A30 de pacientes que sofreram AVEi trombólise (preto) e não-trombólise (vermelho). Análises realizadas no *muma*. . 155
- Figura 44: Gráfico Volcano das comparações entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A30 de soro sanguíneo dos pacientes não-trombólise e trombólise. Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de *p* de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas. 156
- Figura 45: Gráficos de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A90 de pacientes que sofreram AVEi trombólise (preto) e não-trombólise (vermelho). Análises realizadas no *muma*. . 157
- Figura 46: (A) Gráfico de escores de PC1 (66,9%) *versus* PC2 (14,6%) discriminado os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* considerando a região de  $\delta$  0,4-4,0 das amostras A90 de pacientes trombólise com prognóstico intermediário bom (preto) e ruim (azul). (B) Gráfico de *X-loadings*. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto..... 160
- Figura 47: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra C1 do pacientes 52 (controle) e das amostras A1 dos pacientes 15 e 12 que sofreram óbito em menos de uma

semana após o AVEi. Espectros adquiridos com sequência de pulso *cpmgpr1d* com atribuições segundo numeração seguida pela Tabela 3. Acima região de 1,1 a 4,2 ppm e abaixo de 6,6 a 8,6 ppm..... 161

Figura 48: (A) Gráfico de escores de PC1 (91,2%) *versus* PC2 (3,0%) discriminado os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* considerando a região de  $\delta$  0,4-9,0 das amostras de pacientes trombólise (preto) e não-trombólise (azul) que sofreram óbito e dos pacientes de controle (verde). (B) Gráfico de *X-loadings*. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto. .... 162

Figura 49: (A) Gráfico de escores de PC1 (22,8%) *versus* PC2 (15,6%) discriminado os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* considerando a região de  $\delta$  6,5-9,0 das amostras de pacientes trombólise (preto) e não-trombólise (azul) que sofreram óbito e dos pacientes de controle (verde). (B) Gráfico de *X-loadings*. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto. .... 163

Figura 50: Gráficos de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de pacientes que sofreram AVEi com óbito (preto) e pacientes de controle (vermelho). Análises realizadas no *muma*. .... 164

Figura 51: Gráfico Volcano das comparações entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de pacientes que sofreram AVEi com óbito (preto) e pacientes de controle (vermelho). Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo,

incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas. .... 165

Figura 52: *Boxplots* dos *buckets* centrados em  $\bar{d}$  0,68, 1,48, 3,82 e 7,38 das análises entre pacientes que sofreram AVEi com óbito (preto) e pacientes de controle (vermelho). O *boxplot* representa o valor médio (linha cinza dentro da caixa), o desvio padrão (limites da caixa), a faixa de valores (linha pontilhada) e as amostras anômalas (círculos acima e abaixo da caixa). .... 166

Figura 53: Gráficos de PC1 *versus* PC2 obtidos da classificação pelo método SIMCA a partir das análises por PCA de espectros de pacientes que sofreram AVEi (triângulos vermelhos) e pacientes de controle (triângulos laranjas). Amostras utilizadas para classificação são representadas como círculos azuis no caso das amostras de pacientes que sofreram AVEi e como círculos verdes para amostras de controle. Elipsoides com nível de confiança de 95% geradas pelo AMIX. .... 167

Figura 54: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* de amostras A de plasma (acima) e soro (abaixo) do paciente 14. Os sinais assinalados com asterisco correspondem à EDTA livre ou complexado. . 169

Figura 55: (A) Gráfico de escores de PC1 (72,7%) *versus* PC2 (9,77%) discriminado os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* considerando a região de  $\delta$  0,4-4,0 das amostras de pacientes trombólise (preto) e não-trombólise (azul) que sofreram óbito e dos pacientes de controle (verde). (B) Gráfico de *X-loadings*. *Buckets* considerados como significantes (  $\text{valor-}p < \text{valor } \alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem

---

decrecente de valor- $p$ : azul, verde, amarelo e vermelho. <i>Buckets</i> não significantes são apresentados em preto. ....	172
---	-----

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Definições de termos relacionados à metabonômica conforme encontrado na literatura.....	28
Tabela 2: Alguns possíveis marcadores de AVEi em níveis séricos ou plasmáticos.....	35
Tabela 3: Resultados das classificações feitas pelo método SIMCA dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ , adquiridos com as sequências <i>noesypr1d</i> e <i>cpmgpr1d</i> , das amostras de soro sanguíneo utilizadas para testes de estabilidade. Linha mais grossa divide as amostras de teste de estabilidade das amostras preparadas dos testes de congelamento e descongelamento sucessivos.....	75
Tabela 4: Atribuição dos sinais dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de amostras de soro sanguíneo de pacientes com AVEi e controle. Metabólitos em itálico foram encontrados em espectros de alguns pacientes, enquanto os demais foram encontrados em todos os espectros adquiridos. ....	87
Tabela 5: Listagem dos cinco melhores discriminações para cada tipo de escalamento com e sem normalização, incluindo os pares de componentes principais com seus respectivos valores- <i>p</i> e porcentagem de variância explicada. ....	118
Tabela 6: Resultados para as análises das amostras ao longo do tempo nas quais se observou discriminação juntamente dos <i>buckets</i> apresentados em cada uma delas e os metabólitos correspondentes. ....	122
Tabela 7: Resumo dos resultados das análises quimiométricas das amostras dos pacientes de controle e que sofreram AVEi em que se obteve discriminação total ou parcial.....	133

---

Tabela 8: Principais metabólitos que sofreram alterações em suas concentrações após o AVEi. ....	150
Tabela 9: Atribuição dos sinais de EDTA livre e complexado com cálcio e com magnésio e a lista dos metabólitos que possuem sinais sobrepostos pelos sinais de EDTA conforme publicado por Barton e colaboradores (2010).....	170

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1: Número de artigos científicos publicados com os respectivos termos, conforme compilado em ISI Web of Science. ....	31
Gráfico 2: Quantidade de amostras correspondentes a cada período após o AVEi ou após a primeira coleta no caso do pacientes de controle. ....	56
Gráfico 3: Distribuição dos pacientes segundo o sexo.....	57
Gráfico 4: Distribuição dos pacientes que sofreram AVEi de acordo com a faixa etária. ....	58
Gráfico 5: Incidência dos principais fatores de risco apresentados pelos pacientes que sofreram AVEi. ....	59
Gráfico 6: Distribuição das etiologias identificadas para os pacientes com AVEi, de trombólise e não trombólise. ....	60
Gráfico 7: Gráfico mostrando o prognóstico dos pacientes trombólise e não trombólise avaliados clinicamente segundo escala de Rankin modificada: prognóstico bom (escala de Rankin modificada de 0 a 2) e prognóstico ruim e óbitos (escala de Rankin modificada acima de 3 a 6). ....	60

**RESUMO**

INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES INDICATIVOS DA EVOLUÇÃO DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ATRAVÉS DE RMN ALIADA A QUIMIOMETRIA. Estratégias metabonômicas baseadas em análises de RMN de biofluidos têm sido utilizadas com eficácia no diagnóstico e prognóstico de doenças, além de auxiliar na compreensão de mecanismos patológicos. Uma patologia de grande impacto na sociedade atual é a doença vascular encefálica, a qual ainda é a principal causa de óbitos no Brasil por doenças cerebrovasculares e a maior causa de incapacidade neurológica no mundo. Dentre os casos de DVE, 80 a 85% são de origem isquêmica. Neste sentido, espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  foram obtidos em um espectrômetro de RMN Bruker de 400 MHz a partir de amostras de soro e plasma sanguíneo de pacientes que sofreram acidente vascular encefálico isquêmico nas primeiras 24 horas após a ocorrência e ao longo de seis meses. Paralelamente foram coletadas amostras de pacientes saudáveis para comparação com os pacientes doentes. As análises foram realizadas após se estabelecer o método de preparo das amostras e os parâmetros espectrais. Estudos de estabilidade mostraram que as amostras de soro sanguíneo são bastante sensíveis a mudanças de temperatura e pouco estáveis quanto maior a temperatura em que foram expostas. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  apresentaram o perfil característico de amostras de soro ou plasma, apresentando sinais de colesterol, lipídeos e lipoproteínas, aminoácidos, glicoproteínas, ácidos orgânicos, açúcares, além de outros metabólitos. Os resultados das análises quimiométricas para as amostras de plasma foram menos satisfatórios do que para as análises com as amostras de soro, provavelmente devido aos sinais de EDTA e derivados. As análises quimiométricas, realizadas em dois programas computacionais diferentes, permitiram perceber discriminação entre grupos doente e controle principalmente para os períodos iniciais após o AVEi, demonstrando o potencial da técnica em diagnosticar a doença nas primeiras horas ou dias. Os principais metabólitos que sofreram alterações foram colesterol, leucina, isoleucina, alanina, acetoacetato, piruvato, glutamina, colina e derivados, fosfolipídios, fosfatos inorgânicos, glucose, tirosina, histidina, fenilalanina, hipoxantina e formato. Modelos de classificação desenvolvidos a partir dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  mostraram boas sensibilidade e especificidade. Análises das amostras de pacientes que receberam ou não tratamento trombolítico indicaram diferentes mecanismos metabólicos após a administração do medicamento, inclusive mostrando um efeito benéfico do mesmo. Também foi possível perceber alterações específicas dos pacientes que sofreram óbito. Portanto, a abordagem metabonômica baseada em dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  mostrou ter grande potencial no diagnóstico do AVEi e em auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos desencadeados pela doença e pelo tratamento trombolítico.

**ABSTRACT**

INVESTIGATION OF INDICATIVE BIOMARKERS OF THE VASCULAR BRAIN INJURY BY NMR ALLIED TO CHEMOMETRICS. NMR-based metabonomic analyzes of biofluids has been successfully used in the diagnosis and prognosis of disease, as well as in the understanding of pathological mechanisms. Cerebral vascular disease is a pathology of great impact in society today, which is still the leading cause of death in Brazil due to cerebrovascular diseases and the leading cause of neurological disability worldwide. Among the cases of cerebral vascular disease, 80-85% is of ischemic origin. Accordingly,  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra were obtained in a spectrometer Bruker of 400 MHz from serum and plasma of patients who suffered ischemic stroke within the first 24 hours of the occurrence and in the course of six months. Samples from healthy patients were also collected for comparison with disease patients. Analyses were performed after settling the method of sample preparation and spectral parameters. The stability studies showed that samples of serum are sensitive to changes in temperature and less stable the higher the temperature at which were exposed. The  $^1\text{H}$  NMR spectra showed characteristic profile of serum or plasma, showing signals of cholesterol, lipids and lipoproteins, amino acids, glycoproteins, organic acids, sugars and other metabolites. The results of the chemometrics analyzes for plasma samples were less satisfactory than for analysis with the serum, probably due to signals from EDTA and derivatives. The chemometric analysis performed on two different computer programs, allowed discrimination between disease and control groups mainly for initial periods after ischemic stroke, demonstrating the potential of the technique in diagnosing the disease in the first hours or days. The principal metabolites which have been altered included: cholesterol, leucine, isoleucine, alanine, acetoacetate, pyruvate, glutamine, choline and derivatives, phospholipids, inorganic phosphate, glucose, tyrosine, histidine, phenylalanine, hypoxanthine and formate. Classification models developed from the  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra showed very good sensitivity and specificity. Analysis of samples from patients who had received thrombolytic therapy or not indicate different metabolic pathways after administration of the drug, even showing a beneficial effect of same. It was also possible to detected specific changes of patients who had died. Therefore, the metabonomics approach based on data of  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR have shown great potential in the diagnosis of ischemic stroke and assist in better understanding of the mechanisms triggered by the disease and thrombolytic therapy.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A Metabonômica

Estudos metabonômicos têm ganhado crescente atenção nos últimos anos devido a seu rápido desenvolvimento e grande potencial em compreender sistemas biológicos complexos do ponto de vista de moléculas pequenas. O termo metabonômica foi pela primeira vez definido por Nicholson e colaboradores (1999) como a medida quantitativa da resposta metabólica dinâmica de sistemas vivos a estímulos patofisiológicos ou modificação genética. Diferentes definições foram propostas na literatura diferenciando os termos metabolômica, metabonômica e perfil metabólico nos anos seguintes. A Tabela 1 apresenta definições propostas para diferentes termos relacionados. Porém na prática os termos são muitas vezes utilizados indistintamente e seguem procedimentos semelhantes.

**Tabela 1:** Definições de termos relacionados à metabonômica conforme encontrado na literatura.

Termo	Definição	Referência
Metabólito	Moléculas de baixa massa molecular que participam em reações metabólicas e são necessárias para preservação, crescimento e funcionamento normal da célula.	Schripsema, 2010.
Metaboloma	Conjunto de todos os metabólitos e substâncias de baixa massa molecular (abaixo de 1500 Da) que podem ser encontrados em uma célula, órgão ou organismo.	Wishart, 2008.
Metabolômica	Identificação não tendenciosa e quantificação de todos os metabólitos em um sistema biológico. A preparação das amostras não deve excluir metabólitos. Técnica analítica deve ser altamente sensível e seletiva.	Dunn e Ellis, 2005; Nicholson e Lindon, 2008.
Metabonômica	Medida da resposta metabólica dinâmica e global de sistemas vivos a estímulos biológicos ou manipulações genéticas	Nicholson e Lindon, 2008.
Perfil metabólico	Identificação e quantificação de um conjunto de metabólitos de uma rota metabólica específica ou classe de compostos específicos. Inclui análise de metabólitos alvos. Geralmente a preparação da amostra e instrumentação empregadas tem função de isolar os compostos de interesse da matriz antes da análise.	Schripsema, 2010; Dunn e Ellis, 2005.
Impressão digital metabólica	Análise rápida, global e não tendenciosa de amostras com o objetivo de classificar amostras com base em padrões metabólicos ou "impressões digitais" que sofreram alterações em resposta a doenças, perturbações genéticas ou ambientais. Tem como objetivo identificar os metabólitos responsáveis pela classificação. Geralmente não é feita quantificação e as análises são rápidas.	Schripsema, 2010; Dunn e Ellis, 2005.

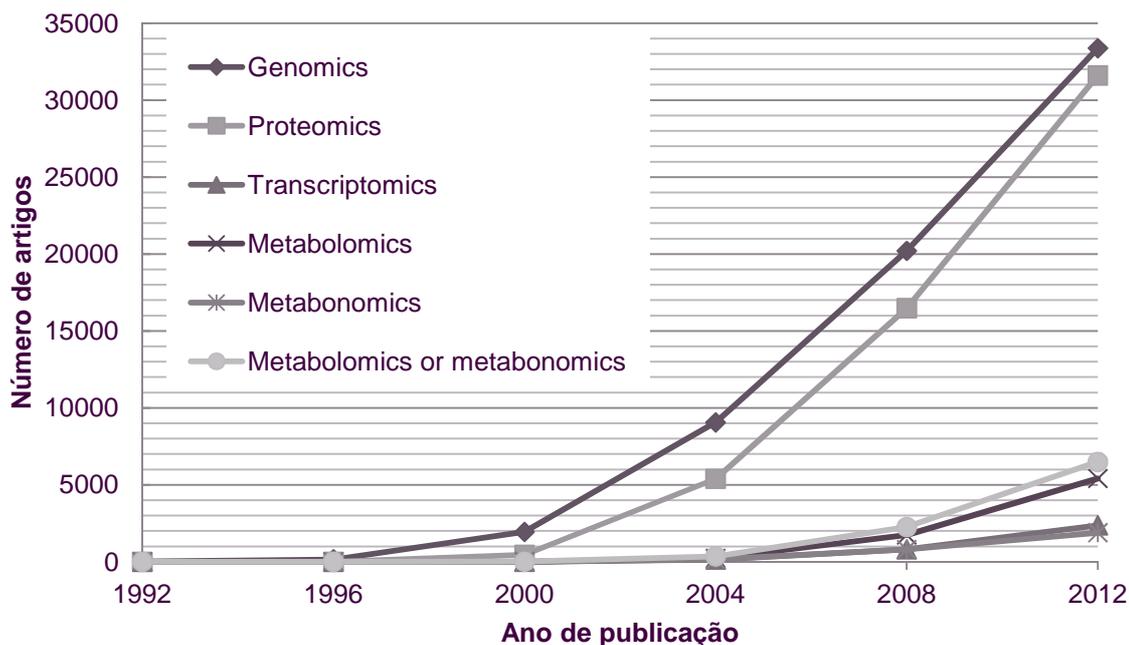
O metaboloma é o objeto de estudo da metabonômica. Este termo foi introduzido por Oliver e colaboradores (1998), em analogia aos termos já existentes como genoma e proteoma, e engloba toda uma faixa de substâncias endógenas e exógenas, tais como peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, vitaminas, polifenóis e qualquer outra substância que possa ser usada, ingerida ou sintetizada por uma dada célula ou organismo (Wishart, 2008). Estas moléculas de baixa massa molecular (abaixo de 1500 Da) estão envolvidas em diversas funções críticas em sistemas biológicos, incluindo metabolismo energético, de sinalização e na construção de complexos biopolímeros. Isto torna muito importante a compreensão de suas estruturas químicas e vias de reações (Bingol e Brüsweiler, 2014). Os componentes do metaboloma podem ser vistos como os produtos finais da expressão gênica, o processo pelo qual a informação contida em um gene é processada num produto gênico, tais como proteínas e ácido ribonucleico (RNA), e definem o fenótipo, ou as características observáveis, de uma célula ou tecido. Sendo assim, as concentrações metabólicas podem ser consideradas a resposta final de sistemas biológicos a mudanças genéticas ou ambientais (Ma *et al.*, 2012). Assim, as análises quali e quantitativa de um grande número de metabólitos promovem uma visão abrangente do *status* bioquímico de um organismo, o que pode ser usado para monitorar e acessar a função gênica. Por outro lado, o transcriptoma e o proteoma, objetos de estudo já por diversos anos, têm recebido críticas quanto à capacidade de prever a função gênica. Embora o transcriptoma represente o mecanismo de entrega do código translacional para a síntese de proteínas nas células, aumentos nos níveis de RNA mensageiros (RNAm) nem sempre se correlacionam com aumentos nos níveis de proteínas. Além disso, uma vez traduzida, uma proteína pode estar ou não enzimaticamente ativa. Devido a estes fatores, mudanças no transcriptoma e proteoma não necessariamente correspondem a alterações no fenótipo bioquímico. Ainda, RNAm e proteínas são identificadas através de banco de dados, estando assim dependente da abrangência de informações do banco de dados utilizado (Sumner *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas, presenciou-se o surgimento e crescimento das chamadas tecnologias “ômicas”, incluindo a genômica, transcriptômica, proteômica e metabonômica. A genômica tem como principal objetivo determinar os produtos gênicos e os potenciais alvos terapêuticos. A transcriptômica, por sua vez, investiga alterações em níveis de expressão gênica, enquanto a proteômica estuda a tradução de proteínas. Conforme destacado por Ma e colaboradores (2012) o desenvolvimento de técnicas analíticas tem aumentado a capacidade destas tecnologias estudarem inteiras classes de biomoléculas, porém não conseguem chegar aos valiosos biomarcadores que resultaram das alterações bioquímicas envolvidas no sistema em estudo. Já a metabonômica é o ponto final da transcriptômica e da proteômica, sendo considerada complementar a estas e à

genômica, podendo, portanto, prover a informação mais abrangente dentre as tecnologias “ômicas”. A metabonômica oferece muitas vantagens em comparação às demais tecnologias “ômicas”, sendo uma das mais vantajosas a proximidade biológica do fenótipo do sistema o que permite a rápida observação das perturbações ocorridas através do metaboloma (Zhang *et al.*, 2012a). A integração dos dados obtidos através destas diferentes tecnologias com informações obtidas através da metabonômica poderá prover uma visão mais ampla dos sistemas biológicos e talvez fornecer a evidência necessária para indicar com confiança quais os biomarcadores que tem real valor e assim, indicar quais valem os esforços de um processo de validação (Claudino *et al.*, 2012; Laborde *et al.*, 2012; Veenstra, 2012).

A metabonômica iniciou anos após as demais tecnologias “ômicas”, conforme o Gráfico 1, e, portanto, ainda está menos amadurecida. Porém já tem apresentado um grande impacto em diversas áreas da ciência, incluindo diagnóstico de doenças, busca por biomarcadores, toxicologia, descoberta de novas drogas e controle de qualidade de alimentos (Veenstra, 2012). Isto é comprovado pelo grande aumento no número de artigos nas áreas de metabonômica e metabolômica, conforme mostra o Gráfico 1 construído com dados da base de dados ISI Web of Science. Este aumento no número de estudos na área se dá principalmente devido aos muitos atrativos da metabonômica, sendo um dos principais sua habilidade de gerar perfis a partir de biofluidos com simples preparo de amostra, permitindo ao analista obter uma visão naturalista e em grande parte imparcial da sua composição, representando com grande aproximação a situação *in vivo* (Zhang *et al.*, 2012b).

Quando se compara a metabonômica com as tecnologias correlatas, percebe-se que o crescimento foi muito menor (Gráfico 1). Schripsema (2010), em um estudo das publicações em cada uma das tecnologias “ômicas”, atribuiu o menor crescimento da metabonômica em relação à genômica e proteômica à falta de métodos bem definidos de análise, ao contrário das outras duas áreas, além do fato de que a metabonômica foi introduzida mais recentemente. O mesmo autor atribui o crescimento da metabonômica em anos recentes aos avanços nas técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que possibilitaram melhor compreensão do perfil metabólico das amostras. Isto unido aos avanços da quimiometria permitiu a avaliação de grandes conjuntos de dados e a percepção de alterações significantes de parâmetros específicos. Estes fatores apontam para a grande probabilidade de que o crescimento apresentado continue e que atinja níveis similares aos da genômica e proteômica.



**Gráfico 1:** Número de artigos científicos publicados com os respectivos termos, conforme compilado em ISI Web of Science.

A metabonômica vem de encontro à necessidade de encontrar biomarcadores mais sensíveis aos utilizados atualmente, pois os marcadores detectados por análises clínicas convencionais e métodos histopatológicos não são específicos e apenas apresentam aumentos significativos após lesões ou doenças estarem em estágios avançados. Biomarcadores, definidos como parâmetros biológicos, bioquímicos ou biofísicos que possam ser monitorados de forma objetiva e reprodutível em modelos animais ou humanos (Feuerstein e Chavez, 2009; Laborde *et al.*, 2012), podem ser considerados ideais quando são capazes de identificar doenças em estágios iniciais, resultando em tratamentos mais eficazes. Para serem considerados ótimos para uso clínico, devem poder ser rapidamente analisados, com bom custo-benefício, específicos e sensíveis, capazes de discriminar pacientes doentes e saudáveis bem como prever o risco da doença (Laborde *et al.*, 2012). Um exemplo é o uso de troponina na avaliação do enfarte do miocárdio (Jickling *et al.*, 2011). Neste sentido a metabonômica se tornou uma tecnologia promissora para aplicação na área de patologia, e seus benefícios tem sido demonstrado em diversas áreas clínicas (Zhang *et al.*, 2012b), como na busca por biomarcadores como meio diagnóstico e indicadores da progressão de doenças (Nicholson *et al.*, 1999; Lindon *et al.*, 2003; Solanky *et al.*, 2003; Azmi *et al.*, 2005; Iorio *et al.*, 2005; Ginsburg *et al.*, 2005; Kirschenlohr *et al.*, 2006; Akira *et al.*, 2005, 2008 e 2010; Makinen *et al.*, 2008; Bertini *et al.*, 2012; Duarte e Gil, 2012).

Além disso, a metabonômica tem sido aplicada para estudar o efeito de drogas no organismo (Holmes *et al.*, 1998; Waters *et al.*, 2001), toxicologia (Holmes *et al.*, 2000; Lindon *et al.*, 2003), análise fitoquímica e desenvolvimento de novas drogas (Sumner *et al.*, 2003; Shyur e Yang, 2008; Powers, 2009; Schripsema, 2010), análise de alimentos e seus efeitos nutritivos (Solanky *et al.*, 2003; Wishart, 2008; Mannina *et al.*, 2012) e determinação da equivalência substancial de organismos geneticamente modificados (Barison, 2005; Plischke *et al.*, 2012; Choze *et al.*, 2013).

## **1.2 Doença Vascular Encefálica (DVE)**

Uma patologia de grande impacto na sociedade atual é a doença vascular encefálica (DVE), a qual corresponde a perda repentina da circulação cerebral, resultando em correspondente perda da função neurológica (Stedman, 2003; Hasan *et al.*, 2012). Apesar da diminuição da mortalidade em muitos países (Mirzaei *et al.*, 2012), incluindo o Brasil (Garritano *et al.*, 2012), a DVE ainda é a principal causa de mortes no Brasil por doenças cerebrovasculares e a maior causa de incapacidade neurológica no mundo (Ministério da Saúde, 2007), o que acarreta em um grande ônus para a economia e para setores de saúde e cuidados (Saenger e Christenson, 2010). O Brasil apresenta a quarta taxa de mortalidade entre todos os países da América Latina, a qual também é superior à taxa apresentada pelos países desenvolvidos (Ministério da Saúde, 2007; Garritano *et al.*, 2012). Isto se dá em decorrência da negligência a este tipo de doença no país, o que inclui pouco enfoque no controle dos fatores de risco, má organização dos cuidados médicos e falta de financiamento em pesquisa no campo das doenças vasculares encefálicas (Lotufo, 2005).

Existem dois tipos de DVE: isquêmico e hemorrágico. A DVE hemorrágica envolve o rompimento de um vaso sanguíneo provocando extravasamento de sangue e formação de um hematoma (coágulo) no parênquima cerebral. Dentre os casos de DVE, 80 a 85% são de origem isquêmica (acidente vascular encefálico isquêmico - AVEi) (Raffin, 2002), isto é, ocorrem pela oclusão ou entupimento de vasos cerebrais, reduzindo o fluxo sanguíneo cerebral regional com o desencadeamento de mecanismos de morte celular e com isto, manifestando-se com sintomas focais como alterações de linguagem, motoras e sensitivas. Embora ambos apresentem fatores de risco similares, os mecanismos na fase aguda são diferentes (Hasan *et al.*, 2012).

### **1.2.1 Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEi)**

Apesar de englobada em um grande grupo de doenças devido suas manifestações clínicas semelhantes, o AVEi pode apresentar diferentes mecanismos, sendo o mais frequente a embolia, isto é, a obstrução de um vaso por deslocamento de

um êmbolo até o local da obstrução. A embolia pode ser originada de trombos cardíacos, formados por coagulação de sangue no interior do vaso sanguíneo, ou de doença esteno-oclusiva aterosclerótica nos vasos cervicais e intracranianos, a qual pode reduzir o fluxo sanguíneo em determinada área cerebral ocasionando um AVEi por hipoperfusão sanguínea. Outro mecanismo comum do AVEi é a degeneração progressiva de pequenos vasos intracranianos, relacionado a fatores de risco como diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, tabagismo e hipercolesterolemia (Chaves, 2000).

### 1.2.1.1 Diagnóstico do AVEi

O diagnóstico do AVEi é feito basicamente através de exame clínico por um especialista, suplementado por exames de imagem cerebral (Whiteley *et al.*, 2008). Porém, mais de 30% dos diagnósticos iniciais são incorretos, com consequente aumento dos custos pela necessidade de realização de exames adicionais e pela responsabilidade que estes erros de diagnósticos acarretam (Baird, 2007). Uma das causas destes erros é o fato que diversas outras doenças apresentam sintomas similaridades ao AVEi, tais como, enxaqueca, epilepsia focal, lesões estruturais cerebrais, hipoglicemia, tumor cerebral e crises convulsivas (Hasan *et al.*, 2012; Saenger e Christenson, 2010), sendo muito difícil distinguir o pacientes com estas condições, de pacientes que realmente sofreram AVEi (Jickling *et al.*, 2011). Além disso, o diagnóstico é muito dependente da experiência do especialista (Saenger e Christenson, 2010). A tomografia computadorizada (TC) tem sido a técnica principal para diagnóstico, pois possui as vantagens de fácil acessibilidade e rapidez. No entanto, o AVEi é muitas vezes isodensso no exame de TC, o que limita sua aplicação para o diagnóstico, sendo possível apenas excluir a presença de hemorragia (Hasan *et al.*, 2012). Além disso, o exame por RMN de imagem (RMNi), o qual oferece muitas vantagens para o diagnóstico do AVEi, apresenta uma sensibilidade de apenas 73% no diagnóstico nas primeiras três horas do início dos sintomas, além de ser uma técnica nem sempre disponível (Foerch *et al.*, 2009; Hasan *et al.*, 2012). As técnicas de imagem, tanto TC como RMNi, apresentam limitações inerentes de significância logística, pois requerem um tempo considerável para os procedimentos necessários e interpretação clínica (Mauri-Capdevila *et al.*, 2013). Também as análises das imagens radiológicas são propensas a variações entre indivíduos (Saenger e Christenson, 2010). Assim, é um desafio estabelecer o diagnóstico e fazer a decisão de qual tratamento deverá ser adotado em pacientes com sintomas suspeitos de AVEi, sendo que o diagnóstico é frequentemente feito baseando-se mais na probabilidade que na certeza (Hasan *et al.*, 2012). Vale ressaltar, que o diagnóstico rápido e exato em pacientes com suspeita de AVEi é extremamente importante, visto que o quanto mais prontamente é iniciado o tratamento preventivo secundário, menor o risco de ocorrer um

novo AVEi (Whiteley *et al.*, 2008). Isto tanto é verdade, que indústrias farmacêuticas e de biotecnologia tem buscado novos fármacos para serem administrados em pacientes com AVEi nas primeiras 24 horas, com o objetivo de reverter e proteger a região cerebral necrosada (Hasan *et al.*, 2012).

Para auxiliar no diagnóstico e prognóstico dos pacientes, promovendo mais consistência entre os diagnósticos, se desenvolveu a escala de AVE do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIHSS). Esta escala permite quantificar os déficits neurológicos em cerca de cinco a oito minutos e tem potencial para prever possíveis complicações. Porém, o uso desta escala não tem demonstrado uma real melhora no prognóstico dos pacientes (Saenger e Christenson, 2010). Neste sentido, exames de biomarcadores séricos possuem potencial valioso de servir como método auxiliar ao exame clínico e por imagem (Foerch *et al.*, 2009). Estes podem ser utilizados já na avaliação pré-hospitalar, como indicadores da ocorrência do AVEi, o que agilizaria o encaminhamento do paciente para centros especializados capazes de fazerem os exames necessários a fim de indicar a necessidade do início do tratamento trombolítico (Jickling *et al.*, 2011). Portanto, é necessário que a busca por marcadores séricos avance de tal forma que estes possam ser detectados por meio de exames rápidos que permitam diagnosticar a etiologia do AVEi e predizer seu risco futuro (Dambinova *et al.*, 2003; Foerch *et al.*, 2009).

Vários estudos tentam utilizar métodos colorimétricos, cromatográficos e ensaios enzimáticos para análise de metabólitos, proteínas e enzimas que permitam identificar precocemente o mecanismo etiológico do AVEi e a possibilidade de sobrevivência (Dambinova *et al.*, 2003; Foerch *et al.*, 2009; Foerch *et al.*, 2004; Serena *et al.*, 2005). Desta forma, seria possível o direcionamento dos recursos de saúde e a complementação diagnóstica com exames de maior custo, caso necessário. Nos últimos anos, estudos internacionais demonstraram que determinados constituintes séricos, ou biomarcadores, permitem identificar o mecanismo e o prognóstico de pacientes com AVEi (Dambinova *et al.*, 2003; Foerch *et al.*, 2009; Foerch *et al.*, 2004; Serena *et al.*, 2005). Estes biomarcadores estão associados a uma redução crítica nos níveis de oxigênio e de glucose, o que desencadeia fenômenos fisiopatológicos que formam a denominada “cascata isquêmica” descrita por Heyndrickx e colaboradores (1978), caracterizada por uma série de reações que levam a excitotoxicidade. Sendo assim, algumas destas alterações celulares e moleculares podem ser utilizadas no diagnóstico do AVEi, particularmente quando acompanhadas de alterações bioquímicas no sangue periférico. Na busca por estes biomarcadores, diversos estudos têm sido desenvolvidos e as substâncias identificadas como possíveis marcadores do AVEi em níveis séricos ou plasmáticos estão alistadas na Tabela 2, sendo que a grande maioria dos trabalhos

realizados tem sido direcionados a análises de proteínas individuais que possuam relação conhecida com a patofisiologia do AVEi (Jickling *et al.*, 2011; Laborde *et al.*, 2012). Estes marcadores estão associados com dano de tecido cerebral, inflamação, endotélio e coagulação ou trombólise (Jickling *et al.*, 2011).

**Tabela 2:** Alguns possíveis marcadores de AVEi em níveis séricos ou plasmáticos.

<b>Biomarcador</b>	<b>Características</b>	<b>Alterações no AVEi</b>	<b>Método analítico</b>	<b>Referência</b>
Auto-anticorpos aAbs	Anticorpos contra o receptor NMDA.	Predição do AVEi trombótico.	ELISA	Dambinova <i>et al.</i> , 2003
L-arginina	Precursor imediato do óxido nítrico. Precursor da síntese de creatina, poliaminas, citrulina e glutamato.	Associado a progressão para AVEi maligno.	CLAE	Castillo <i>et al.</i> , 1997
BNP	Hormônio vasoativo e vasodilatador.	Aumento na fase aguda e prediz mortalidade pós-evento.	Ensaio imunoenzimático	Laskowitz <i>et al.</i> , 2009
c-Fn	Glicoproteína importante para estímulo e mobilidade celular.	Relacionado com a dimensão do AVEi e achados clínicos.	Ensaio imunoenzimático	Serena <i>et al.</i> , 2005; Moldes <i>et al.</i> , 2008
Dímero D	Produto da degradação da fibrina.	Aumento em AVEi cardioembólico, preditor de recorrência.	Ensaio imunofluorométrico	Laskowitz <i>et al.</i> , 2009
Dimetilarginina assimétrica	Inibidor da síntese do óxido nítrico.	Aumento dos níveis plasmáticos está potencialmente associado ao risco de AVE.	ELIZA e CLAE-EM	Saenger e Christenson, 2010
Endotelina-1	Potente peptídeo vasoconstritor.	Associado com edema cerebral severo em paciente com AVEi tratados com rt-PA.	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima	Moldes <i>et al.</i> , 2008
Glutamato	Neurotransmissor excitatório, se acumula no espaço extracelular levando a danos neurais.	Associado a progressão para AVEi maligno e aumento da lesão causada pelo AVEi.	CLAE	Castillo <i>et al.</i> , 1997; Castellanos <i>et al.</i> , 2008

Interleucina-6	Estimula a produção de células de imunoglobulina B, a proliferação de células T, a ativação do mecanismo natural de morte celular e citotoxicidade.	Associado a progressão para AVEi.	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima	Castellanos <i>et al.</i> , 2008
Lipoproteína associada à fosfolipase A2	Enzima com função de hidrolisar fosfolípídeos em LDL oxidada levando a formação de subprodutos pós-inflamatórios como lisofosfatidilcolina e ácidos graxos oxidados.	Marcador independente de risco cardiovascular e preditor de eventos relacionados ao AVE.	Imunoensaios	McConnell e Jaffe, 2008; Saenger e Christenson, 2010
NSE	Enzima glicolítica encontrada em tecido neuronal e nas células do sistema neuroendócrino, marcador de neuroblastoma e câncer de pulmão.	Aumento em AVEi.	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima	Hill <i>et al.</i> , 2000
Óxido nítrico	Mediador endógeno do fluxo sanguíneo cerebral.	Evolução desfavorável do AVEi.	Espectrofotometria	Taffi <i>et al.</i> , 2008
Peptídeo NR2	Produto da degradação proteolítica dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA).	Possível biomarcador para diferenciar AVEi agudo de outras condições que mimetizam o AVEi e de pacientes saudáveis.	ELISA	Dambinova <i>et al.</i> , 2012
Peroxinitrito	Oxidante reativo e mediador do dano cerebral.	Aumento em AVEi.	Ensaio fluorométrico	Taffi <i>et al.</i> , 2008
Proteína S100b	Proteína ligante de cálcio, marcador de dano cerebral.	Relacionado com a dimensão do AVEi e seqüela. Possível biomarcador plasmático para diferenciar AVE isquêmico e hemorrágico.	Ensaio imunoluminométrico	Foerch <i>et al.</i> , 2004; Montaner <i>et al.</i> , 2012.
MMP9	Remodelação tecidual.	Relacionado com tamanho do AVEi e achados clínicos.	Ensaio imunoenzimático	Hill <i>et al.</i> , 2000; Serena <i>et al.</i> , 2005; Moldes <i>et al.</i> , 2008

Porém, o desenvolvimento de biomarcadores sanguíneos para AVEi tem encontrado dificuldades em se tornarem de fácil aplicação na prática clínica devido a vários fatores, como por exemplo a diminuição da entrega de proteínas do cérebro para a corrente sanguínea após o AVEi, atrasando a liberação de proteínas gliais e neurais, e a heterogeneidade do AVEi (Jickling *et al.*, 2011). Muitos marcadores potenciais de isquemia cerebral e inflamação são encontrados também em outras condições que podem simular o AVEi, tais como, infarto severo do miocárdio e infecção cerebral (Saenger e Christenson, 2010). Além disso, a quantidade de tecido lesado não necessariamente se correlaciona com a severidade da sequela, visto depender da região do cérebro afetada (Whiteley *et al.*, 2008). A complexidade e diversidade dos tipos de tecidos cerebrais, unidas à falta de conhecimento a respeito da completa fisiologia cerebral, também contribuem para a atual escassez de biomarcadores para o AVE, sendo que no momento não há nenhum biomarcador que possa ser usado para diagnóstico, diferenciação e predição do risco de AVE (Saenger e Christenson, 2010). Dada a complexidade dos eventos biológicos que precedem e seguem o AVEi, previsões de variáveis clínicas dependem de um perfil fisiológico mais robusto, o que inclui abordagens “ômicas” tanto para avaliar como para descobrir novos biomarcadores nas vias metabólicas (Foerch *et al.*, 2009).

Dentre as tecnologias “ômicas”, a primeira a ser utilizada no estudo de AVE foi a genômica (Moore *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006; Baird, 2007; Xu *et al.*, 2008). Enquanto o perfil genômico se relaciona com a reação do sistema biológico ao estresse, a real fisiopatologia do AVEi, ou o mecanismo que leva ao aparecimento da doença, requer a análise adicional da proteômica. Por meio desta se obtém a compreensão do espectro de proteínas presentes em uma célula ou organismo após extensivo processo transcricional. Por exemplo, as proteínas PARK7 e NDKA foram identificadas como possíveis biomarcadores do AVEi utilizando fluido cérebro-espinhal obtidos em autópsia (Allard *et al.*, 2005). A sensibilidade na previsão entre grupos controle e com AVEi foi de 57% para o PARK7 e 67% para o NDKA, e especificidade de 90% para ambas. Embora estes resultados sejam promissores ainda requerem rigorosa validação.

Na área de proteoma, um grande volume de dados é frequentemente obtido e a correlação destes com as vias metabólicas afetadas pelo AVEi podem não ser tão óbvias. Neste sentido, a metabonômica oferece uma alternativa na busca de biomarcadores. Por exemplo, um estudo inicial com o objetivo de compreender os mecanismos da progressão do AVE, ainda não completamente entendidos, avaliou as concentrações de glutamato e glicina no plasma e no fluido cérebro-espinhal por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Desta forma se observou que os dois metabólitos apresentaram-se em maiores concentrações em ambos biofluidos nos pacientes em que houve

progressão do AVEi em relação com aqueles em que a doença permaneceu estável, sendo assim, bons candidatos a preverem a progressão de AVEi em estágios iniciais da doença (Castillo *et al.*, 1997). Ainda em relação ao glutamato, outro estudo utilizando a mesma técnica comprovou que altas concentrações plasmáticas deste aminoácido estão associadas com o aumento da lesão no acidente isquêmico (Castellanos *et al.*, 2008). Recentemente, Dambinova e colaboradores (2012), em um estudo com 192 pacientes com suspeita de AVEi, sugeriram que o peptídeo NR2 possa ser um possível biomarcador do AVEi agudo, visto ter mostrado correlação moderada com lesões causadas pelo AVEi, permitindo diferenciar pacientes que sofreram o AVEi daqueles que apresentaram condições que apenas mimetizam o AVEi ou de pacientes de controle.

Em um estudo correlacionando o metabolismo do óxido nítrico com o AVEi, foram avaliados os níveis de óxido nítrico e peroxinitrito por meio de análise espectrofotométrica e ensaio fluorométrico, em pacientes com AVEi ao chegarem ao hospital e após trinta dias comparados a um grupo de controle. Os níveis plasmáticos de peroxinitrito foram significativamente maiores nos pacientes com AVEi, enquanto aqueles do grupo de controle apresentaram níveis de óxido nítrico significativamente maiores. Os níveis de óxido nítrico foram associados com uma evolução desfavorável do AVEi, mostrando que o metabolismo do óxido nítrico pode gerar biomarcadores relacionados ao AVEi (Taffi *et al.*, 2008). No entanto, Whiteley e colaboradores (2008) relataram em uma revisão de biomarcadores sanguíneos para diagnóstico de AVEi, incluindo vários citados anteriormente, que apesar da alta sensibilidade e especificidade encontradas há limitações na concepção e elaboração de todos os estudos. Desta forma, os autores não recomendam o uso de nenhum destes para a prática clínica.

### **1.2.1.2 Prognóstico do AVEi**

No AVEi, o prognóstico ou a previsão de como a doença irá evoluir e o índice de recorrência estão relacionados com a etiologia identificada, ou seja, o estudo da causa da doença. A doença esteno-oclusiva nos vasos cervicais e intracranianos apresenta maior risco de recorrência quando comparada as demais etiologias (Moroney *et al.*, 1998; Purroy *et al.*, 2007). Estudos anteriores demonstram a importância na investigação precoce destes pacientes para que seja introduzida a terapia ideal e individualizada, tanto em caráter agudo como para prevenção secundária. Esta investigação deve ser na busca de doença estenótica intracraniana, extracraniana, fonte cardioembólica e fatores de risco tratáveis, entre os quais o diabetes mellitus, a hipertensão arterial e a hipercolesterolemia (Moroney *et al.*, 1998; Purroy *et al.*, 2007; Chernyshey *et al.*, 2005; Tsvigoulis *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2009; Martínez-Sánchez *et al.*, 2009).

Atualmente, a progressão do DVE, tanto isquêmico como hemorrágico, pode ser apenas parcialmente prevista, sendo baseada em exames clínicos e laboratoriais de rotina, além de exames de imagem (Dambinova *et al.*, 2003). Portanto, é muito importante que se crie meios de avaliação do prognóstico, visto que um terço das mortes e prognósticos ruins após o AVEi são causados por complicações que poderiam ser previstas, especialmente infecções. A identificação precoce de biomarcadores que indiquem possíveis complicações seria, portanto, de valiosa ajuda para que se de início a terapias adequadas e serviria como guia das decisões a respeito do tratamento (Meisel *et al.*, 2012). Neste sentido, estudos prévios investigaram a possibilidade da identificação de pacientes com maior risco de evolução para AVEi maligna, quadro de alta mortalidade, por meio de biomarcadores séricos (Foerch *et al.*, 2004; Serena *et al.*, 2005; Moldes *et al.*, 2008). Estes e outros estudos demonstram que marcadores sanguíneos podem ser úteis no acompanhamento do AVEi tanto para sugerir possíveis mecanismos da doença que levam a maus resultados como para serem usados como uma previsão clínica de possíveis prognósticos. Porém, em uma revisão de estudos realizados entre 1966 e 2007 se mostrou que embora alguns marcadores apresentassem certa habilidade de previsão, nenhum dos estudos foi capaz de demonstrar que o biomarcador em questão adicionou capacidade de previsão a um modelo clínico validado. Desta forma, a utilidade clínica de biomarcadores sanguíneos que possam prever o prognóstico de AVEi ainda deve ser estabelecido (Whiteley *et al.*, 2009). Portanto, os mesmos autores conduziram um estudo com 270 pacientes que sofreram AVEi dos quais 112 tiveram sequelas ruins após três meses, e identificaram que apenas as substâncias interleucina-6 e peptídeo natriurético cerebral *N*-terminal como significativamente relacionados ao prognóstico ruim. No entanto, nenhum dos metabólitos mostrou ter poder suficiente de prever o prognóstico ruim a ponto de poder ser utilizado para fins clínicos, sendo necessário continuar a busca por marcadores com melhores capacidades de fazerem essa previsão (Whiteley *et al.*, 2012). Este fato aponta para a dificuldade de escolher determinados biomarcadores em um momento específico para prever eventos que envolveriam múltiplas interações genéticas e ambientais ao longo de um período de tempo. Dada a complexidade dos eventos biológicos que precedem e seguem o AVEi, previsões de variáveis clínicas dependem de um perfil fisiológico mais robusto, o que inclui abordagens “ômicas” tanto para avaliar como para descobrir novos biomarcadores nas vias metabólicas (Foerch *et al.*, 2009).

Em outra revisão sistemática mais abrangente, incluindo estudos metabolômicos e proteômicos de biomarcadores sanguíneos de AVE hemorrágico e isquêmico, tanto para diagnóstico como para prognóstico, bem como, estudos que buscam prever o desfecho de intervenções farmacológicas, tal como, a trombólise (Hasan *et al.*, 2012),

foram encontrados 136 possíveis biomarcadores, dos quais apenas oito tiveram seus resultados suportados pela análise estatística. Neste trabalho, os autores enfatizaram que o desenvolvimento de análises metabólicas baseadas em amostras sanguíneas no diagnóstico e prognóstico do AVEi possui grandes implicações, visto que o uso de biomarcadores removeria a necessidade de testes baseados em análises de proteínas que geralmente requerem análises laboratoriais demoradas e complexas.

### **1.2.1.3 Terapia trombolítica**

O uso de ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA) tem revolucionado o tratamento de AVE desde a aprovação pela *Federal Drug Administration*, dos Estados Unidos das Américas, para ser usado como trombolítico em casos selecionadas de AVEi agudo (Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares, 2002; Saenger e Christenson, 2010). Até o momento o tratamento trombolítico, como é denominado, é o tratamento mais efetivo disponível. Este tratamento visa a desobstrução da artéria em que houve a obstrução que causou o AVEi, seja por êmbolo ou trombo, antes que a lesão tecidual atinja um grau irreversível (Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares, 2002).

Porém, para tanto, é vital que se determine rapidamente se o paciente deve ou não receber este tipo de tratamento, visto que há um tempo específico com duração de apenas algumas horas para se proceder o tratamento, denominado “janela terapêutica”, a fim de conseguir que o mínimo de tecido cerebral sofra dano (Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares, 2002; Saenger e Christenson, 2010). Por outro lado, é extremamente importante que se tenha certeza do diagnóstico do AVEi, visto que se for administrado a pacientes que não sofreram de fato um AVEi, talvez por ser confundido com AVE hemorrágico ou outras condições que mimetizam o AVEi, o resultado pode ser letal (Saenger e Christenson, 2010).

Conforme ressaltado por Saenger e Christenson, se o AVEi puder ser diagnosticado com mais rapidez e com maior exatidão, poderia crescer as opções de terapias (Saenger e Christenson, 2010).

## **1.3 Biofluidos**

Diversos biofluidos tem sido objetos de estudo da metabonômica, sendo os mais comuns urina, soro e plasma sanguíneo, sendo que saliva, fluido cerebrospinal, tecidos homogeneizados e outros materiais biológicos já tem sido amplamente usados como objetos de estudo (Zhang *et al.*, 2012b). Cada um destes apresenta suas vantagens e desvantagens (Zhang *et al.*, 2012b), porém deve-se enfatizar que as informações fornecidas por cada um destes biofluidos são complementares.

A urina é o fluido mais comumente usado em estudos metabonômicos. Possui a vantagem de sua coleta ser não invasiva, apresentar baixa concentração de proteínas e menos interações intermoleculares o que reduz a complexidade da amostra (Zhang *et al.*, 2012b). Embora o pré-tratamento da amostra seja simples, exige ajuste do pH. É indicada especialmente para estudo de metabólitos que são eliminados rapidamente da corrente sanguínea (Mauri-Capdevila *et al.*, 2013). Diversas aplicações da metabonômica utilizando amostras de urina têm sido relatadas na literatura (Nicholson *et al.*, 1985; Roomick-Rosendale *et al.*, 2001; Waters *et al.*, 2001; Lindon *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2007; Salek *et al.*, 2007; Akira *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2013), incluindo o estudo conduzido por Jung e colaboradores (2011) na investigação de alterações do perfil metabólico após o AVEi, que mostrou o potencial da técnica no diagnóstico do AVEi.

O soro ou plasma sanguíneo são ótimas alternativas para serem usadas como biofluidos em análises metabonômicas. O plasma é o veículo líquido que juntamente dos glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas, constituem o sangue. Apenas o plasma constitui 50-55% do volume sanguíneo (Psychogios *et al.*, 2011). É obtido a partir de uma amostra de sangue após adição de um anticoagulante, centrifugação da amostra e decantação. Se o mesmo procedimento for realizado sem adição de anticoagulante, o fluido sobrenadante é chamado soro, que é menos viscoso que o plasma e não contém fibrinogênio, protrombina e outras proteínas de coagulação (Psychogios *et al.*, 2011). Ambos apresentam composição muito similar, sendo cerca de 95% água e uma grande variedade de substâncias como proteínas e peptídeos, nutrientes, tais como carboidratos, lipídeos e aminoácidos, além de eletrólitos e outras substâncias de baixo peso molecular suspensas ou dissolvidas. A diferença entre os dois é basicamente referente a compostos envolvidos no processo de coagulação (Psychogios *et al.*, 2011).

A porção líquida do sangue, seja denominado soro ou plasma, tem como função principal carregar moléculas pequenas, gases dissolvidos, nutrientes, hormônios e metabólitos residuais através do corpo, além de ter a importante função de regular o pH e a composição iônica de fluidos intersticiais, restringir a perda de fluidos em locais lesionados, serve de defesa como toxinas e patógenos, e estabiliza a temperatura corporal (Psychogios *et al.*, 2011). Portanto, a maioria dos exames clínicos hoje realizados é baseada na análise de soro ou plasma.

A desvantagem da utilização de soro e plasma em estudos metabonômicos utilizando a RMN é que sinais de macromoléculas podem se sobrepor a sinais de moléculas de baixo peso molecular. Ainda assim, estes biofluidos tem ganhado cada vez mais atenção na busca de metabólitos potenciais para o diagnóstico de doenças (Waters *et al.*, 2001; Lindon *et al.*, 2003; Solanky *et al.*, 2003; Tukiainen *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012b; Duarte *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013). O mesmo estudo em

que urina foi utilizada no diagnóstico e compreensão do AVEi, também se utilizou plasma, com resultados bastante satisfatórios (Jung *et al.*, 2011).

#### **1.4 Técnicas analíticas**

A metabonômica e suas áreas correlatas da metabolômica utilizam técnicas analíticas modernas para analisar amostras biológicas (Nicholson e Lindon, 2008). As técnicas de análise mais utilizadas na metabonômica são a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), cada uma apresentando vantagens e desvantagens (Wishart, 2008; Veenstra, 2012; Ma *et al.*, 2012). Quando utilizadas em combinação, estas técnicas permitem obter uma ampla visão do metaboloma (Zhang *et al.*, 2012b). Embora as técnicas analíticas sejam em geral caras, o custo por amostra é baixo, considerando-se que o perfil metabólico de um grande número de amostras pode ser obtido com alto desempenho, resultando em um baixo custo total quando comparado às outras tecnologias “ômicas” (Zhang *et al.*, 2012a).

##### **1.4.1.1 A Ressonância Magnética Nuclear**

A RMN é uma técnica espectroscópica baseada na aplicação de forte campo magnético externo e pulsos de radiofrequência a núcleos de átomos com spin nuclear diferente de zero, ou seja, que tenham número atômico e/ou massa atômica ímpar, como  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  respectivamente. A absorção da energia permitirá a promoção de estados de spin de baixa energia para alta energia, e a subsequente emissão de energia durante o processo de relaxação será detectada na forma de FID (*Free Induction Decay*) no domínio do tempo (Silverstein, 2006).

Desde a década de 40, quando as primeiras observações por RMN foram feitas, diversos avanços ocorreram, vindo a se tornar uma das principais técnicas de análise de química estrutural, juntamente da espectrometria de massas. Hoje a técnica é amplamente utilizada em diversas áreas, tais como química, medicina, ciência de materiais e geologia (Silverstein, 2006). Os principais avanços incluíram o desenvolvimento de imãs supercondutores, a transformada de Fourier, sondas com gradiente de campo e mais recentemente as sondas criogênicas. Como resultado, tais avanços permitiram obter campos magnéticos cada vez mais intensos, bem como a utilização da técnica pulsada, melhorando significativamente a qualidade dos experimentos e aumentando em muito a sensibilidade da técnica.

Embora a RMN apresente como principal limitação a baixa sensibilidade, apresenta grandes atrativos. Estes incluem o fato de poder se obter uma grande

quantidade de informações rapidamente e com mínimo de preparo de amostra, dispensando laboriosos processos de extração e/ou purificação, consumidores de tempo e reagentes (Nicholson *et al.*, 1999; Sumner *et al.*, 2003). Permite também a análise de sólidos e líquidos. Com o desenvolvimento de novas sequências de pulsos, tem-se tornado cada vez mais fácil a edição de espectros e a realização de experimentos bidimensionais que permitem a identificação de compostos inéditos. Assim, a RMN tornou-se uma técnica muito versátil e tecnologicamente desenvolvida, que pode ser utilizada tanto para elucidar compostos como para auxiliar no diagnóstico de doenças.

#### 1.4.1.1.1 RMN de $^1\text{H}$ e outros núcleos

Além da espectroscopia de RMN ser uma técnica não destrutiva e não invasiva, possui a vantagem de poder acompanhar processos bioquímicos por meio de espectros de RMN de diversos núcleos, como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^{31}\text{P}$ . O núcleo de hidrogênio é o núcleo mais utilizado nas análises por RMN. Possui abundância natural de 99%, spin  $\frac{1}{2}$  e como está presente na maioria dos compostos orgânicos, por meio de um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  tem-se uma rápida visualização dos compostos presentes na amostra.

No caso dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  deve-se levar em conta a baixa sensibilidade inerente destes núcleos, o que acarreta em longos tempos de aquisição, tornando inviável a utilização dos mesmos para análises metabolômicas em que é necessária a análise de um grande número de amostras. Uma alternativa é o uso de compostos isotopicamente marcados, que resultam em espectros relativamente simples, formados pelos sinais correspondentes aos compostos com enriquecimento isotópico sobrepostos aos sinais menos intensos das demais moléculas. No entanto, existe a necessidade de incorporar estes compostos isotopicamente marcados na matriz estudada, o que pode representar complicações especialmente no caso de células (Rabenstein *et al.*, 1988).

Por sua vez, o uso de espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  apresenta grandes vantagens no que diz respeito ao uso destes na metabolômica. O núcleo de  $^{31}\text{P}$  possui abundância natural de 100% e alta sensibilidade à técnica de RMN, podendo ser obtido rapidamente. Os espectros resultantes são simples e com baixa sobreposição de sinais, pois a faixa espectral correspondente é bastante ampla e a quantidade de metabólitos a níveis detectáveis que apresentam núcleos de  $^{31}\text{P}$  na estrutura é pequena. Este último, porém, também pode ser encarado como uma desvantagem, pois limita o número de metabólitos que podem ser estudados por meio de espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  (Rabenstein *et al.*, 1988).

#### 1.4.1.1.2 RMN na metabonômica

Na década de 70, após diversos avanços na técnica de RMN, esta começou a ser aplicada no estudo da composição metabólica de biofluidos, células e tecidos. Um dos primeiros estudos publicados foi o de Wilson e Burlingame em 1973, em que foi realizado um estudo do metabolismo do etanol em ratos por meio de espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplados de hidrogênio e deutério de ácido biliático após a administração de  $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-}1,1\text{-}^2\text{H}\text{-etanol}$  e  $2,2,2\text{-}^2\text{H}\text{-etanol}$  (Wilson e Burlingame, 1973). Já na década de 80, Nicholson e colaboradores (1983) publicaram dois trabalhos utilizando a RMN para análises de biofluidos. Em um deles, foi feita a identificação de diversos sinais de metabólitos de baixa massa molecular no plasma e soro de oito espécies de animais e soro comercial, permitindo identificar os teores de cálcio e magnésio por meio de adição de EDTA. No segundo, analisou-se urina de ratos por meio de RMN de  $^1\text{H}$  para avaliar o dano renal causado pela administração de cloreto de mercúrio. Foi possível perceber alterações na concentração de diversos metabólitos, fornecendo assim informações a respeito do metabolismo citotóxico do mercúrio (Nicholson *et al.*, 1985).

No início da década de 90, Garland e colaboradores iniciaram a aplicação de análises estatísticas por reconhecimento de padrões e outras ferramentas bioinformáticas para interpretação e classificação de dados complexos obtidos por RMN a partir de amostras biológicas. Nos estudos publicados, foi demonstrado através da obtenção de espectro de RMN de urina de ratos aliada a métodos de reconhecimento de padrões que é possível obter um grande ganho de informações quando comparado às informações obtidas por meio de análises clínicas (Garland *et al.*, 1990 e 1991).

No que diz respeito à utilização da RMN em análises metabonômicas, a técnica apresenta várias vantagens, visto ser especialmente adaptada para análises de solução complexas e fornecer rica informação inequívoca a respeito do perfil metabólico (Zhang *et al.*, 2012a e b). Espectros de RMN podem atuar como perfis de diagnóstico, uma vez que geram compreensíveis *fingerprints* ou perfis bioquímicos característicos de metabólitos de baixa massa molecular. Em uma amostra de biofluido típica, todas as moléculas que contêm em sua estrutura átomos de hidrogênio, o que inclui aproximadamente todos os metabólitos, darão um espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . O espectro de RMN será, portanto a superposição dos espectros de todos os metabólitos presentes no fluido, definindo o perfil característico da amostra. No entanto, para que os metabólitos sejam detectados na RMN é necessário que estejam presentes na amostra em concentrações superiores ao limite de detecção.

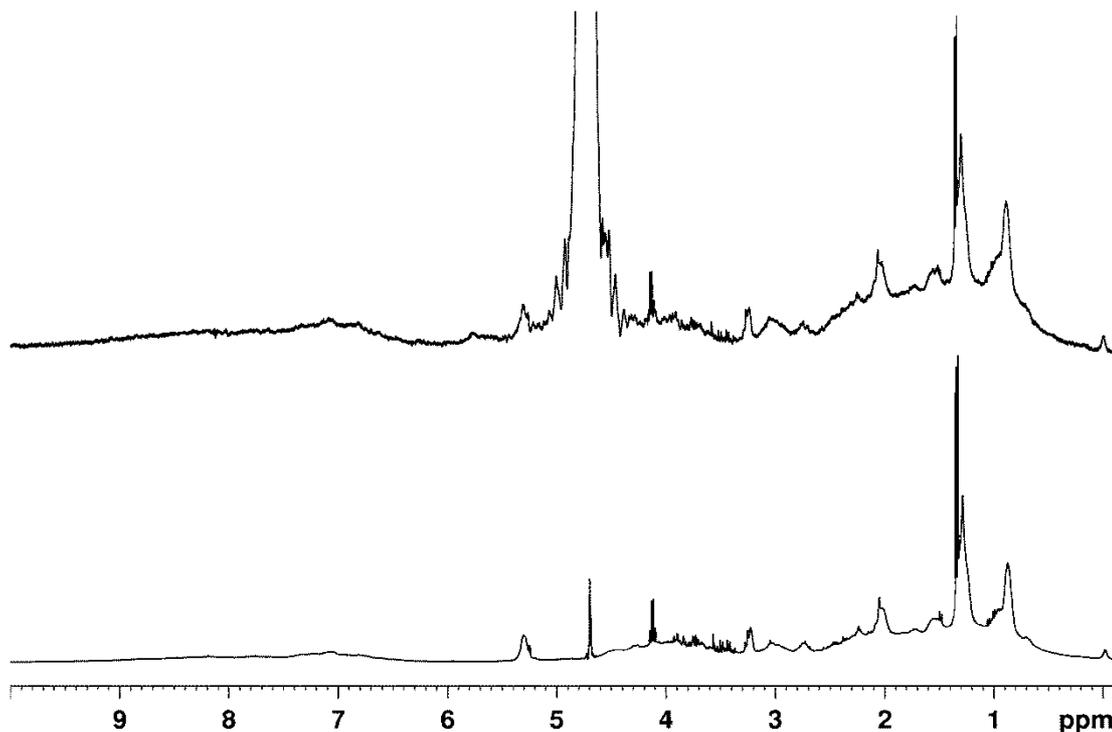
Outra vantagem da RMN é o fato de ser não seletiva, possibilitando observar um grande número de compostos de baixa massa molecular simultaneamente em uma única

análise e provendo valiosa informação estrutural que permite caracterizar componentes de misturas complexas, sendo este o principal diferencial da técnica quando comparada às demais técnicas comumente utilizadas. Utilizando dados de deslocamento químico, multiplicidade, constante de acoplamento e integral de cada sinal, pode-se identificar compostos com exatidão. Além disso, quando necessário é possível utilizar diversas sequências de pulsos que compõe experimentos que fornecem informações complementares, como, por exemplo, experimentos bidimensionais de correlação homo ou heteronucleares a uma ou mais ligações, incluindo: correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY), correlação total  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (TOCSY), correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a ligação direta (HSQC) e correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (HMBC).

Porém, como principal desvantagem a RMN apresenta baixa sensibilidade. Para contornar este problema, tem-se usado sondas criogênicas, magnetos supercondutores com campo mais intensos e microbobinas de radiofrequência miniaturizadas, porém mesmo assim a sensibilidade da técnica ainda é de algumas ordens de magnitude menor do que a espectroscopia de massas (Veenstra, 2012). Por exemplo, enquanto abordagens metabonômicas utilizando a RMN permitem identificar cerca de 20 a 40 metabólitos em extratos de tecidos, e cerca de 100 a 200 em amostras de urina, a técnica de CG-EM permite identificar cerca de 1000 metabólitos. Por outro lado, a RMN permite que se analisem amostras com mínimo preparo de amostra, enquanto técnicas cromatográficas exigem normalmente preparos que consomem muito tempo e reagentes, que podem prejudicar a visualização de certos compostos. A técnica de RMN independe dos produtos serem voláteis ou ionizáveis, como no caso das técnicas de CG-EM e CLAE-EM, respectivamente. Outra vantagem é a possibilidade de quantificação, pois a área de um sinal no espectro, quando este é adquirido dentro dos requisitos para quantificação, é proporcional à concentração daquele núcleo específico. Isto torna possível quantificar com precisão compostos mesmo em misturas complexas, basta ser possível identificar um sinal sem sobreposição. Além disso, a RMN é de fácil operação e automação, fazendo desta uma técnica ideal para a triagem de populações para estudos de desordens metabólicas (Wishart, 2008; Veenstra, 2012; Ma *et al.*, 2012).

No caso de biofluidos, a detecção de sinais pode ser dificultada pela grande quantidade de água presente nas amostras, fazendo com que o sinal correspondente a ressonância dos hidrogênios da água seja muito intenso, sobrepondo assim sinais de metabólitos presentes em concentrações muito menores que da água, conforme ilustrado na Figura 1. Para resolver este problema, já foram desenvolvidas diversas sequências de pulsos que permitem a eliminação, ou supressão, do sinal da água. Algumas sequências de pulso fazem a pré-saturação do sinal da água por meio de excitação seletiva, ou seja, irradiam seletivamente regiões de interesse. Outras fazem a supressão por tirarem

proveito de diferenças entre os tempos de relaxação spin-rede (T1) ou spin-spin (T2) dos hidrogênios da água e das demais moléculas de interesse (Rabenstein *et al.*, 1988). O uso destas sequências já está bem estabelecido e é possível obter espectros com sinais bem resolvidos (Figura 1), com a grande vantagem da grande sensibilidade do núcleo de  $^1\text{H}$ , o que permite obter rapidamente espectros de qualidade e que fornecem uma grande quantidade de informações.



**Figura 1:** Comparação de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos em espectrômetro de RMN de 400 MHz de uma mesma amostras de soro sanguíneo. O espectro de cima foi obtido sem saturação do sinal da água e está ampliado cerca de 3000 vezes. O espectro de baixo foi obtido com saturação do sinal da água usando a sequência de pulso *noesypr1d*.

A espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  tem sido empregada na análise de amostras de tecidos humanos (biópsia) e também de biofluidos, como plasma e soro sanguíneo (Iorio *et al.*, 2005; Mountford *et al.*, 2001; Odunsi *et al.*, 2005; Soper *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2012; Grandizoli *et al.*, 2010). Estudos já publicados utilizando essas matrizes indicam que é possível obter informações relevantes para aplicações bioquímicas e clínicas (Rabenstein *et al.*, 1988, Gartland *et al.*, 1991; Smolinska *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013).

Exemplos da aplicação da RMN em estratégias metabonômicas incluem a correlação entre o perfil lipídico de tecidos cerebrais, após ocorrência do AVEi, utilizando espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e experimentos de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) *in vivo* de partes específicas de cérebro de ratos, por até cinco dias após o acidente vascular. Neste

estudo foi observado acúmulo de lipídeos após a ocorrência do AVEi (Gasparovic *et al.*, 2001).

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{31}\text{P}$  *in vivo* têm sido utilizados na investigação de doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer e Parkinson, identificando diversos biomarcadores destas doenças e provendo muita informação a respeito do metabolismo neurológico (Choi *et al.*, 2007). Outra interessante aplicação da RMN de  $^1\text{H}$  e especialmente de  $^{13}\text{C}$ , foi o estudo das concentrações de glutamato, glutamina e ácido gama-aminobutírico (GABA) como substratos alternativos para obtenção de energia pelos compartimentos neuronal e neuroglial como alternativa a glucose após o AVEi em ratos. Neste, através de infusão de lactato isotopicamente marcado com  $^{13}\text{C}$  e análise dos extratos de tecidos cerebrais, foi possível comprovar que estas substâncias são eficientemente utilizadas como substratos alternativos a glucose após o AVEi (Pascual *et al.*, 1998). Em um estudo recente, a análise de tecidos cerebrais *in vivo* por RMN de  $^1\text{H}$  mostrou ser um eficiente método diagnóstico de AVEi em cachorros, permitindo a identificação após três dias da diminuição nos níveis de *N*-acetil-aspartato, colina, creatinina e mio-inositol e um grande aumento de lactato (Kang *et al.*, 2009). Yang e colaboradores (2012) também utilizaram a RMN para análise de tecido cerebral de ratos para avaliar as mudanças neuroquímicas induzidas por oclusão da artéria cerebral média. Após a identificação de mais de 40 metabólitos, identificou-se que houve alterações significativas nos níveis de metabólitos relacionados a perturbações no ciclo do ácido tricarboxílico, e no metabolismo da colina e ácidos nucleicos. Esses resultados forneceram informações essenciais para o entendimento das alterações causadas pela oclusão da artéria cerebral média e mostraram que a análise da composição metabólica pode ser muito útil para compreender a neuroquímica do AVEi. Jung e colaboradores (2011) publicaram um estudo metabonômico aplicando a RMN de  $^1\text{H}$  aliada a análises quimiométricas na análise de amostras de plasma e urina providas de pacientes que sofreram AVEi, especialmente causado por doença de pequenos vasos. Este estudo mostrou que a técnica é efetiva em diagnosticar o AVEi e em prover informações a respeito da patogênese da doença.

Ainda outro estudo avaliou os efeitos da terapia chinesa a base de ervas para tratamento de AVEi em camundongos com oclusão induzida da artéria cerebral por meio de abordagem metabonômica utilizando RMN (Chen *et al.*, 2012). Após realizar a identificação de vinte metabólitos em amostras de tecidos cerebrais e avaliar as variações nos níveis dos mesmos em amostras de animais com e sem tratamento, notou-se que o perfil metabólico de cérebro de animais tratados foi parcialmente revertido a condições normais. Mais recentemente, o efeito neuroprotetor de outra erva chinesa no AVEi foi estudado por meio de análises por RMN do soro e tecidos cerebrais de ratos

com oclusão da artéria média cerebral (Wang *et al.*, 2014). Esta análise mostrou que a terapia foi capaz de melhorar a condição dos ratos que sofreram AVEi através da diminuição do distúrbio no metabolismo de energia, de membrana e mitocondrial, além de afetar o metabolismo neurotransmissor e de aminoácidos, por aliviar o stress oxidativo e os danos inflamatórios, e recuperar a osmorregulação.

Estes estudos demonstram que a abordagem metabonômica baseada em RMN tem grande potencial em ser usada como uma ferramenta simples e fácil para avaliação de terapias e estudo de patologias, tais como o AVEi.

### **1.4.2 Análises quimiométricas**

Espectros de RMN ou obtidos por meio de outras técnicas são na maioria das vezes muito complexos, e podem ser tratados como um conjunto multidimensional de coordenadas metabólicas, cujos valores são as intensidades ou as integrais de cada sinal e, assim, cada espectro é um ponto no espaço metabólico multidimensional (Nicholson *et al.*, 2007). Na maioria das vezes, os dados espectrais podem ser organizados em tabelas de dados, na qual cada linha constitui um espectro e cada coluna representa uma variável ou fatores medidos, como por exemplo, deslocamentos químicos de espectros de RMN. Isto gera tabelas de dados muito complexos, difíceis de serem resumidas e visualizadas sem as ferramentas apropriadas. Neste sentido, as análises quimiométricas incluem métodos robustos e eficientes para modelagem e análise de complexas tabelas de dados geradas a partir de dados químicos ou biológicos, resultando em modelos interpretáveis e confiáveis (Trygg e Lundstedt, 2007).

O objetivo inicial da análise metabonômica é classificar cada espectro com base na identificação do padrão de sinais ou picos característicos e, então, identificar quais as características espectrais responsáveis por tal classificação. Isto é realizado por meio de análises quimiométricas, que permitem reduzir a dimensionalidade de dados complexos fornecendo gráficos bi- ou tridimensionais, nos quais as amostras similares entre si são agrupadas e facilmente visualizadas em gráficos bi ou tridimensionais (Nicholson *et al.*, 2007). Diversos métodos de análises quimiométricas foram desenvolvidos e os principais são citados a seguir.

#### **1.4.2.1 Análise por Componentes Principais (PCA)**

Um dos métodos de análise quimiométrica mais simples e que tem sido amplamente utilizado em análises metabonômicas é a análise por componentes principais (PCA). Este método expressa a maior parte da variância dos dados por meio de um pequeno número de fatores ou componentes principais (PC). Cada PC é a combinação linear de parâmetros dos dados originais e explica a quantidade máxima

possível da variância não incluída nas PC anteriores. Portanto, cada PC é ortogonal e independente das demais PCs. A maior parte da variância do conjunto de dados é geralmente expressa em apenas algumas PCs, sendo que as demais PCs descrevem apenas ruído espectral (Nicholson *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 1999).

A transformação da complexa matriz de dados em PCs será duas matrizes, denominadas *escores* e *loadings*. Os *escores* são a combinação linear das variáveis originais, consistindo em coordenadas da amostra no modelo estabelecido. No gráfico de *escores* cada ponto representa uma amostra. Por sua vez, os *loadings* definem de que forma as antigas variáveis são combinadas linearmente para formar as novas variáveis. E portanto, indicam quais variáveis possuem o maior peso em transformar a posição das amostras originais da matriz de dados para suas novas posições na matriz de *escores* (Beebe *et al.*, 1998; Neidig, 2009). No gráfico de *loadings*, cada ponto representa uma variável (Nicholson *et al.*, 2007). Portanto, qualquer agrupamento observado no gráfico de *escores* pode ser explicado pela análise do gráfico de *loadings* respectivo (Griffin, 2006; Neidig, 2009; Nicholson e Lindon, 2008; Martin *et al.*, 2009). Além da PCA, há outros métodos não supervisionados, como mapeamento não linear e análise hierárquica de agrupamentos (Nicholson *et al.*, 2007).

O método de PCA tem sido utilizado em diversos estudos metabonômicos, incluindo estudos de toxicidade, análise de alimentos e no estudo de patologias (Holmes *et al.*, 1998 e 2000; Idle e Gonzalez, 2007; Odunsi *et al.*, 2005; Akira *et al.*, 2008; Sinclair *et al.*, 2010; Mannina *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2012).

#### 1.4.2.1.1 Análise estatística de significância

O principal objetivo de estudos metabonômicos é a descoberta de biomarcadores de patologias e a aplicação clínica dos mesmos. Apesar dos resultados promissores obtidos, não há relatos de biomarcadores de patologias em humanos que tenham sido descobertos em análises metabonômicas por RMN e já estejam em uso na prática clínica. Um dos motivos para isto é a falta de testes estatísticos de significância rigorosos na análise por PCA.

Neste sentido, Goodpaster e colaboradores (2010) desenvolveram uma abordagem para introduzir testes estatísticos de significância rigorosos em análises por PCA utilizadas em estudos metabonômicos por RMN. Esta abordagem implementa um algoritmo de árvore de decisão para selecionar e aplicar testes estatísticos apropriados a dados de gráficos de *loadings*. O resultado é um gráfico de *loadings* colorido de acordo com o valor-*p*, sendo que variáveis significantes são coloridas de forma diferentes das não significantes. Isto permite a visualização rápida e direta da significância estatística.

Estas análises têm potencial de acelerar a descoberta de novos biomarcadores por meio de abordagens metabonômicas por RMN e já tem sido implementadas em programas computacionais de análises quimiométricas, como AMIX e *muma*. Também proporciona a pesquisadores acesso aos dados na linguagem de testes estatísticos de significância, o que é essencial na comunicação do valor dos biomarcadores descobertos para profissionais da área médica e clínica. Estes testes ainda apresentam a limitação de apenas poderem ser utilizados na comparação de duas populações, mas há relatos de possíveis modificações que permitam comparação entre múltiplos grupos (Goodpaster *et al.*, 2010).

#### 1.4.2.1.2 Quantização da separação de grupos

Outra limitação das análises por PCA é falta de parâmetros para determinar se a separação dos grupos é estatisticamente significativa. A falta de tais parâmetros torna praticamente inviável a comparação entre estudos independentes ou realizados em diferentes laboratórios. Além disso, os autores de estudos metabonômicos afirmam a existência de metabólitos que distinguem diferentes classes de amostras apenas baseando-se em análise visual, sendo que em muitos casos a separação é tênue ou parcial. De encontro a esta necessidade, estudos têm proposto diferentes formas de quantificar a separação de classes observadas em análises discriminatórias (Anderson *et al.*, 2008; Cuperlović-Culf, *et al.*, 2009; Dixon *et al.*, 2009; Werth *et al.*, 2010).

Destaca-se aqui a proposta de Goodpaster e Kennedy (Goodpaster e Kennedy, 2011) que já foi implementada no programa de análises quimiométricas *muma*. Este método envolve a quantificação da distância entre os grupos por meio da medida da distância de Mahalanobis entre os centróides dos grupos no gráfico de escores bidimensional, e da realização do cálculo de estatística de *Hottelling's T2* seguido da aplicação de teste F para determinar a separação entre os grupos. A utilização de tais parâmetros pode auxiliar na padronização de estudos metabonômicos.

#### 1.4.2.2 Análise Discriminante com calibração multivariada por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

Em contraste aos métodos não supervisionados, métodos supervisionados foram desenvolvidos. Nestes, conjuntos de dados multiparamétricos podem ser modelados de forma que as amostras de um segundo conjunto, de validação, podem ter suas classes previstas baseando-se em modelos matemáticos derivados do conjunto de dados originais, ou de treinamento (Nicholson *et al.*, 2007). O método supervisionado mais comum é a análise por mínimos quadrados parciais (PLS). Este método relaciona dados de uma matriz X contendo variáveis independentes, por exemplo, integrais de sinais de

RMN, com uma matriz Y contendo variáveis dependentes, por exemplo, medidas físico-químicas (Nicholson *et al.*, 2007; Lindon *et al.*, 2001).

O método de PLS pode ser combinado com análise discriminante (PLS-DA) para estabelecer a posição ótima de uma superfície discriminatória que melhor separa os grupos (Nicholson *et al.*, 2007; Neidig, 2009; Wishart, 2008). Neste caso a matriz Y deve conter informações que identifiquem cada grupo, como por exemplo, todas as amostras do grupo doente são numeradas como zero e do grupo sadio como um. A quantificação da separação de classes observadas nas análises por PLS-DA também pode ser realizada (Goodpaster e Kennedy, 2011).

Uma extensão desta abordagem permite a avaliação dos descritores que são completamente independentes ou ortogonais à matriz Y, e é chamada correção ortogonal de sinal (OSC, sigla do inglês). Este método de filtragem de dados quando aplicado a dados de RMN obtidos de biofluidos minimiza a influência de variações inter e intraespectrômetros durante a aquisição, bem como, a variação fisiológica inata (Beckwith-Hall *et al.*, 2002). A OSC tem sido integrada ao algoritmo do PLS a fim de otimizar os resultados (OPLS-DA). No método OPLS-DA, a variação da matriz X que não está correlacionada a matriz Y é removida. Assim, a complexidade da matriz é reduzida, ao mesmo tempo em que se preserva a capacidade de previsão e facilita a interpretação dos modelos desenvolvidos pelo método de PLS e seus gráficos resultantes (Trygg e Wold, 2002).

O método de PLS-DA também tem sido bastante utilizado na metabonômica. Já foi utilizado tanto em conjunto com análises por PCA como isoladamente, para discriminação entre grupos de amostra e para construção de modelos de previsão (Kirschenlohr *et al.*, 2006; Griffin, 2006; Maher *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2009; Nicholson e Lindon, 2008; Wang *et al.*, 2014). O uso do método de OPLS-DA também tem sido relatado em estudo metabonômico baseado em análises por RMN (Chen *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013)

#### 1.4.2.3 Experimentos STOCSY e RANSY

Novos métodos para auxiliarem na identificação de sinais de RMN em misturas complexas têm sido desenvolvidos, provendo uma nova abordagem na identificação de moléculas. Um destes métodos é a espectroscopia de correlação total estatística STOCSY (*Statistical Total Correlation Spectroscopy*). É baseado na multicolinearidade das intensidades das variáveis em um conjunto de espectros de RMN para gerar um pseudo espectro de RMN bidimensional que mostra a correlação entre as intensidades de vários sinais da amostra. O método não é limitado às usuais correlações apresentadas em um espectro de TOCSY. Informações adicionais são apresentadas pela avaliação de

coeficientes de correlação pequenos ou até mesmo negativos, já que leva a conexões entre duas ou mais moléculas envolvidas em uma mesma via metabólica (Nicholson *et al.*, 2007). Pode ser combinado a análises quimiométricas para auxiliar na identificação das moléculas responsáveis pela variação metabólica. Para entender melhor o comportamento do método para atribuição estrutural, realizou-se um estudo com espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos de urina de ratos saudáveis e ratos tratados com toxinas ou submetidos a estresse, analisando a distribuição estatística das correlações estruturais e não estruturais (Alves *et al.*, 2009). O método mostrou-se eficaz para caracterização estrutural sob diversas condições biológicas e tamanhos de amostra, desde que o grau de correlação resultante de associações não estruturais seja pequeno. Este estudo validou o uso da abordagem STOCSY na atribuição rotineira de sinais em estudos de perfis metabólicos de RMN e forneceu referências práticas com as quais os pesquisadores podem interpretar os resultados de uma análise STOCSY.

Também é possível realizar experimentos de STOCSY utilizando o conjunto de dados filtrados pela OSC quando análises de OPLS-DA tenham sido previamente realizadas, denominados experimentos de OSTOCSY. Esta ferramenta permite visualizar correlações entre os metabólitos na matriz filtrada em relação às informações não relacionadas a descrição dos grupos (Blaise *et al.*, 2011).

Considerando que na maioria das vezes há um grande número de correlações com valores altos, pode ser difícil encontrar as correlações que realmente são importantes nos gráficos de STOCSY sem se escolher um limiar empiricamente. Espectros claros para metabólitos individuais podem ser difíceis de serem obtidos. Visando obter resultados mais claros, um método alternativo foi proposto para detecção seletiva de sinais em espectros de RMN de uni e bidimensionais, denominado RANSY (*Ratio Analysis NMR Spectroscopy*). Este método envolve a análise das razões entre o sinal selecionado e os demais sinais no espectro. A média de cada razão é calculada através dos diversos espectros que compõe o conjunto de dados e é, então, dividida pelo desvio padrão da razão gerando um novo espectro em que as razões entre os sinais de uma mesma molécula são claramente vistos (Wei *et al.*, 2011). É baseado no fato de que a razão entre a intensidade ou da área de dois sinais de RMN de um mesmo metabólito será igual ao número relativo de spins magneticamente não equivalentes e, portanto, o desvio padrão desta razão será zero ou próximo disto (Wei *et al.*, 2011). Embora haja contribuição de ruído espectral, a contribuição do ruído é pequena resultando em um novo espectro gerado com boa relação sinal/ruído. Desta forma, o RANSY permite a identificação de substâncias mesmo em regiões com muita sobreposição sem a necessidade de experimentos adicionais. Pode também ser utilizado para simplificar

experimentos bidimensionais. O método dispensa a normalização por causa das características intrínsecas do cálculo das razões.

#### **1.4.2.4 Modelos de classificação**

Aplicações clínicas para diagnóstico e prognóstico de patologias exigem que os modelos desenvolvidos a partir de amostras com classificação conhecida sejam sensíveis o suficiente para classificar novas amostras em seus respectivos grupos. Com este objetivo, desenvolveu-se o método SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*), o qual é um método de classificação supervisionado baseado na PCA. Consiste em construir modelos a partir da PCA com as classes observadas, os quais são utilizados para atribuir a classe de amostras de origem desconhecidas. Isto é feito por meio da previsão dessas observações em cada classe do modelo da PCA cujos limites foram definidos pelo intervalo de confiança (Trygg e Lundstedt, 2007). Observações que não podem ser preditas no modelo com precisão, têm, portanto altos níveis de resíduos, e são classificadas como estando fora do modelo da PCA, ou seja, não pertencem a nenhuma das classes.

## 2 OBJETIVOS

Desenvolver estratégias metabonômicas através da RMN aliada a quimiometria para serem empregadas na investigação da ocorrência e progressão do acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) e identificar os principais biomarcadores.

### 2.1 *Objetivos específicos*

I - Coletar amostras de sangue de pacientes com diagnóstico de AVEi logo após a admissão no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e por um período de seis meses, e de um grupo de controle composto por indivíduos saudáveis, maiores de 18 anos de ambos os sexos;

II - Estabelecer o método de preparo de amostras, incluindo o estabelecimento de qual biofluido será utilizado, soro ou plasma;

III - Adquirir espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  das amostras de plasma e soro sanguíneo dos diversos grupos doentes e grupo sadio (controle);

IV – Identificar os sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  por meio de dados obtidos em experimentos bidimensionais, adição de padrões e comparação com dados da literatura;

V - Através de análises quimiométricas dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  discriminar as amostras de acordo com: a ocorrência ou não do AVEi, administração de tratamento trombolítico, etiologia da doença e prognóstico;

VI - Através de análise dos gráficos de *loadings* e análises estatísticas de significância, identificar os sinais responsáveis pelas discriminações (biomarcadores);

VII - Construir modelos de classificação e verificar se estes serão capazes de classificar corretamente novas amostras de acordo com os grupos descritos no parágrafo V;

VIII – Correlacionar os resultados das análises quimiométricas com a etiologia clínica e com o prognóstico dos pacientes com AVEi.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das amostras

Foram coletadas amostras de dois grupos. O primeiro grupo é constituído por pacientes maiores de 18 anos, de ambos os sexos e admitidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná com diagnóstico de AVEi, com início dos sintomas nas últimas 48 horas e sem história prévia de AVEi, num total de 73 pacientes. Estes pacientes foram submetidos à investigação etiológica conforme recomendado pela Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares (Raffin *et al.*, 2002 e 2006) incluindo estudo de tomografia de crânio, hemograma, perfil lipídico, glicemia, metabólicos, eletrocardiograma, ultra-sonografia cervical e intracraniana. Foram coletadas amostras de sangue periférico para análise de biomarcadores séricos nas primeiras 24 horas (Amostras A1 e A1t) e nos períodos de 7 dias (Amostras A7), 30 dias (Amostras A30), 90 dias (Amostras A90), e 180 dias (Amostras A180) após o AVEi para análise. Todos os pacientes foram seguidos ambulatorialmente com reavaliação clínica em 7 dias, 30 dias, 90 dias, 6 meses, 12 meses, 24 meses e 48 meses para análise prognóstica. Destes, 51 receberam tratamento trombolítico com ativador do plasminogênio tecidual (rt-PA) nas primeiras 24 horas porque apresentaram indicações clínicas e critérios de inclusão para este tipo de tratamento. O segundo grupo, grupo de controle, é formado por 18 indivíduos saudáveis, sem fatores de risco cardiovascular e sem história prévia de AVEi, selecionados entre os profissionais do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Dentro do possível, foram pareados por idade e sexo aos pacientes do grupo com AVEi. Foram coletadas amostras sanguíneas em um primeiro momento (Amostras C1) e após 90 (Amostras C90) e 180 dias (Amostras C180).

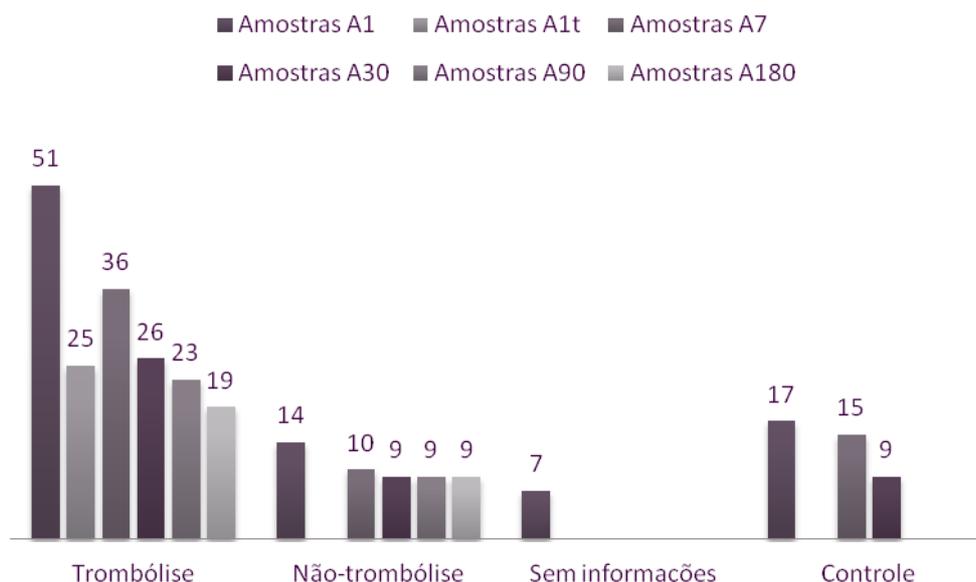
Esta coleta foi realizada por meio de punção venosa com técnica estéril em veia periférica de membro superior. Foram coletados 20 mL de sangue, os quais foram prontamente armazenados em tubos contendo anticoagulante EDTA e centrifugados a 1500 x g por 5 minutos. O plasma foi então transferido para tubos de polipropileno e armazenado inicialmente a aproximadamente -70 °C para análise subsequente pela espectroscopia de RMN. Outros 20 ml de sangue foram coletados, armazenados em tubos estéreis e centrifugados a 7000 x g por 10 minutos. O soro foi então congelado a -70 °C da mesma forma que o plasma.

Todo o procedimento de obtenção das amostras foi realizado com a colaboração dos médicos do Hospital de Clínicas da UFPR Dr. Marcos Christiano Lange e Felipe Trevisan Matos Novak. Devido a coleta e manipulação de amostras de pacientes, o projeto foi submetido a apreciação pelo comitê de ética em pesquisa com humanos do Hospital de Clínicas da UFPR e aprovado (Número do protocolo 1989.156/2009-07).

### 3.2 Perfil dos pacientes analisados

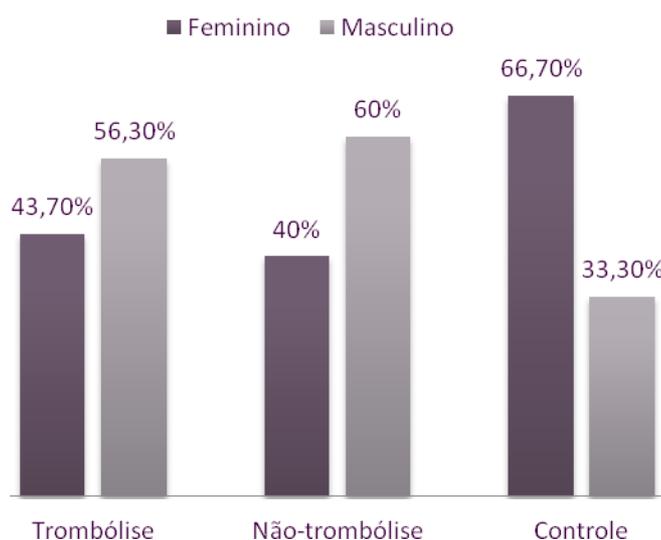
As análises das amostras de soro sanguíneo totalizaram 73 pacientes com AVEi e 18 pacientes de controle (sadios). Nos gráficos a seguir é apresentado um levantamento dos dados dos pacientes analisados e suas variáveis clínicas.

Os pacientes com AVEi foram divididos em dois grupos: (1) aqueles que receberam tratamento trombolítico, porque apresentaram indicações clínicas e critérios de inclusão para este tipo de tratamento, denominado grupo trombólise, e (2) os que não receberam tal tratamento, denominado grupo não-trombólise, sendo analisados 51 pacientes no primeiro grupo e 15 no segundo. Além destes, há sete pacientes dos quais não se tem informações, e três pacientes trombólise não tiveram registrados seus dados clínicos. Os pacientes dos quais não se têm informações foram em sua maioria encaminhados para a unidade de atendimento primário logo após a realização do exame de tomografia e não tiveram suas fichas adequadamente preenchidas. O número de amostras coletadas em cada grupo é mostrado no Gráfico 2. Observa-se que o número de amostras diminui com o tempo após o AVEi ou após a primeira coleta, tendo em vista que muitos pacientes não compareceram às consultas seguintes e não deixaram contato. No caso das amostras de controle, houveram vários pacientes que não quiseram dar continuidade à coleta das amostras, o que resultou em uma diminuição do número de amostras ao longo do tempo. Todas as amostras de soro foram analisadas, enquanto no caso das amostras de plasma foram analisadas apenas as amostras A1 e A1t dos pacientes que sofreram AVEi e todas as amostras de pacientes de controle, conforme será justificado mais adiante.



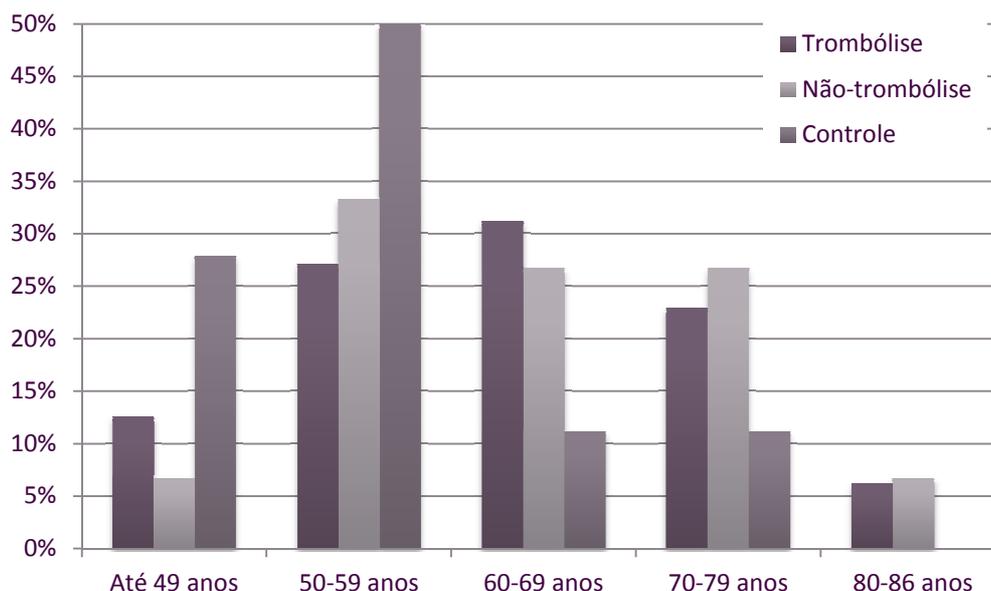
**Gráfico 2:** Quantidade de amostras correspondentes a cada período após o AVEi ou após a primeira coleta no caso do pacientes de controle.

Em uma visão geral do perfil dos pacientes dos quais se tem informações, observa-se no Gráfico 3 que a maioria dos pacientes que sofreram AVEi são do sexo masculino. Já para os pacientes de controle (sadios) a maioria é do sexo feminino, devido à dificuldade de encontrar pacientes entre 40 a 80 anos do sexo masculino que não apresentem fatores de risco similares aos pacientes que sofreram AVEi, tais como, hipertensão e dislipidemia. Embora estatísticas comprovem que mulheres têm maior risco de sofrerem AVE que homens (Saenger e Christenson, 2010), o quadro apresentado no período analisado mostrou o oposto.



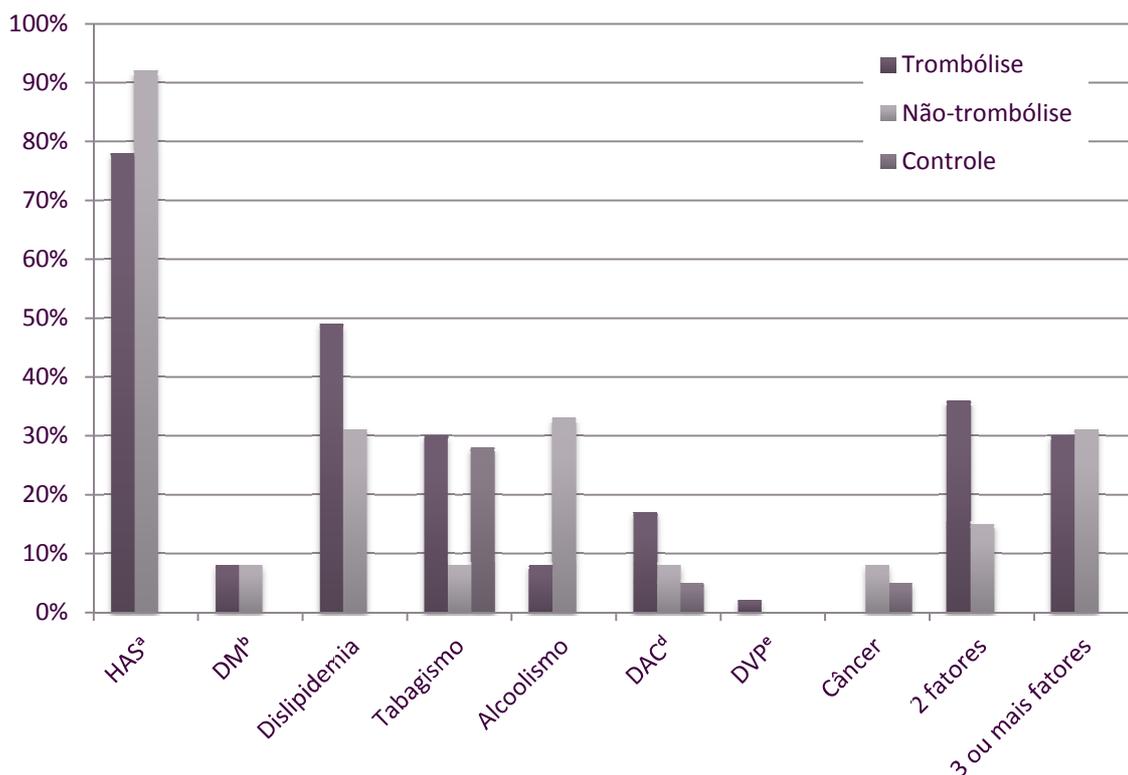
**Gráfico 3:** Distribuição dos pacientes segundo o sexo.

Com respeito a idade dos pacientes, observa-se no Gráfico 4 que os pacientes trombólise estão distribuídos em uma faixa de 37 a 86 anos, com maior incidência entre 60 a 69 anos, enquanto que os pacientes não-trombólise se concentram quase que uniformemente na faixa de 47 a 80 anos. Destaca-se que 58,7% dos pacientes cujos dados foram anotados, estão abaixo dos 65 anos, comprovando a informação de que o AVE não é mais uma doença que se restringe à população idosa, visto que fatores de risco de AVE estão presentes em grande parte da população (Saenger e Christenson, 2010). Os pacientes de controle ficaram entre 41 a 79 anos, tendo em vista a dificuldade de encontrar pacientes acima desta idade que não possuam fatores de risco ou doenças relacionadas ao AVEi.



**Gráfico 4:** Distribuição dos pacientes que sofreram AVEi de acordo com a faixa etária.

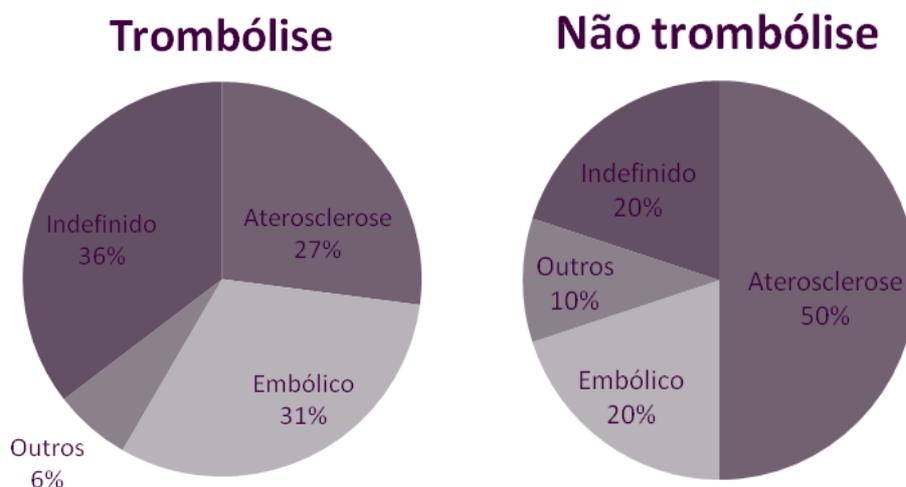
Os fatores de risco são apresentados no Gráfico 5. Nota-se que os fatores mais predominantes foram hipertensão arterial sistêmica (HAS) e dislipidemia, tanto no grupo trombólise como no não-trombólise, sendo que neste último o alcoolismo também se mostrou um fator importante. Isto concorda com outros estudos realizados na população brasileira, nos quais os mesmos fatores de risco mostraram-se predominantes (Almeida *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011). Nota-se uma incidência significativa de pacientes com mais de um fator de risco, sendo que tanto no grupo trombólise como não-trombólise cerca de 30% dos pacientes apresentaram três ou mais fatores de risco.



<sup>a</sup>HAS=hipertensão arterial sistêmica; <sup>b</sup>DM=diabetes melittus; <sup>d</sup>DAC=doença arterial coronariana (angina ou infarto cardíaco); <sup>e</sup>DVP=doença vascular periférica

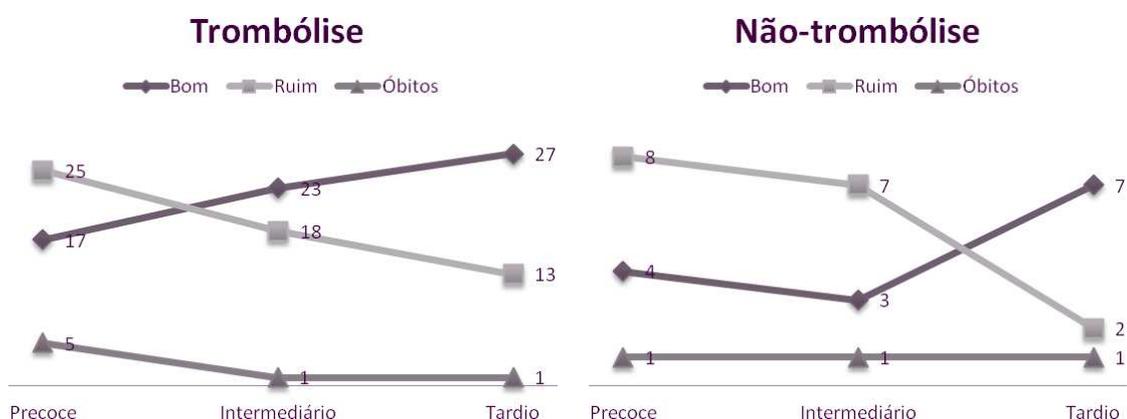
**Gráfico 5:** Incidência dos principais fatores de risco apresentados pelos pacientes que sofreram AVEi.

No que diz respeito à etiologia da doença, foi fornecido dados de 94% dos pacientes de trombólise e 67% dos pacientes de não-trombólise. Porém, dentre estes, 36% dos pacientes trombólise e 20% dos pacientes não-trombólise não tiveram a etiologia definida (Gráfico 6). Esta dificuldade de identificação da etiologia se dá por falta de dados de pacientes e por exames inconclusivos, o que apoia a necessidade de outros métodos que permitam identificar a etiologia, visto que isto é determinante para um tratamento eficaz. Dentre as etiologias identificadas, aterosclerose e cardioembólica foram as predominantes, como é apresentado no Gráfico 6. Estas informações se assemelham às encontradas por Almeida e colaboradores (2011) em um estudo com pacientes que sofreram AVE atendidos em um hospital público de Betim, Minas Gerais, Brasil.



**Gráfico 6:** Distribuição das etiologias identificadas para os pacientes com AVEi, de trombólise e não trombólise.

A avaliação prognóstica foi realizada por meio da escala de Rankin modificada, que varia entre 0 e 6, sendo que valores entre 0 e 2 representam pacientes sem sequelas ou aqueles com sequelas, porém que não limitam suas atividades de vida diária, portanto, pacientes de bom prognóstico. Valores acima de 2 representam pacientes com sequelas que limitam suas atividades até o óbito, portanto de pior prognóstico (Caneda *et al.*, 2006; Whiteley *et al.*, 2012). Esta avaliação foi realizada na fase precoce, logo após o AVEi, em três meses (período intermediário) e após seis meses (tardio). Tanto para pacientes trombólise como não-trombólise o prognóstico melhorou com o passar do tempo (Gráfico 7), no entanto no caso dos pacientes trombólise a melhora ocorreu mais rapidamente do que para os pacientes não-trombólise, provavelmente devido à ação do tratamento.



**Gráfico 7:** Gráfico mostrando o prognóstico dos pacientes trombólise e não trombólise avaliados clinicamente segundo escala de Rankin modificada: prognóstico bom (escala

de Rankin modificada de 0 a 2) e prognóstico ruim e óbitos (escala de Rankin modificada acima de 3 a 6).

Conforme mostra o Gráfico 7, ocorreram dez óbitos entre os pacientes, sendo sete entre os trombólise e três entre os não-trombólise. Porém analisando em porcentagem, os pacientes não-trombólise apresentaram uma maior porcentagem de óbitos, 20% contra 14,5% dos pacientes trombólise. Não foi possível obter os dados de etiologia dos paciente não-trombólise que sofreram óbito. Já dentre os pacientes trombólise, a maior concentração foi entre pacientes de etiologia embólico e indefinido, sendo apenas um de aterosclerose. Dentre os pacientes trombólise, 70% dos óbitos ocorreram ainda no estágio precoce. Cinquenta por cento dos óbitos foram na faixa de idade de 60 a 69 anos, sendo que houve um óbito abaixo de 50 anos e um acima dos 80. Comparando entre homens e mulheres, a incidência de óbitos foi bem similar, cerca de aproximadamente 16% dos homens e 15% das mulheres sofreram óbito. Os fatores de risco mais predominates entre estes pacientes foram HAS e dislipidemia, acompanhando a tendência geral dos pacientes.

### **3.3 Aquisição dos espectros de RMN de $^1\text{H}$**

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram adquiridos diretamente de todas as amostras de soro sanguíneo tanto de pacientes que sofreram AVEi como dos pacientes de controle, e das amostras de plasma sanguíneo referente às primeiras 24 horas após o AVEi e das amostras de pacientes de controle. As aquisições foram realizadas no espectrômetro de RMN Bruker AVANCE 400, operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de hidrogênio a 400,13 MHz, equipado com uma sonda multinuclear de observação direta de 5 mm com gradiente de campo no eixo z no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química. Para tanto, alíquotas de soro ou plasma sanguíneo de volumes 400  $\mu\text{L}$  foram coletadas com auxílio de uma micropipeta volumétrica e o volume completado para 600  $\mu\text{L}$  pela adição de uma solução de  $\text{D}_2\text{O}$  contendo  $\text{TMSP-}d_4$  em frasco tipo *ependorf*. As amostras foram centrifugadas em Microcentrífuga USA Scientific Modelo 100SD por 10 min a 2000 x g. Em seguida, 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos diretamente para tubos de RMN de 5 mm. As análises foram feitas em duplicata. Os experimentos foram realizados a 30 °C e o ajuste do campo magnético foi realizado com auxílio da ferramenta TOPSHIM disponibilizada no programa TOPSPIN. A frequência de ressonância do sinal da água foi ajustada manualmente utilizando espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *zgpr* para cada amostra antes de se obter os espectros com saturação do sinal da água.

Foram adquiridos dois espectros de RMN de  $^1\text{H}$  cada um com 64K pontos, 256 transientes e janela espectral de 9980,04 Hz (~25 ppm). Utilizaram-se duas sequências de pulsos com saturação do sinal da água: *noesypr1d* e *cpmgpr1d*, a primeira com tempo de relaxação de 2,0 s e tempo de mistura de 100 ms e a segunda com tempo de relaxação de 1,0 s e  $2\tau_n$  de 80 ms ( $\tau$  igual a 1,0 ms e  $n$  igual a 40). Foram dados 16 transientes antes da aquisição dos espectros com a sequência *cpmgpr1d* para atingir uma temperatura estável, visto que esta sequência pode causar aquecimento da amostra, prejudicando a qualidade do espectro. Os espectros foram processados no programa TOPSPIN com 64K pontos aplicando-se uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz. Os deslocamentos químicos foram calibrados pelo sinal da metila do ácido láctico em  $\delta$  1,34. O ajuste do campo magnético, ou *shimming*, foi realizado através da ferramenta chamada TOPSHIM do programa TOPSPIN Desta forma, obtêm-se espectros mais reprodutíveis no que diz respeito à largura a meia altura dos sinais, pois se elimina a variante operador para fazer o ajuste.

Foram adicionados a algumas amostras de soro, padrões de aminoácidos disponíveis, e que podem estar presentes nas amostras, para identificação dos sinais correspondentes. Foram estes: treonina, glutamina, metionina, ácido glutâmico, tirosina, fenilalanina, asparagina, cisteína, serina, isoleucina, ácido aspártico, histidina, arginina, valina, leucina, prolina, triptofano e lisina. Após adição novos espectros foram adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* com 64 transientes.

### **3.4 Aquisição de espectros de RMN de outros núcleos e experimentos bidimensionais**

Espectros de RMN de outros núcleos, tais como  $^{13}\text{C}$  e  $^{31}\text{P}$ , também foram obtidos. Estes espectros foram obtidos em um espectrômetro de RMN Bruker AVANCE 400, operando a 9,4 Tesla, observando os núcleos de fósforo e carbono a 161,98 e 100,61 MHz, respectivamente, utilizando a sequência de pulsos *zgpg30*, com pulso de  $30^\circ$ , 32K de pontos, 2K transientes para o núcleo de  $^{31}\text{P}$  e 120K para o núcleo de  $^{13}\text{C}$ , e tempo de relaxação entre os pulsos de 0,2 s.

Os experimentos NOESY 1D foram obtidos com sequência de pulso *selnogp*, usando tempo de mistura 300 ms e tempo de relaxação entre ciclos de pulsos sucessivos de 2,0 s. Os espectros foram adquiridos com a mesma largura espectral dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , com 64K pontos e número de transientes variando entre 2K, 4K e 5K, processados aplicando transformada de Fourier com 64K pontos e através de uma multiplicação exponencial do FIDs por um fator de 0,3 Hz.

Foram realizados alguns experimentos bidimensionais. O experimento *J* resolvido foi adquirido com a sequência de pulso *jresqf*, com 8K pontos com 32 aquisições por

incremento com janela espectral de 9980,04 Hz e 128 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão e completado com zeros para 2K antes da transformada de Fourier. O tempo de relaxação entre os pulsos foi de 2,0 s.

O experimento de RMN 2D de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  com filtro de duplo-quantum (DQF-COSY), foi realizado utilizando a sequência de pulsos *cosygpmfqf*. A aquisição foi feita com 4K de pontos com 64 transientes por incremento, janela espectral de 9980,04 Hz, e 256 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão, e completado com zeros para 2K antes da transformada de Fourier. O tempo de relaxação entre os ciclos de pulsos sucessivos foi de 1,5 s. Adicionalmente realizou-se um experimento DQF-COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  com a sequência de pulsos *cosydfesgpph*, a qual possui saturação do sinal da água não deuterada por meio de excitação esculpida usando pulso seletivo de  $180^\circ$  na frequência da água, possibilitando melhorar relação sinal/ruído. A aquisição foi feita de forma similar ao anterior, com 32 transientes por incremento, janela espectral de 8012,82 Hz, e 312 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão.

Os demais experimentos 2D, TOCSY, HSQC e HMBC, foram realizados no equipamento no mesmo equipamento já citado ou no espectrômetro Bruker AVANCE III 400, operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de hidrogênio a 400,13 MHz e carbono a 100,61 Hz, equipado com uma sonda multinuclear de observação inversa de 5 mm. O experimento de correlação total  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (TOCSY) foi coletado no modo sensível a fase usando *states time-proportional phase incrementation* (States-TPPI) e sequência de pulsos MLEV17 para a trava de spin. Fizeram-se dois experimentos, sendo que a aquisição foi feita com 2K pontos com 8 ou 16 transientes por incremento, janela espectral de 7812,5 Hz, e 400 ou 500 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão, e completado com zeros para 1K antes da transformada de Fourier. O tempo de mistura utilizado foi de 0,06 s em um dos experimentos e 0,15 s em outro e o tempo de relaxação entre os pulsos foi de 1,5 s. Outro experimento TOCSY foi similarmente adquirido com a sequência *mlevesgpph*, com saturação do sinal da água não deuterada por meio de excitação esculpida usando pulso seletivo de  $180^\circ$  na frequência da água e MLEV para trava de spins. A aquisição foi feita com 4K pontos 64 transientes por incremento, janela espectral de 8012,82 Hz, e 400 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão, e completado com zeros para 2K antes da transformada de Fourier. O tempo de mistura foi de 0,3 s e tempo de relaxação entre os pulsos foi de 1,5 s.

O experimento de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a ligação direta (HSQC) foi adquirido no modo sensível à fase usando seleção de gradiente *echo/antiecho-TPPI* e sequência de pulsos *hsqcetgpsi* com desacoplamento durante a aquisição. A aquisição foi feita com 4K pontos com 32 aquisições por incremento, janela espectral de 7812,5 Hz, e 312 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão, e completado com zeros para

1K antes da transformada de Fourier. O tempo de relaxação entre os pulsos foi de 1,0 s. O experimento HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  editado, no qual os sinais referentes a carbonos metilênicos aparecem em fase oposta a carbonos metílicos e metínicos, foi adquirido com os mesmos parâmetros do experimento de HSQC, porém com sequência de pulso *hsqcedetgp* e tempo de mistura de 0,06 s e tempo de relaxação entre os pulsos de 1,5 s. Ainda foi feito o experimento bidimensional HSQC-TOCSY, adquirido no espectrômetro de RMN Bruker AVANCE 400 com sonda de observação direta, no modo sensível à fase usando seleção de gradiente *echo/antiecho-TPPI* e com sequência de pulso *hsqcetgpmi* com desacoplamento durante a aquisição. A aquisição foi feita com 4K pontos com 128 aquisições por incremento, janela espectral de 7812,5 Hz, e 256 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão, e completado com zeros para 1K antes da transformada de Fourier. O tempo de relaxação entre os pulsos foi de 1,5 s.

O experimento de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (HMBC) foi adquirido com sequência de pulsos *hmbcgplpndqf*, otimizado para constantes a longa distância de 8 Hz, com filtro de  $^1J_{C,H}$  para eliminar acoplamentos a uma ligação, sem desacoplamento. A aquisição foi feita com 4K pontos com 64 aquisições por incremento, janela espectral de 7812,5 Hz, e 312 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão, e completado com zeros para 1K antes da transformada de Fourier. O tempo de relaxação entre os pulsos foi de 1,0 s.

Foram realizados diversos experimentos de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  a longa distância (HMBC). O experimento que apresentou melhor resultado, foi adquirido com sequência de pulsos *hmbcgplpndqf*, otimizado para constantes a longa distância de 10 Hz. A aquisição foi feita com 2K pontos com 30 aquisições por incremento, janela espectral de 4553,7 Hz, e 320 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão, e completado com zeros para 2K antes da transformada de Fourier. O tempo de relaxação entre os pulsos foi de 1,0 s. Este experimento foi realizado com uma amostra de controle após ser liofilizada e redissolvida em  $\text{CDCl}_3$ :MeOH 1:1.

### 3.5 Testes de estabilidade das amostras

Algumas amostras foram utilizadas para testes de estabilidade, incluindo tempo de estocagem, temperatura de estocagem e efeitos de sucessivos descongelamentos.

As amostras foram estocadas por diferentes períodos a aproximadamente  $-18^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  e  $30^\circ\text{C}$  e analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ , preparadas e adquiridas segundo procedimentos descritos em 3.3 para verificar alterações na composição química das mesmas. Procedimento semelhante foi realizado com outras amostras submetidas a descongelamentos subsequentes, sendo armazenadas após o primeiro descongelamento por até seis meses a aproximadamente  $-70^\circ\text{C}$ . Após períodos de 14, 28, 120, 180 e 360

dias as amostras foram descongeladas novamente e submetidas à análise por RMN de  $^1\text{H}$ .

### 3.6 Realização de análises quimiométricas

#### 3.6.1 Discriminação entre os grupos

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  adquiridos foram submetidos à análise quimiométrica pelos métodos de análise por componentes principais (PCA) e por análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com auxílio do programa computacional AMIX<sup>®</sup>, desenvolvido especialmente para realizar análises multivariadas de dados de RMN. A região do espectro utilizada variou segundo a análise realizada, para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com sequência *noesypr1d* foi utilizada região de  $\delta$  0,4 a 9,0 com exclusão da região do sinal da água e do lactato ( $\delta$  1,30 a 1,37 e  $\delta$  4,0 a 5,2). Para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com sequência *cpmgpr1d* foram realizadas duas análises, a primeira com a região de  $\delta$  0,4 a 4,0, com exclusão do sinal do lactato ( $\delta$  1,30 a 1,37), e a segunda com a região aromática  $\delta$  6,5 a 9,0. As regiões foram divididas em intervalos (*buckets*) de 0,01 ppm. No caso dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  foi utilizada a região de  $\delta$  0,5 a 5,5 ou  $\delta$  0,0 a 7,0 e *buckets* de 0,05 e 1,4 ppm, respectivamente. Os métodos de pré-processamento usados foram escalamento em relação ao maior *bucket*. O método de integração variou entre soma das intensidades absolutas e modo especial de integração, métodos providos pelo programa. As amostras foram discriminadas de acordo com a ocorrência ou não de AVEi, ocorrência ou não de trombólise, etiologia da doença e prognóstico.

Alguns conjuntos de dados também foram analisados no pacote *muma* do programa gratuito R. Para isto as tabelas de *buckets* foram recalculadas com escalamento em relação à intensidade total dos sinais, exportadas do programa AMIX e transformada para o formato .csv após ajustes no programa Excel, conforme orientado no Tutorial do programa (Gaude *et al.*, 2013). Foram realizadas análises de PCA, PLS-DA e PLS-DA ortogonal (OPLS-DA). Para tanto, testou-se em cada caso os cinco tipos de escalamento fornecidos pelo programa: *pareto*, *auto*, *vaste*, *range* e *medium*. Não se utilizou a opção de imputação e em alguns casos se optou por realizar a normalização.

#### 3.6.2 Análise estatística de significância

Para cada análise realizada no programa AMIX realizaram-se análises estatísticas de significância com os *buckets* apresentados no gráfico de *X-loadings*, após serem omitidos os *buckets* com uma porcentagem mínima de variância. Esta porcentagem foi determinada para cada análise conforme necessário a fim de eliminar *buckets* com

variância muito baixa e ruídos, além de *buckets* em regiões excluídas. Estas análises foram feitas por comparação entre os grupos envolvidos em cada caso, utilizando o *software* AMIX, conforme descrito por Goodpaster e colaboradores (2010) com a modificação de que ao invés de se realizar o teste de Mann-Whitney U a significância dos *loadings* foi calculada pela combinação dos testes de Kruskal-Wallis e de Kruskal-Wallis com teste-T. Para tanto foi utilizado um nível de confiança de 95%. Foi selecionado um valor crítico (valor  $\alpha$ ) de 0,05 para garantir um grau de falso positivo de não mais de 5% na determinação de quais metabólitos tiveram sua concentração alterada de forma significativa, com base no valor de  $p$  obtido. Foi aplicada a correção de Bonferroni, obtida pela divisão do valor  $\alpha$  pelo número de *buckets* utilizados, com o objetivo de manter o erro constante e corrigir interferências múltiplas simultâneas provindas de cada conjunto de dados (Watanabe *et al*, 2012).

Após a análise estatística de significância, o gráfico de *X-loadings* apresenta *buckets* coloridos conforme o valor- $p$  obtido para cada um deles. Os *buckets* com valor- $p$  maior que o valor- $p$  dado pelo intervalo de confiança corrigido de Bonferroni, considerados não significantes, são apresentados em preto. Por sua vez, os *buckets* com valor- $p$  menor que o valor- $p$  dado pelo intervalo de confiança corrigido de Bonferroni, considerados significantes, são apresentados em quatro cores em ordem decrescente de valor- $p$ : azul, verde, amarelo e vermelho.

No caso do programa *muma*, foram realizadas análises univariadas conforme proposto por Goodpaster e *col.* (Goodpaster *et al.*, 2010) que também resultam em se obter as variáveis significativas para cada análise.

### 3.6.3 Identificação dos biomarcadores

A identificação dos sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  responsáveis por cada discriminação obtida (biomarcadores) foi feita através da análise dos respectivos gráficos de influências (*loadings*). Estes dados foram comparados com a atribuição dos sinais previamente feita através de comparação com dados da literatura, experimentos bidimensionais de correlação homo e heteronuclear e adição de padrões. As ferramentas disponíveis no pacote R *muma* para auxiliar na identificação de sinais, STOCSY e RANSY, também foram utilizadas para confirmar algumas atribuições.

### 3.6.4 Construção de modelos de classificação

Os grupos de amostras de origem conhecida foram utilizados como modelos de classificação utilizando o método SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) com auxílio do programa computacional AMIX<sup>®</sup>. Estes modelos foram utilizados para avaliar a capacidade em se prever novas amostras para os conjuntos de dados formados

a partir dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  das amostras B de pacientes que sofreram ou não AVEi e amostras A de pacientes de controle. Os modelos também foram utilizados para auxiliar na avaliação das amostras de teste de estabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 *Análise das amostras de soro sanguíneo*

#### 4.1.1 **Padronização do método de preparo das amostras de soro sanguíneo**

Considerando que os espectros de RMN obtidos foram submetidos a análises quimiométricas, primeiramente se estabeleceu qual o melhor modo de preparo das amostras. Embora não haja protocolos estabelecidos, alguns estudos têm proposto procedimentos que auxiliam na preparação de amostras de biofluidos com o objetivo de obter o melhor espectro possível (Sheedy *et al.*, 2010; Smolinska *et al.*, 2012). Seguiu-se o procedimento mais simples possível, o qual não exige o uso de reagentes além de solventes deuterados e procedimentos que demandam muito tempo. Assim se assegura análises rápidas, reduz o gasto com reagentes e pode-se analisar o soro ou plasma como um todo.

Determinou-se que seriam usadas alíquotas de soro sanguíneo de 400  $\mu\text{L}$  e o volume completado para 600  $\mu\text{L}$  pela adição de uma solução de  $\text{D}_2\text{O}$  contendo  $\text{TMSP-}d_4$ , seguidos de centrifugação e transferência de alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  diretamente para tubos de RMN de 5 mm. Desta forma, se obtém amostras com boa concentração de soro e quantidade suficiente de solvente deuterado para ajuste do campo magnético e calibração do equipamento. A diluição do soro ou plasma é recomendada para reduzir a viscosidade da amostra e liberar metabólitos ligados a proteínas (Smolinska *et al.*, 2012).

Realizaram-se testes para determinar outros importantes parâmetros a serem utilizados no preparo das amostras de soro sanguíneo, sendo estes: número de replicatas de cada amostra, tempo de centrifugação da amostra antes da análise por RMN, liofilização do soro e concentração de  $\text{TMSP-}d_4$  utilizado como referência interna.

##### 4.1.1.1 **Número de replicatas**

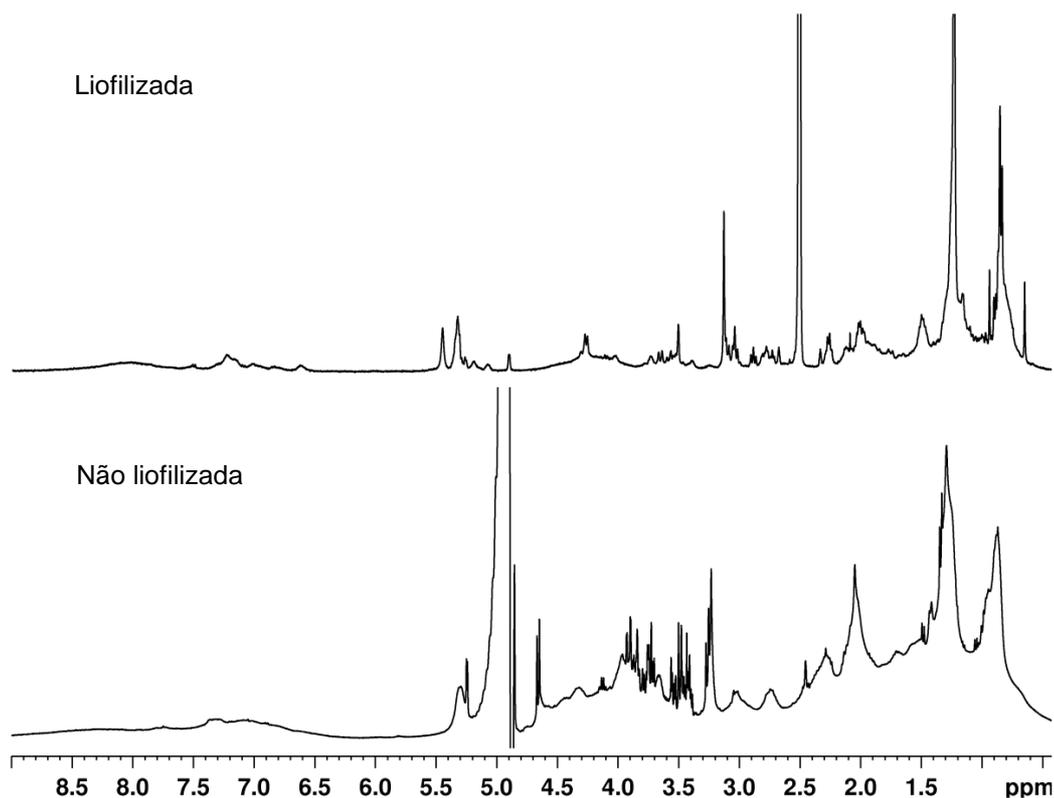
O volume de soro recebido para análise foi de inicialmente 2,0 mL, o que permitiria a análise do mesmo em até quintuplicata considerado que um volume de 400  $\mu\text{L}$  seria usado para cada amostra. Porém, reservou-se 1,0 mL para ser liofilizado com o objetivo de verificar se a análise da amostra liofilizada traria informações adicionais à análise do soro não liofilizado. Assim, a amostra utilizada para teste foi preparada em duplicata. Ao longo do trabalho o volume de soro recebido variou, portanto, estabeleceu-se a análise em duplicata sempre que possível.

#### **4.1.1.2 Tempo de centrifugação**

Para se determinar o tempo de centrifugação da amostra antes da transferência para o tubo de RMN, realizaram-se centrifugações por diferentes tempos e observou-se a formação ou não de depósito. Iniciou-se com centrifugação por cinco minutos a 2000 x g e não se observou formação de precipitado. Repetiu-se o procedimento por 10 minutos e então ocorreu formação de um pequeno precipitado em uma das duplicatas. Realizaram-se mais duas centrifugações, por 15 e 20 minutos, e em nenhum dos casos ocorreu aumento do material depositado. Fixou-se então o tempo de centrifugação como 10 minutos a fim de garantir que apenas o soro seria analisado, e para otimizar a homogeneidade do campo magnético.

#### **4.1.1.4 Liofilização**

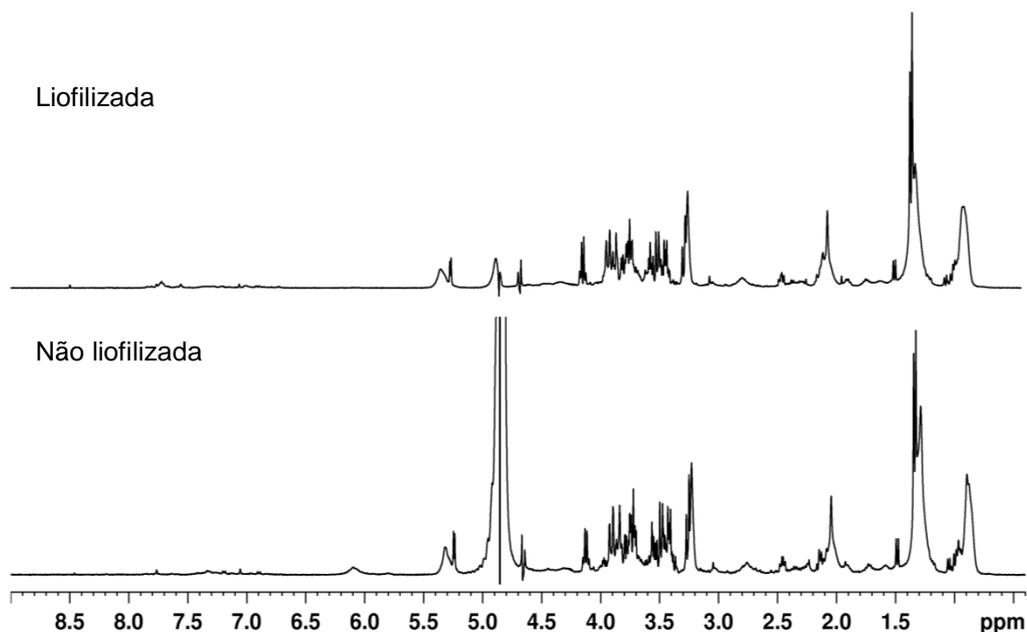
Alíquotas de 1,0 mL de três amostras de soro diferentes foram submetidas a procedimento de liofilização por 24 horas. A primeira amostra resultou em um cristal de cor amarelada na parte inferior e um material com aspecto espuma bege na parte superior. Adicionou-se 1,0 mL de dimetilssulfóxido (DMSO), porém foi obtido apenas uma solubilização parcial. A amostra foi então sonicada para aumentar a solubilidade, resultando em uma solução turva que foi filtrada em algodão com auxílio de uma pipeta Pasteur diretamente para um tubo de RMN de 5 mm e analisada. Percebeu-se que houve total mudança no perfil espectral quando comparado com o espectro da mesma amostra obtido sem liofilização (Figura 2).



**Figura 2:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* comparando a primeira amostra liofilizada (Amostra A1 do paciente 1) e a correspondente sem liofilização.

O material que restou no frasco foi seco e submetido a novos testes de solubilidade com clorofórmio, tetraidrofurano, água e piridina sem bons resultados para nenhum dos solventes.

A segunda amostra liofilizada apresentou apenas cristais cor de caramelo e não apresentou a parte semelhante à espuma como a amostra anterior. Esta também foi submetida a testes de solubilidade com os solventes DMSO, acetona, piridina e água e sonicadas por 10 minutos, apresentando solubilidade apenas em água. Esta foi então dissolvida em  $\text{D}_2\text{O}$ , sonicada por dez minutos e transferida para tubo de RMN para análise. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido com a sequência de pulso *cpmgpr1d* foi comparado com o espectro correspondente da amostra não liofilizada (Figura 3), mostrando que mesmo eliminando a maior parte dos sinais de macromoléculas não houve sinais adicionais no espectro referente a amostra liofilizada. O resultado foi completamente diferente do obtido na primeira amostra.



**Figura 3:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* comparando a segunda amostra liofilizada (Amostra A1 do paciente 2) e a correspondente sem liofilização.

Uma terceira amostra foi liofilizada e o resultado foi similar ao obtido com a segunda amostra, sendo o material solúvel apenas em água. Considerando que a amostra apresenta boa solubilidade apenas em água, que é o solvente original, além de não haver reprodutibilidade do resultado, de depender muito tempo e não acrescentar dados ao estudo, não se observou vantagem no procedimento de liofilização. Portanto, este procedimento foi descartado e apenas o preparo direto da amostra recebida foi adotado como procedimento padrão.

#### 4.1.1.5 Uso de TMSP- $d_4$

Iniciou-se as análises utilizando a concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de TMSP- $d_4$  em  $\text{D}_2\text{O}$ , porém o sinal correspondente ao TMSP- $d_4$  apresentava baixa intensidade não permitindo um bom ajuste de *shimming* e não poderia ser utilizado para uma possível análise quantitativa como referência interna. Preparou-se então uma solução teste com 0,5% m/v ( $2,9 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) de TMSP- $d_4$  em  $\text{D}_2\text{O}$  resultando em um sinal com intensidade suficiente para boa visualização.

Porém observou-se que a intensidade do sinal de TMSP não se manteve constante. Apenas após o início das análises, Ando e colaboradores (2010) relataram que o TMSP não deve ser utilizado como referência padrão para amostras de soro ou plasma sanguíneo, pois este é adsorvido à proteínas resultando em um sinal alargado e com intensidade reduzida. O grau de adsorção depende da composição de

macromoléculas, a qual varia de indivíduo para indivíduo (Jung *et al.*, 2011), justificando a variação na intensidade do sinal do TMS-P observada nos espectros. Portanto, a calibração dos espectros passou a ser feita pelo sinal da metila do ácido láctico em  $\delta$  1,34, presente nos espectros de todos pacientes.

#### 4.1.2 Testes de estabilidade das amostras de soro

Algumas amostras foram submetidas a testes de estabilidade para verificar por quanto tempo a amostra pode permanecer armazenada no tubo de RMN sem sofrer alterações em sua composição química, tendo em vista os longos tempos necessários para aquisição de experimentos bidimensionais e a possível constatação da necessidade de realizar outros experimentos com a amostra dias após a primeira análise. Além disso, foram realizados testes de estabilidade para verificar a estabilidade do soro frente a congelamentos e descongelamentos sucessivos.

A Tabela 3 traz os resultados obtidos pelas classificações feitas utilizando o método SIMCA. O método SIMCA classifica as amostras em um de quatro grupos: zero, um, dois e três, sendo no modelo, fora da elipsoide de confiança, significativamente fora do espaço do modelo e totalmente fora do modelo, respectivamente. Os modelos para classificação foram construídos com as amostras correspondentes às utilizadas para os testes de estabilidade analisadas logo após o primeiro congelamento conforme descrito na seção 3.4. Foi construído um modelo para cada grupo de espectros sendo o primeiro para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* e o segundo com a sequência *cpmgpr1d*. Para ambas foram considerados os espectros como um todo ( $\delta$  0,40 a 9,00) excluindo as regiões correspondentes ao lactato e da água ( $\delta$  1,30 a 1,37 e  $\delta$  4,00 a 5,20), similarmente aos parâmetros utilizados para as análises quimiométricas. Os *buckets* foram construídos pelo método retangular, utilizando o modo especial de integração e o escalamento em relação ao maior *bucket*. Foi considerada a variância mínima na construção de cada modelo para que se excluíssem os ruídos. Para cada modelo foi procedida a validação cruzada *leave-one-out* e nível de confiança usado foi de 99%. Não foram adquiridos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  para as amostras de testes de estabilidade visto que estes apresentaram baixa reprodutibilidade, devido à baixa relação sinal/ruído e variações nos deslocamento químicos dos sinais.

Iniciando a análise dos resultados obtidos pelos testes com as amostras já preparadas, 33 amostras foram mantidas a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ , sendo que algumas destas foram analisadas a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  por algumas horas e passaram o restante do tempo a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ . O período de armazenamento foi de até 49 dias. Nenhuma amostra foi classificada como estando totalmente fora do espaço do modelo. Apenas seis amostras foram classificadas no grupo 2, significativamente fora do espaço das componentes do modelo, para os

espectros adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* e três para os espectros adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d*, estes três que também foram classificados no grupo dois pelo modelo considerando a primeira sequência de pulso. Nota-se que das seis, quatro passaram pelo menos uma noite sendo analisadas a 30 °C. As outras duas que foram classificadas fora do modelo apresentaram sinais muito alargados. Outras cinco amostras foram armazenadas a 20 °C por um dia sem sofrerem alterações significativas, sendo que apenas uma foi classificada no grupo 2 para o experimento *noesypr1d*. No entanto, das cinco amostras armazenadas a 30 °C por um dia apenas duas foram classificadas no modelo. As outras três receberam classificação 1 ou 2, sendo que as duas que foram classificadas no grupo 2 pelo experimento *noesypr1d*, foram classificadas no modelo pelo experimento *cpmgpr1d*. Analisando os espectros das mesmas nota-se que de fato estas apresentaram muitas alterações nos sinais conforme mostra a Tabela 3. Portanto, os espectros adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* mostraram-se mais sensível a variações nos sinais do que os espectros adquiridos com a sequência *cpmgpr1d*. Isto deve ter ocorrido provavelmente devido às alterações terem ocorrido especialmente nos sinais de lipídeos, os quais são suprimidos nos espectros adquiridos com a sequência *cpmgpr1d*. As amostras mostraram em geral boa estabilidade até 20 °C sendo armazenadas por um dia, e até longos períodos (49 dias) a -18 °C.

Com respeito aos testes de congelamento e descongelamentos sucessivos, alíquotas de amostras mantidas a cerca de -70 °C foram coletadas após um primeiro descongelamento e o restante foi novamente congelado na mesma temperatura. Novas alíquotas foram obtidas após um segundo descongelamento depois de aproximadamente 1, 7, 14, 28, 120, 180 e 360 dias. Estas coletas foram realizadas em triplicatas. Analisando os resultados, observou-se que dentre as amostras que ficaram armazenadas por até 180 dias apenas uma amostra de 27 dias não foi classificada como fazendo parte do modelo. O espectro adquirido com a sequência de pulso *noesypr1d* da amostra 52B foi classificada no grupo 2, tendo apresentado variações na linha base e nas intensidade dos sinais dos lipídeos e do lactato, embora este último não tenha sido considerado no modelo. Já das quatro amostras que ficaram armazenadas por 360 dias, apenas uma foi classificada no modelo. Uma amostra foi classificada no grupo 1, fora da elipsoide de confiança, e as outras duas no grupo 2. Por comparação dos espectros destas amostras com os espectros obtidos na primeira análise, perceberam-se poucas alterações, que incluíram pequenas variações nos deslocamentos químicos e surgimento de pequenos sinais. Portanto, até seis meses após o primeiro descongelamento as amostras mostraram boa estabilidade dentro dos limites de sensibilidade da técnica, no entanto

após um ano passaram a sofrer maiores alterações não sendo mais classificadas dentro do modelo.

Teahan e colaboradores (2006) avaliaram possíveis desvios causados por procedimentos experimentais em amostras de soro e plasma humano analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ , incluindo efeitos de armazenamento de amostras recém preparadas e alterações causadas por congelamentos e descongelamentos sucessivos. Notou-se que as diferenças entre indivíduos foram maiores do que as causadas por qualquer dos fatores experimentais, embora cada uma das condições causasse pequenas alterações no perfil espectral que poderiam vir a causar desvios sistemáticos. Porém observou-se boa estabilidade das amostras preparadas a temperatura ambiente por até três horas, com alta reprodutibilidade dos espectros de RMN (variação menor que 1%), sendo que as lipoproteínas mostraram-se mais suscetíveis a variações. As diferenças causadas por ciclos de congelamento e descongelamento também foram mínimas. No entanto, destacou-se a possibilidade de que as moléculas afetadas possam ser os biomarcadores da doença em estudo, podendo resultar em uma discriminação entre os grupos apenas devido a artefatos. Desta forma, se recomendou que os ciclos de congelamento e descongelamento fossem mantidos ao mínimo possível. Estes resultados concordam com os obtidos no presente estudo, e reafirma-se a recomendação de evitar congelamentos e descongelamentos sucessivos. Além disso, as amostras já preparadas devem ser analisadas o mais breve possível, pois quanto maior a temperatura em que é mantida e o tempo transcorrido, maiores as alterações no perfil espectral, podendo resultar em artefatos nas análises quimiométricas.

**Tabela 3:** Resultados das classificações feitas pelo método SIMCA dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , adquiridos com as sequências *noesypr1d* e *cpmgpr1d*, das amostras de soro sanguíneo utilizadas para testes de estabilidade. Linha mais grossa divide as amostras de teste de estabilidade das amostras preparadas dos testes de congelamento e descongelamento sucessivos.

<b>Amostras</b>	<b>Período de armazenamento (dias)</b>	<b>Temperatura de armazenamento</b>	<b>Classificação (<i>noesypr1d</i>)<sup>1</sup></b>	<b>Classificação (<i>cpmgpr1d</i>)<sup>1</sup></b>	<b>Alterações (<i>noesypr1d</i>)</b>	<b>Alterações (<i>cpmgpr1d</i>)</b>
16D-1	1	-18 °C	0	0		
22D-1	1	-18 °C	0	0		
22Aa-2	1	-18 °C	0	0		
25B-1	1	-18 °C	0	0		
25D-2	1	-18 °C	0	0		
22C-1	1	-18 °C	0	0		
16Aa-1	1	-18 °C	0	0		
24B-2	1	-18 °C	0	0		
24A-2	1	-18 °C	0	0		
29Aa-2	1	-18 °C	0	0		
4Aa-1	1	-18 °C	0	0		
4Aa-2	1	-18 °C/30°C	0	0		
2Aa-1	3	-18 °C	0	0		
2Aa-2	3	-18 °C	0	0		
1B-1	5	-18 °C/30°C	2	0	Mudança no perfil dos sinais de lipídeos.	
1B-2	5	-18 °C/30°C	2	2	Mudança no perfil dos sinais de lipídeos.	Mudanças nos deslocamentos químicos e intensidade dos sinais.
6Aa-1	6	-18 °C	2	2	Pequenas alterações causadas pelo <i>shimming</i> .	Pequenas alterações causadas pelo <i>shimming</i> .
6Aa-2	6	-18 °C	0	0		
1Aa-1	7	-18 °C/30°C	2	0	$\delta$ 0,87 ↑; 2,24 ↑ <sup>2</sup>	
1Aa-2	7	-18 °C/30°C	0	0		
4Aa-1	7	-18 °C	0	0		
4Aa-2	7	-18 °C/30°C	0	0		
1C-1	8	-18 °C	0	0		
1C-2	8	-18 °C	0	0		
2B-1	8	-18 °C	0	0		
2B-2	8	-18 °C	2	2	Pequenas alterações causadas pelo <i>shimming</i> .	Pequenas alterações causadas pelo <i>shimming</i> .

2Aa-1	14	-18 °C	0	0		
2Aa-2	14	-18 °C	0	0		
1Aa-1	17	-18 °C/30°C	0	0		
1Aa-2	17	-18 °C/30°C	2	0	$\bar{\delta}$ 0,87 ↑; 2,24 ↑; 2,28 ↓	
1Aa-1	28	-18 °C/30°C	0	0		
1Aa-2	28	-18 °C/30°C	0	0		
8A	49	-18°C	0	0		
22C-2	1	20°C	0	0		
16Aa-2	1	20°C	0	0		
24B-1	1	20°C	0	0		
24A-1	1	20°C	0	0		
29Aa-1	1	20°C	2	0	Pequenas alterações causadas pelo <i>shimming</i> .	
16D-2	1	30°C	0	0		
22D-2	1	30°C	0	0		
22Aa-1	1	30°C	1	1	↑ $\bar{\delta}$ 2,38 e alterações nas regiões $\bar{\delta}$ 3,70-4,00, 7,60-8,23 e lipídios.	↑ $\bar{\delta}$ 2,38 e alterações nas regiões $\bar{\delta}$ 3,70-4,00, 7,60-8,23 e lipídios.
25B-2	1	30°C	2	0	Alterações nos sinais de lipídeos e aromáticos	
25D-1	1	30°C	2	0	Alterações nos sinais de lipídeos, na região de $\bar{\delta}$ 3,20-4,0.	
7B	1	-80°C	0	0		
10A	1	-80°C	0	0		
29C	7	-80°C	0	0		
29Aa	9	-80°C	0	0		
29B	9	-80°C	0	0		
6B-1	14	-80°C	0	0		
6B-2	14	-80°C	0	0		
52A	14	-80°C	0	0		
32D	14	-80°C	0	0		
30Aa	27	-80°C	0	0		
30B	27	-80°C	0	0		
52B	27	-80°C	2	0	Variações de deslocamento químico e linhas de base. ↑lactato ↓lipídeos.	
30D	120	-80°C	0	0		
30C	120	-80°C	0	0		

32A	120	-80°C	0	0		
31Aa	180	-80°C	0	0		
31B	180	-80°C	0	0		
31C	180	-80°C	0	0		
3D	360	-80°C	2	2	Variações de deslocamento químico. ↑lactato. Surgimento de sinal em $\delta$ 2,38.	Mesmas alterações.
15A	360	-80°C	1	1	Não se observou alterações.	Pequenas variações de deslocamento químico. Surgimento de sinal em $\delta$ 5,98 e $\delta$ 7,18-7,27.
20A	360	-80°C	0	0		
59A	360	-80°C	2	2	Não se observou alterações.	Pequenas variações de deslocamento químico. Surgimento de sinal em $\delta$ 5,98 e $\delta$ 7,18-7,27.

<sup>1</sup>Grupo 0: no modelo. Grupo 1: fora da elipsoide de confiança. Grupo 2: significativamente fora do espaço das componentes do modelo.

Grupo 3: totalmente fora do modelo.

<sup>2</sup>↑ indica que houve aumento e ↓ indica que houve diminuição na intensidade do sinal no espectro obtido após o segundo descongelamento em relação ao espectro obtido após o primeiro descongelamento.

### 4.1.3 Aquisição dos espectros de RMN das amostras de soro sanguíneo

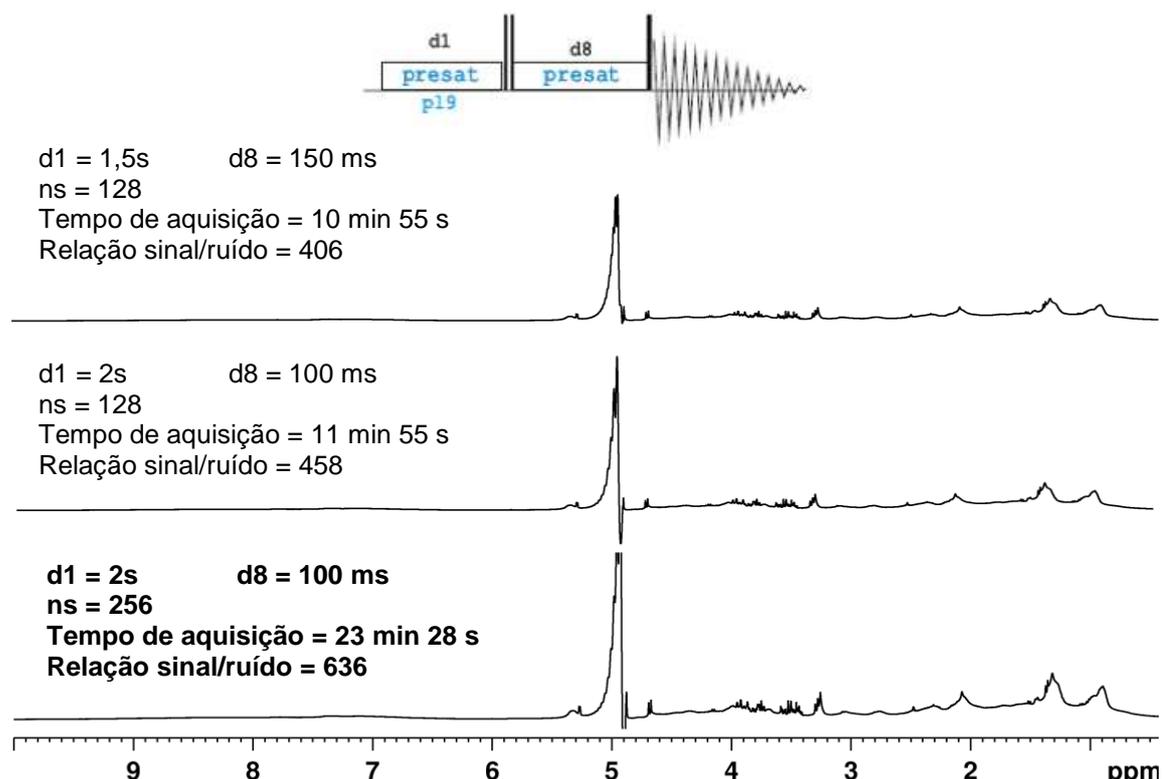
#### 4.1.3.1 Determinação das sequências de pulso utilizadas para aquisição dos espectros de RMN

##### 4.1.3.1.1 Determinação dos parâmetros para aquisição de espectros de RMN de $^1\text{H}$ com sequência de pulso *noesypr1d*

Visto a grande quantidade de água não deuterada presente no soro sanguíneo, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  apresentaram o sinal da água em  $\delta$  4,80 em grande intensidade. Desta forma, foi necessária a aquisição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com saturação do sinal da água, conforme explicado na seção 1.4.1.1.2. Para isto utilizou-se a sequência de pulso *noesypr1d*, a qual apresenta bons resultados para amostras de soro sanguíneo e já foi utilizada pelo nosso grupo em projetos anteriores, além de ser utilizada em diversos estudos com soro sanguíneo (Brindle *et al.*, 2002; Lundstedt *et al.*, 2010; Odunsi *et al.*, 2005; Solanky *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2001; Grandizoli *et al.*, 2013).

A sequência de pulso *noesypr1d* é compreendida por: RD-90°- $t_1$ -90°- $t_m$ -90°-FID, onde RD representa um tempo de relaxação ( $d_1$ ) variado entre 1,5 e 2,0 s durante o qual a frequência de ressonância da água é seletivamente irradiada,  $t_1$  representa o primeiro incremento em um experimento NOESY ( $d_8$ ) e corresponde a um intervalo fixo de 4,0  $\mu\text{s}$ ; e  $t_m$  é o tempo de mistura na sequência NOESY e seu valor foi variado entre 100 e 150  $\mu\text{s}$ , tempo em que a frequência de ressonância da água é mais uma vez seletivamente irradiada.

O melhor resultado para a condição em que os valores foram de 2,0 s para tempo de relaxação e 100 ms de tempo de mistura (Figura 4). Portanto, estas condições foram escolhidas como padrão para as análises. A partir disto, repetiu-se o experimento com 64, 128 e 256 transientes e avaliou-se qual resultado apresentaria a melhor relação sinal/ruído, sem gastar um tempo muito grande. Optou-se por usar 256 transientes, pois apresenta um ganho de aproximadamente 40% na relação sinal/ruído em relação ao espectro obtido com 128 transientes, compensando assim o maior tempo de aquisição.



**Figura 4:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  utilizando a sequência de pulsos *noesypr1d* para saturação de sinal da água com diferentes parâmetros. Todos os espectros estão em mesma escala de intensidade.

#### 4.1.3.1.2 Utilização da sequência de pulso CPMG para aquisição de espectros de RMN de $^1\text{H}$

Em seguida, os espectros foram adquiridos utilizando-se a sequência de pulso CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), a qual consiste em uma sequência de ecos de spin  $[90^\circ - (\tau - 180^\circ - \tau)_n - \text{FID}]$  (*cpmgpr1d*), variando os valores de tempo de relaxação,  $2\tau n$ , onde  $\tau$  (d20) representa os intervalos entre os pulsos de  $180^\circ$  e  $n$  (l4) o número de vezes em que a sequência é repetida.

Esta sequência permite eliminar sinais seletivamente com base em diferentes tempos de decaimento da relaxação transversal ou spin-spin ( $T_2$ ), pois após o pulso de  $90^\circ$  é permitido um tempo  $\tau$  para os núcleos relaxarem pelo mecanismo  $T_2$  no plano transversal. Quanto menor  $T_2$  maior a velocidade de decaimento do FID do sinal correspondente, pois mais rápido ocorrerá a perda da coerência de fase por relaxação transversal dos núcleos, o que resulta no desaparecimento dos sinais. Desta forma, moléculas com pequeno  $T_2$ , tais como a molécula de água e macromoléculas, perdem a coerência de fase mais rápido do que os sinais da amostra e, portanto, a coerência de fase não é refocada pelo pulso de  $180^\circ$  seguinte. Muitas vezes é necessário eliminar

estes sinais, visto serem muito largos e assim facilmente se sobreporem a sinais de moléculas de interesse. Isto se dá porque a largura do sinal de RMN é inversamente proporcional a  $T2^*$ , composto pela combinação da relaxação transversal provinda de duas principais fontes: da falta de homogeneidade do campo magnético e das interações inter e intramoleculares. Esta relação é dada por:

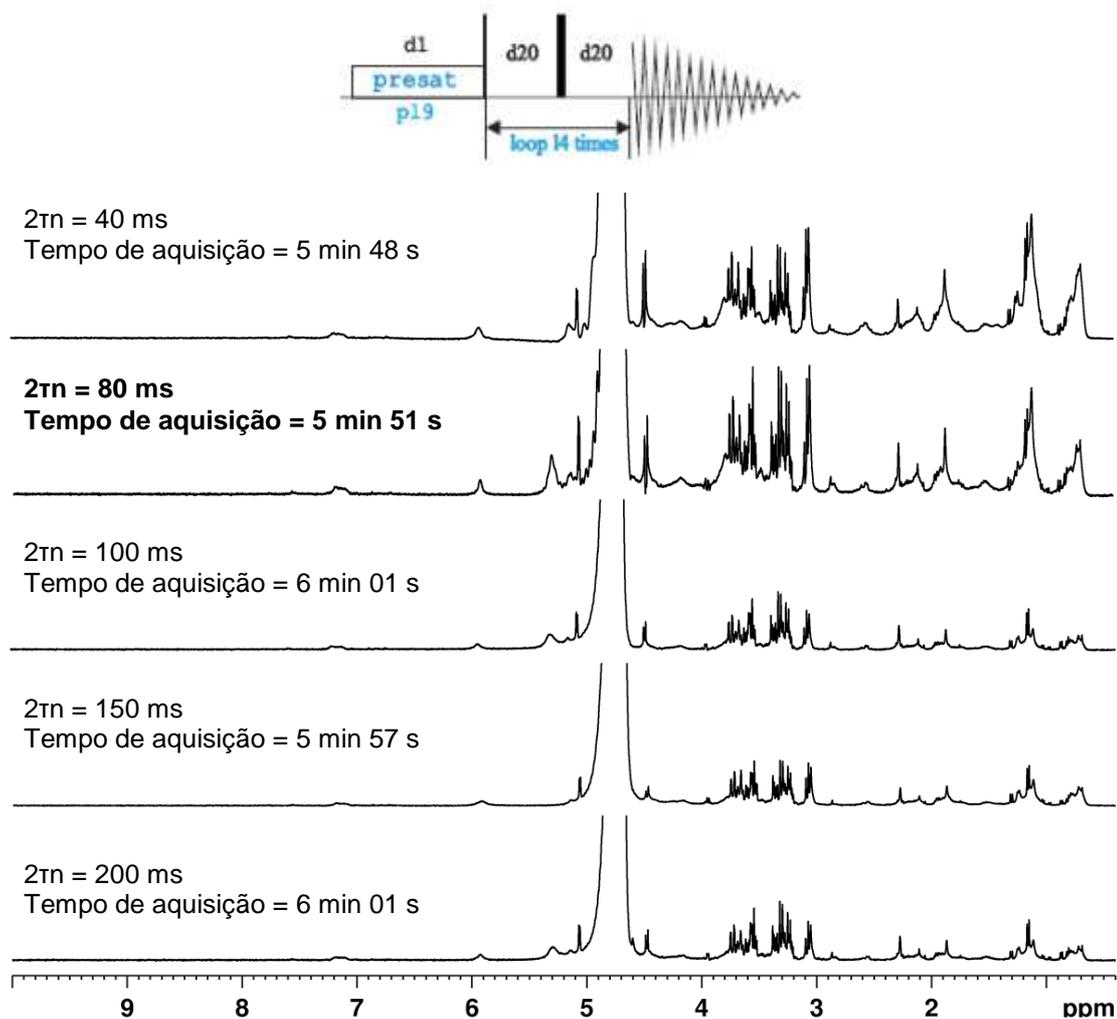
$$\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T2^*$$

Nesta equação,  $\Delta\nu_{1/2}$  corresponde à largura a meia-altura do sinal medida em Hertz. Portanto, um  $T2^*$  pequeno corresponde a uma perda mais rápida da coerência de fase da magnetização transversal, o que por sua vez corresponde a uma maior diferença nas frequências dos diferentes vetores e assim a uma maior dispersão do sinal, ou seja, a um sinal mais largo (Claridge, 2009; Rabenstein *et al.*, 1988).

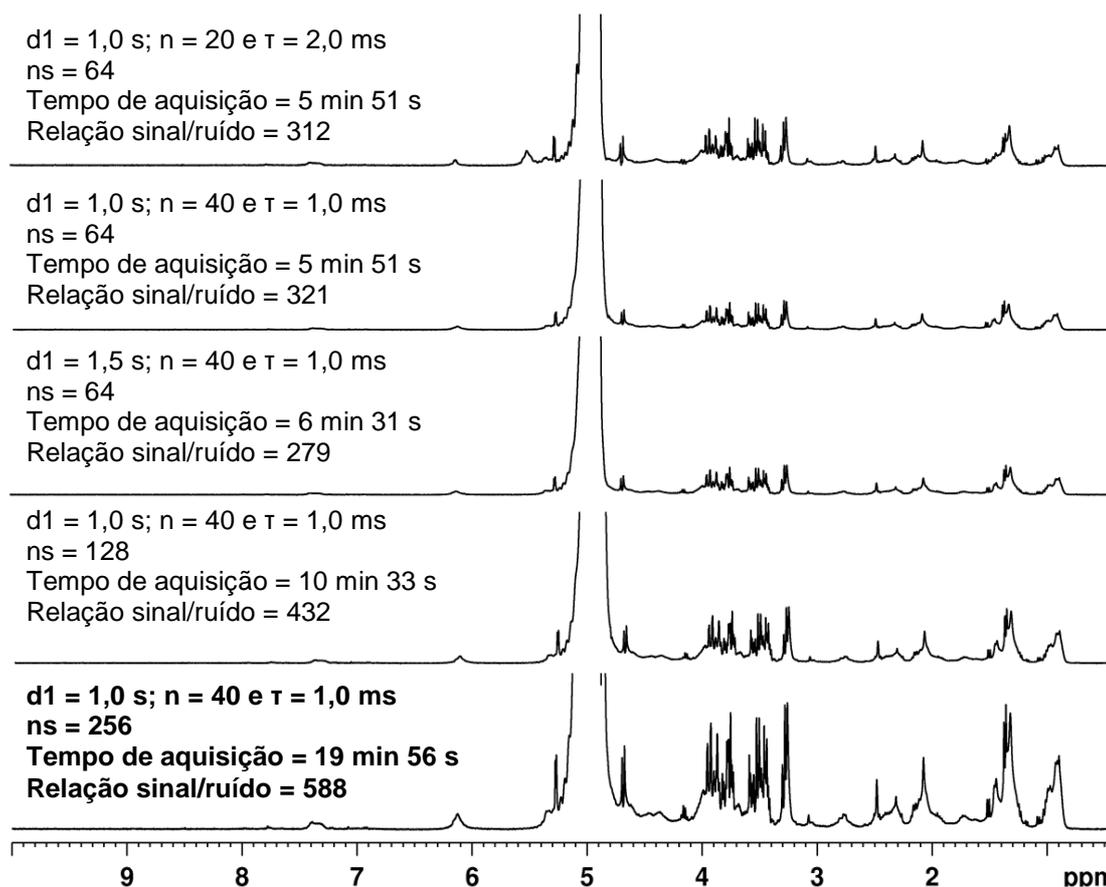
Após o tempo  $\tau$  é dado um pulso de  $180^\circ$  com o objetivo de refocar a magnetização transversal que foi defasada pela relaxação transversal. Porém se apenas um pulso de  $180^\circ$  for dado ocorrerá modulação da fase causada por acoplamento escalar homonuclear e o espectro resultante apresentará sinais positivos e negativos. Por isso, a sequência CPMG inclui múltiplos pulsos de  $180^\circ$  durante o período de relaxação  $T2$  com tempos entre os pulsos de  $180^\circ$  curtos em relação ao inverso da constante de acoplamento (Rabenstein *et al.*, 1988).

O sinal da água também é reduzido em intensidade pela relaxação  $T2$ , porém para ser completamente eliminado seria necessário um tempo maior que 1,3 s, o que faria com que sinais de outras substâncias de interesse fossem consideravelmente reduzidos em intensidade ou até fossem completamente eliminados (Rabenstein *et al.*, 1988). Por isso, é necessário utilizar outras técnicas para reduzir o intenso sinal da água. Neste caso, foi introduzida nesta sequência a saturação do sinal da água durante o tempo de relaxação através de irradiação seletiva na frequência de ressonância da água, e assim pode-se usar um tempo de relaxação suficiente para eliminar apenas os sinais desejados. Outra alternativa seria a adição de íons paramagnéticos ou reagentes de troca à amostra, tais como cloreto de amônio (Rabenstein *et al.*, 1988).

Variou-se o tempo de relaxação ( $2\tau n$ ) de 40 ms a 200 ms (Figura 5), obtendo-se como melhor resultado o tempo de 80 ms, em que houve boa eliminação do sinal da água e de sinais de macromoléculas sem ocorrer eliminação de sinais de metabólitos de baixo peso molecular. Tendo-se determinado este parâmetro, variaram-se os valores de  $\tau$ ,  $n$  e  $d1$ , além da quantidade de transientes a ser utilizada para a melhor condição. As condições utilizadas estão descritas na Figura 6 junto com os respectivos espectros de RMN de  $^1H$ . O melhor resultado, com o menor tempo possível obtendo-se uma boa relação sinal/ruído foi obtido utilizando  $\tau$  de 1,0 ms,  $n$  de 40, tempo de relaxação ( $d1$ ) de 1,0 s e 256 transientes, e este experimento foi adotado nas análises subsequentes.



**Figura 5:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com a sequência de pulso *cpmgpr1d*, variando os valores de tempo de relaxação ( $2\tau_n$ ). Todos os espectros foram adquiridos com  $d1$  de 1,0 s e  $ns$  igual a 64.



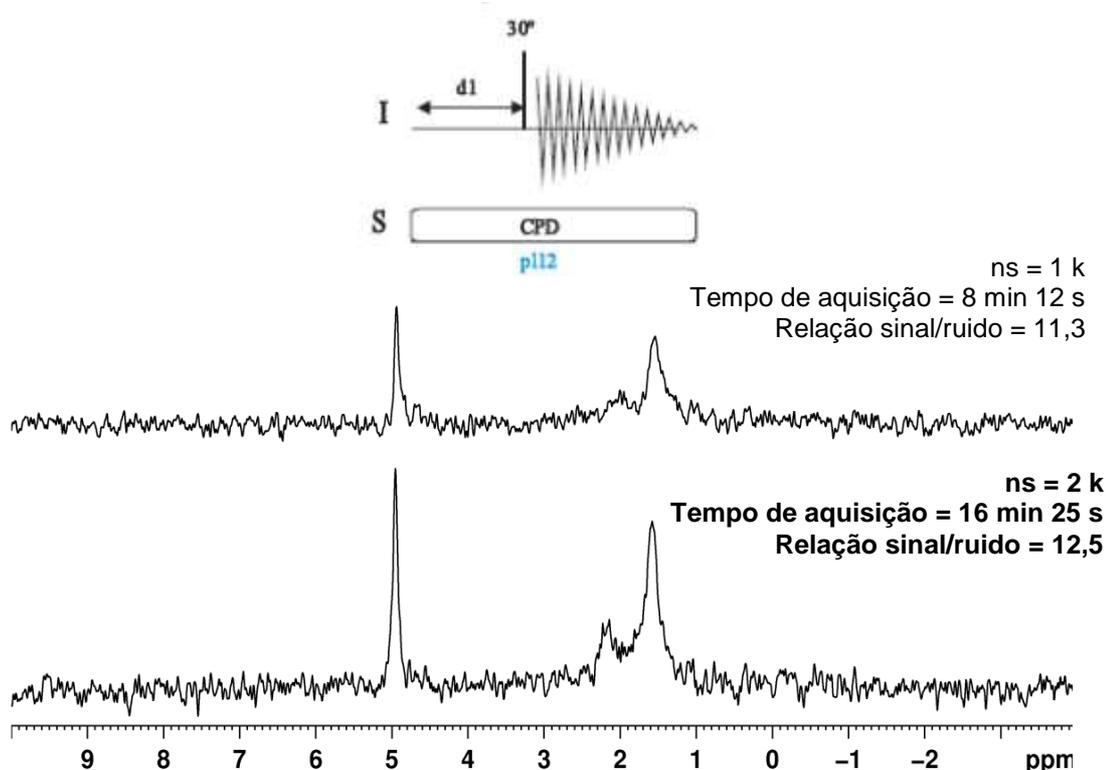
**Figura 6:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* com tempo de relaxação ( $2\tau_n$ ) de 80 ms variando os parâmetros utilizados.

#### 4.1.3.1.3 Análise de outros núcleos além de $^1\text{H}$

Avaliou-se a possibilidade de incluir a análise de outros núcleos como análise padrão das amostras. Um núcleo de grande interesse é o carbono, porém como apenas o carbono 13 é detectável por RMN, cuja abundância natural é de apenas 1% e receptividade em relação ao  $^1\text{H}$  de apenas 0,016, é necessário um tempo muito longo para se obter um espectro com boa relação sinal/ruído. Por exemplo, para se ter um espectro com relação sinal/ruído de aproximadamente 20 na região alifática (15-45 ppm) se necessitou de aproximadamente 16 horas de aquisição.

Outro núcleo de interesse para amostras biológicas é o fósforo, presente em metabólitos relacionados com o metabolismo energético, tais como, adenosinas fosfatadas, uridinas fosfatadas e metabólitos fosforilados, como fosfocolina, fosfoserina, fosfocreatinina, açúcares fosforilados, dentre outros. Este núcleo também apresenta a vantagem de possuir spin  $\frac{1}{2}$ , 100% de abundância natural e receptividade natural em relação ao  $^{13}\text{C}$  de 391, sendo possível obter um espectro com boa relação sinal/ruído rapidamente. Utilizando-se a sequência de pulsos *zgpg30* com desacoplamento de  $^1\text{H}$  e 0,2 s de tempo de relaxação, testou-se qual o melhor número de transientes para se

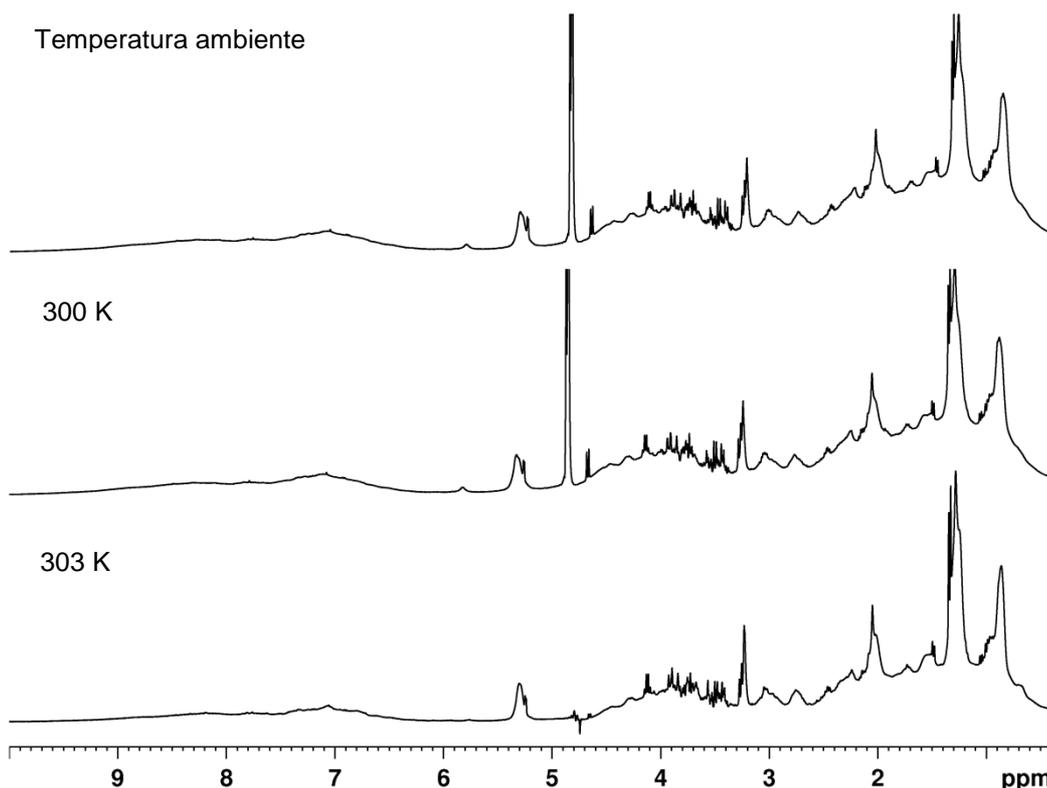
obter uma boa relação sinal/ruído sem necessitar de um tempo muito longo para aquisição. Optou-se por utilizar 2k transientes por resultar em melhor visualização dos sinais (Figura 7), e o experimento passou a ser feito com estas condições.



**Figura 7:** Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  obtidos com a sequência de pulso *zgpg30* variando o número de transientes utilizado.

#### 4.1.3.2 Temperatura de análise

Análises a temperatura ambiente podem apresentar variações nos deslocamentos químicos dos sinais devido a mudanças na temperatura. Portanto, testaram-se temperaturas que estivessem acima da temperatura ambiente, para que o sistema conseguisse manter a temperatura estável. Foram testadas as temperaturas de 300 K e 303 K, e observou-se que a 303 K o sinal correspondente a água em  $\delta$  4,80 sofre mudanças no deslocamento químico com a mudança de temperatura, se sobrepondo ao duplete em  $\delta$  4,66 (Figura 8). Porém independentemente do sinal em  $\delta$  4,66 estar ou não sobreposto, o mesmo não pode ser utilizado nas análises quimiométricas nem para quantificação por causa dos decorrentes efeitos da saturação do sinal da água em  $\delta$  4,80, causando alterações no deslocamento químico e intensidade dos sinais vizinhos. Considerando que a 303 K a estabilização da temperatura se torna mais fácil, pois é mais distante da temperatura ambiente, esta temperatura foi escolhida para as análises.

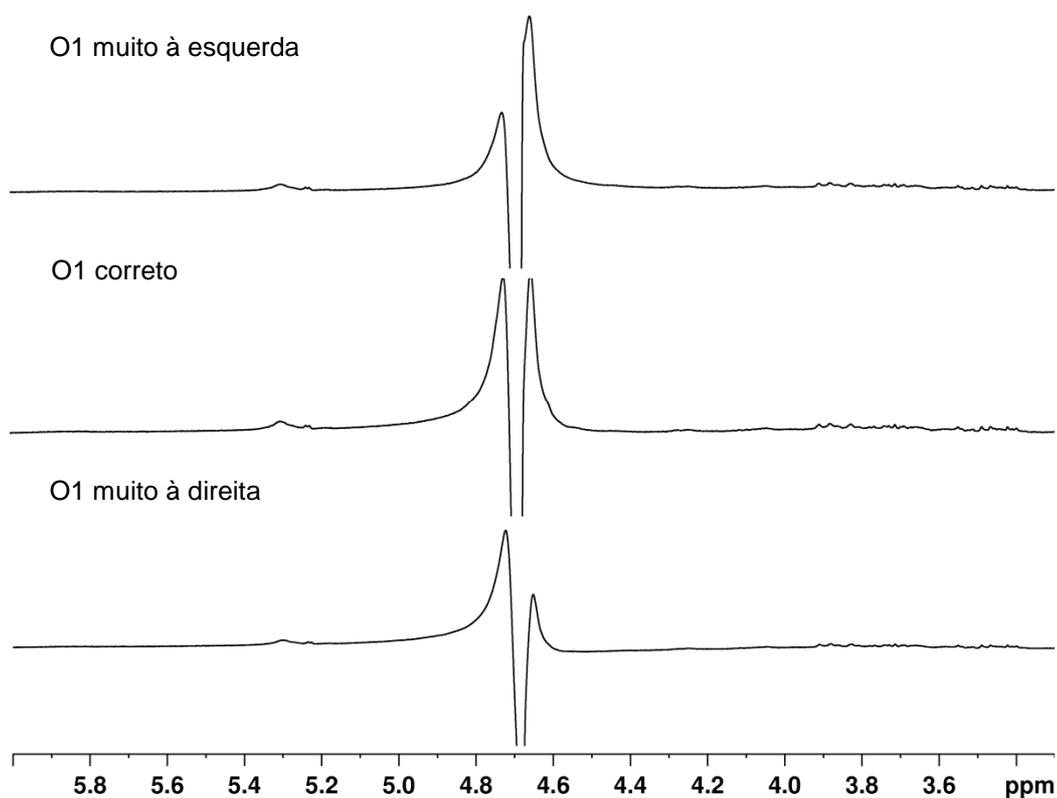


**Figura 8:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com a sequência de pulso *noesypr1d* em diferentes temperaturas.

#### 4.1.3.3 Ajuste da frequência de ressonância da água para otimização da saturação do sinal

Para se obter uma boa saturação do sinal da água é importante que a frequência de ressonância esteja bem ajustada no centro do sinal. A saturação será feita por pulsos de baixa potência por longos períodos, geralmente durante o tempo de relaxação na faixa de 1,0 a 2,0 segundos e no tempo de mistura no caso da sequência de pulso *noesypr1d* de 100 ms. Este ajuste também ajudará a diminuir os efeitos da saturação nos sinais vizinhos. Isto se dá porque o pulso de radiofrequência aplicado para pré-saturação é centrado na frequência da água e abrange uma faixa de frequências suficientemente estreita, de forma que os sinais vizinhos não sejam saturados. Embora o sinal da água abranja uma faixa de frequências de ressonância muito mais larga que o pulso de pré-saturação aplicado, o sinal como um todo é saturado. Isto ocorre como resultado da transferência de saturação por troca química e relaxação cruzada entre os átomos de hidrogênio com ressonância na faixa de frequências do pulso de pré-saturação que está sendo aplicado e hidrogênios cujas frequências de ressonância estão na faixa englobada pelo sinal da água, porém fora da faixa do pulso aplicado. O resultado é a supressão do sinal da água como um todo, porém de forma seletiva, sem suprimir sinais vizinhos (Rabenstein *et al.*, 1988).

Uma das formas propostas para este ajuste é bastante simples, bastando simplesmente visualizar o sinal obtido para saturação. Para isto adquiriram-se espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com a sequência de pulso *zgpr*, a sequência mais simples para saturação se sinais em que o sinal desejado é seletivamente irradiado na sua respectiva frequência de ressonância durante o tempo de relaxação no mesmo canal que se obtém o sinal. A frequência de ressonância da água é ajustada manualmente e o espectro é adquirido com apenas um transiente. Dependendo da forma que o sinal se apresenta, ajusta-se o valor para da frequência (O1) para o lado correto, como é ilustrado na Figura 9. Este procedimento foi adotado para todas as amostras antes de se adquirir os espectros com saturação do sinal da água.

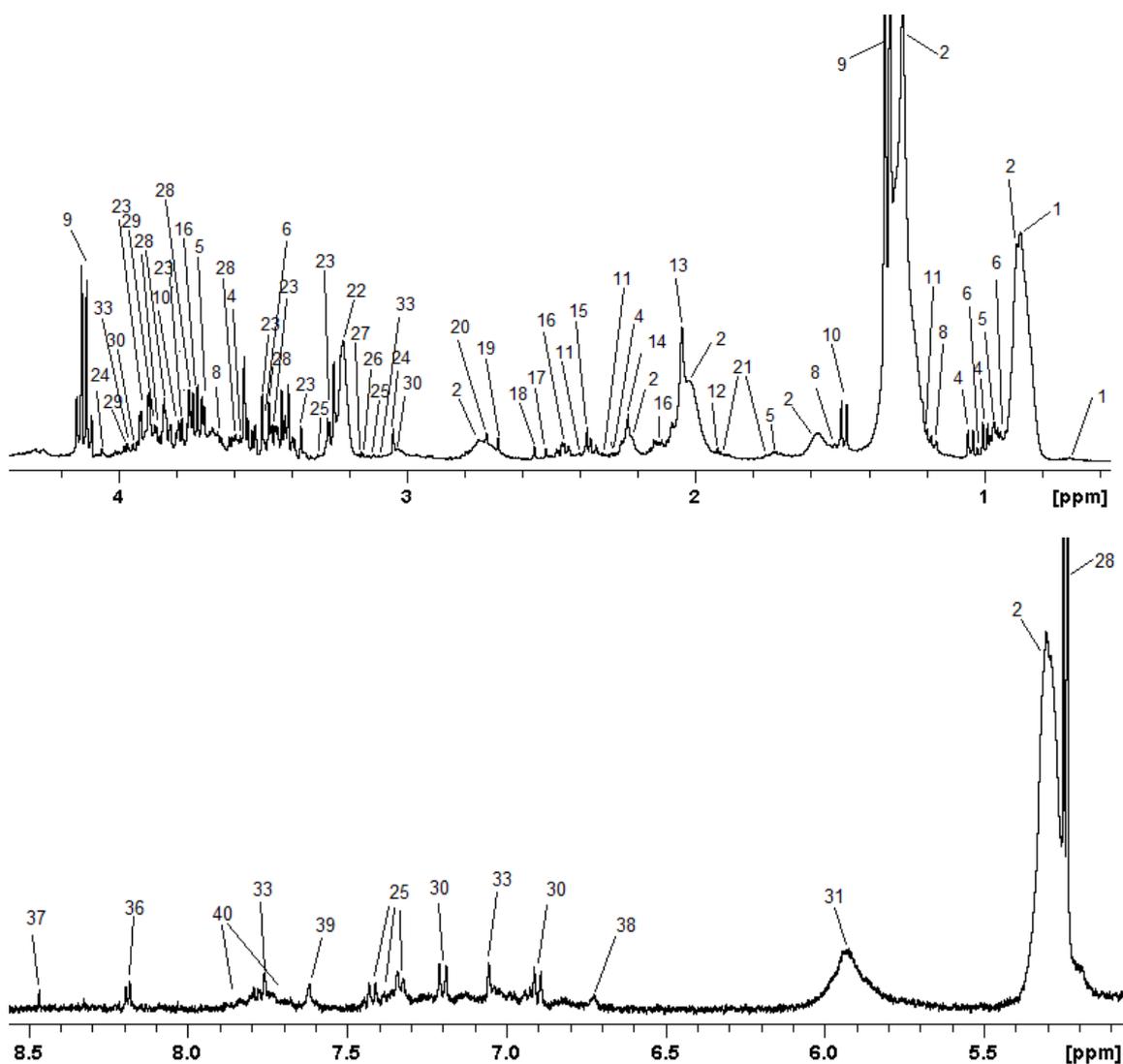


**Figura 9:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com a sequência *zgpr* para ajuste de frequência de ressonância de pré-saturação do sinal da água.

#### 4.1.4 Atribuição dos sinais dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{31}\text{P}$ das amostras de soro sanguíneo

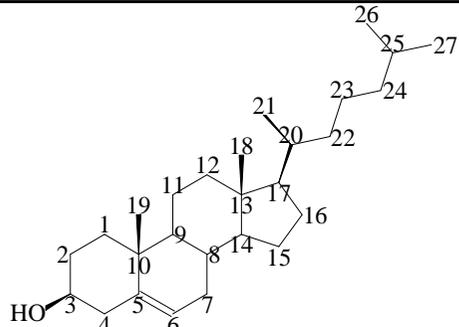
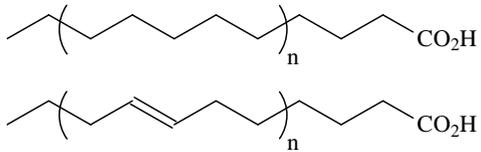
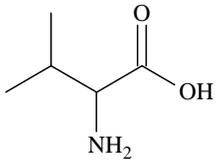
Os sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram atribuídos com o auxílio de dados da literatura (Nicholson e Foxall, 1995; Fan e Lane, 2008; Wishart, 2013), além de adição de padrões no caso de aminoácidos e experimentos bidimensionais, incluindo experimentos de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , TOCSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , HSQC-TOCSY e *J*-Res, além das ferramentas STOCSY e RANSY. As atribuições realizadas estão apresentadas

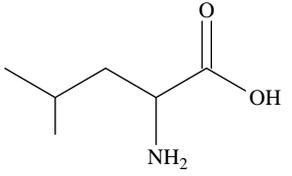
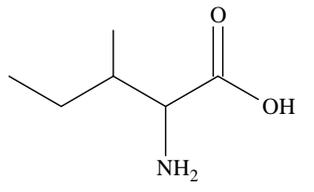
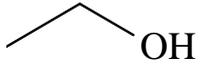
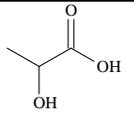
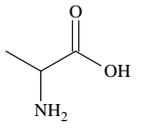
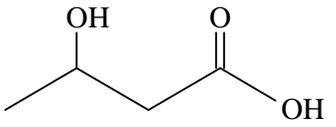
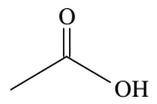
na Figura 10 e na Tabela 4. Alguns sinais foram encontrados apenas em um ou mais espectros e estão apresentados na Tabela 4 em *itálico*. Alguns sinais ainda não puderam ser atribuídos.

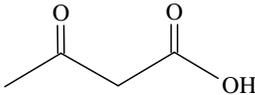
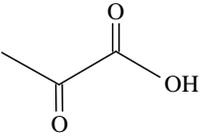
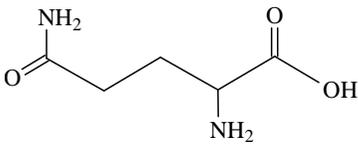
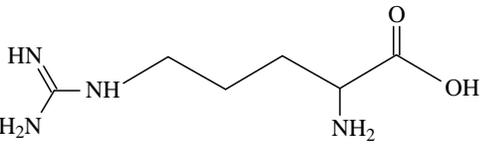
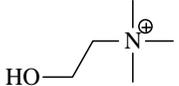


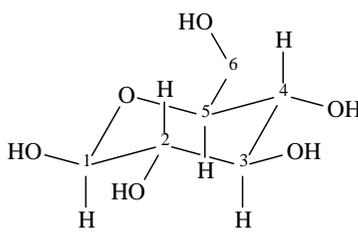
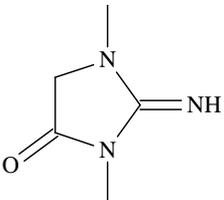
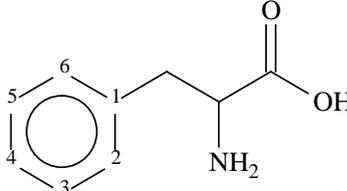
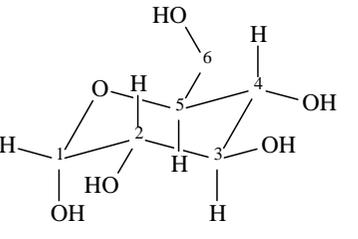
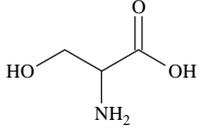
**Figura 10:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra A1 do paciente 13 adquirido com sequência de pulso *cpmgrp1d* com atribuições segundo numeração seguida pela Tabela 1. Acima região de 0,5 a 4,5 ppm e abaixo de 5,1 a 8,6 ppm.

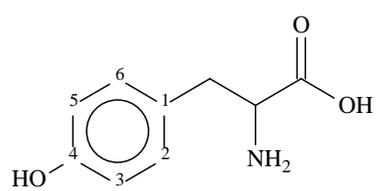
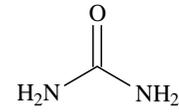
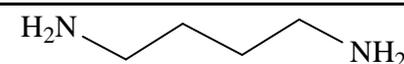
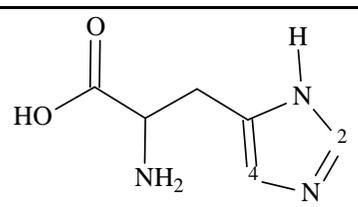
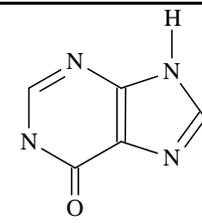
**Tabela 4:** Atribuição dos sinais dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de amostras de soro sanguíneo de pacientes com AVEi e controle. Metabólitos em itálico foram encontrados em espectros de alguns pacientes, enquanto os demais foram encontrados em todos os espectros adquiridos.

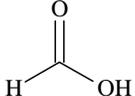
Número do composto	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicidade*	Molécula	Posição correspondente	δ <sup>13</sup> C (ppm)	Estrutura
1	0,70	s	Colesterol	H18		
	0,86	s		H26 e H27	22,4	
2	0,87	t	Lípidios	CH <sub>3</sub> (principalmente LDL e VLDL)	14,6	
	1,26	m		CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	32,4	
	1,28	m		(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> (principalmente VLDL)	30,2	
	1,28	m		CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	23,5	
	1,57	m		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO- (principalmente VLDL)	25,3	
	2,02	m		CH <sub>2</sub> C=C	28,0	
	2,23	m		CH <sub>2</sub> CO	34,3	
	2,74	m		C=CCH <sub>2</sub> C=C	26,3	
	5,30	m		CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH-; =CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	128,8; 130,4	
3	1,28	<i>m</i>	<i>Não identificado</i>		13,7	
4	0,99	d (6,9 Hz)	Valina	CH <sub>3</sub>	18,9	
	1,04	d (6,9 Hz)		CH <sub>3</sub>		
	2,28	m		β-CH		
	3,61	d (4,1 Hz)		α-CH		

5	0,97	d	Leucina	$(CH_3)_2-CH$	18,8	
	1,72	m		$\beta-CH_2$ e $\gamma-CH$	27,1; 40,1	
	3,73	t		$\alpha-CH$		
6	0,94	t (7,3 Hz)	Isoleucina	$\delta-CH_3$		
	1,01	d (7,3 Hz)		$\beta-CH_3$		
	1,26	m		$\gamma-CH_2$ a		
	1,48	m		$\gamma-CH_2$ b		
	2,00	m		$\beta-CH$		
	3,66	d (4,0 Hz)		$\alpha-CH$		
7	1,19	d (7,1 Hz)	Etanol	$CH_3$		
	3,66	q (7,1 Hz)		$CH_2$		
8	1,17	d (6,5 Hz)	Não identificado			
	1,53	m				
	3,62	m				
9	1,34	d (6,9 Hz)	Lactato	$CH_3$	20,9	
	4,12	q (6,9 Hz)		CH	69,4	
10	1,48	d (7,3 Hz)	Alanina	$CH_3$		
	3,79	q (7,3 Hz)		CH		
11	1,20	d (6,2 Hz)	3-Hidroxibutirato	$CH_3$		
	2,31	dd (14,4; 6,2 Hz)		$CH_2$ a		
	2,42	dd (14,4; 7,4 Hz)		$CH_2$ b		
	4,12	m		CH		
12	1,92	s	Acetato	$CH_3$		

13	2,04	s	Glicoproteína	CH <sub>3</sub> (grupos acetil)	23,0	
14	2,22	s	Acetoacetato	CH <sub>3</sub>		
15	2,38	s	Piruvato	CH <sub>3</sub>		
16	2,13	m	Glutamina	β-CH <sub>2</sub>	33,8	
	2,46	m		γ-CH <sub>2</sub>		
	3,76	t (6,2 Hz)		α-CH		
17	2,52	s	<i>Não identificado</i>			
18	2,56	s	Metilamina			H <sub>3</sub> C-NH <sub>2</sub>
19	2,68	s	<i>Não identificado</i>			
20	2,72	s	Dimetilamina			H <sub>3</sub> C-NH-CH <sub>3</sub>
21	1,71	m	Arginina	γ-CH <sub>2</sub>	41,4	
	1,91	m		β-CH <sub>2</sub>		
	3,22	m		δ-CH <sub>2</sub>		
	3,76	m		α-CH		
22	3,22	s	Colina e derivados	CH <sub>3</sub>	55,8	

23	4,66	d (7,9 Hz)	β-glucose	H1	98,8	
	3,26	m		H2	75,0	
	3,50	m		H3	76,7	
	3,35	m		H4	70,5	
	3,48	m		H5	76,7	
	3,78	m		H6	61,6	
	3,91	dd (12,3; 2,1 hz)		H6'		
24	3,05	s	Creatinina	CH <sub>3</sub>		
	4,05	s		CH <sub>2</sub>		
25	3,12	dd (14,7; 8,2 Hz)	Fenilalanina	metade do β-CH <sub>2</sub>		
	3,29	dd (14,7; 5,1 Hz)		metade do β-CH <sub>2</sub>		
	3,99	dd (8,2; 5,1 Hz)		α-CH		
	7,33	m		H2 e H6		
	7,38	m		H4		
	7,42	m		H3 e H5		
26	3,16	s	Não identificado			
27	3,12	m	Não identificado			
28	5,25	d (3,8 Hz)	α-glucose	H1	94,8	
	3,58	m		H2	74,2	
	3,77	m		H3 e H6	75,6	
	3,47	m		H4	72,5	
	3,84	m		H5	74,2	
	3,88	m		H6'	63,6	
29	3,84	m	Serina	CH		
	3,97	m		CH <sub>2</sub>		

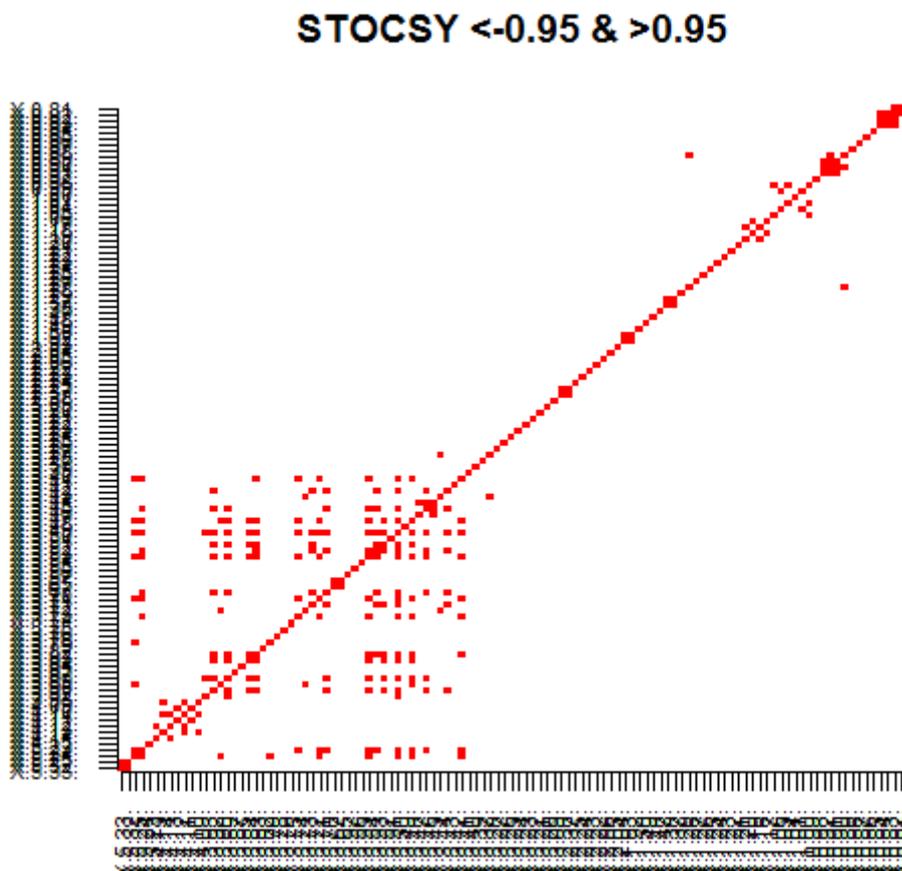
30	3,05	<i>m</i>	Tirosina	$\gamma$ -CH <sub>2</sub> a	
	3,23	<i>m</i>		$\gamma$ -CH <sub>2</sub> b	
	3,94	<i>m</i>		$\alpha$ -CH	
	6,90	<i>m</i>		H3 e H5	
	7,20	<i>m</i>		H2 e H6	
31	~5,30	<i>s</i>	Ureia	NH <sub>2</sub>	
32	1,74	<i>m</i>	Putrescina	$\beta$ -CH <sub>2</sub>	
	3,04	<i>m</i>		$\alpha$ -CH <sub>2</sub>	
33	3,10	<i>dd</i>	Histidina	CH <sub>2</sub> a	
	3,21	<i>dd</i>		CH <sub>2</sub> b	
	3,97	<i>dd</i> (7,9; 5,0 Hz)		$\alpha$ -CH	
	7,05	<i>s</i>		H4	
	7,76	<i>s</i>		H2	
34	7,15	<i>d</i> (9,0 Hz)	Não identificado		
	7,38	<i>d</i> (9,0 Hz)			
35	6,94	<i>m</i>	Não identificado		
	7,70	<i>m</i>			
36	8,18	<i>s</i>	Hipoxantina	CH (anel 6)	
	8,20	<i>s</i>		CH (anel 5)	

37	8,46	s	Formato	CH		
38	6,73	m	Não identificado			
39	7,62	m	Não identificado			
40	7,76	m	Não identificado			
41	8,21	s	Não identificado			
42	8,23	s	Não identificado			
43	8,32	s	Não identificado			

\*Abreviações: s = simpleto; d = duplete; dd = duplo duplete; t = tripleto; m = multiplete.

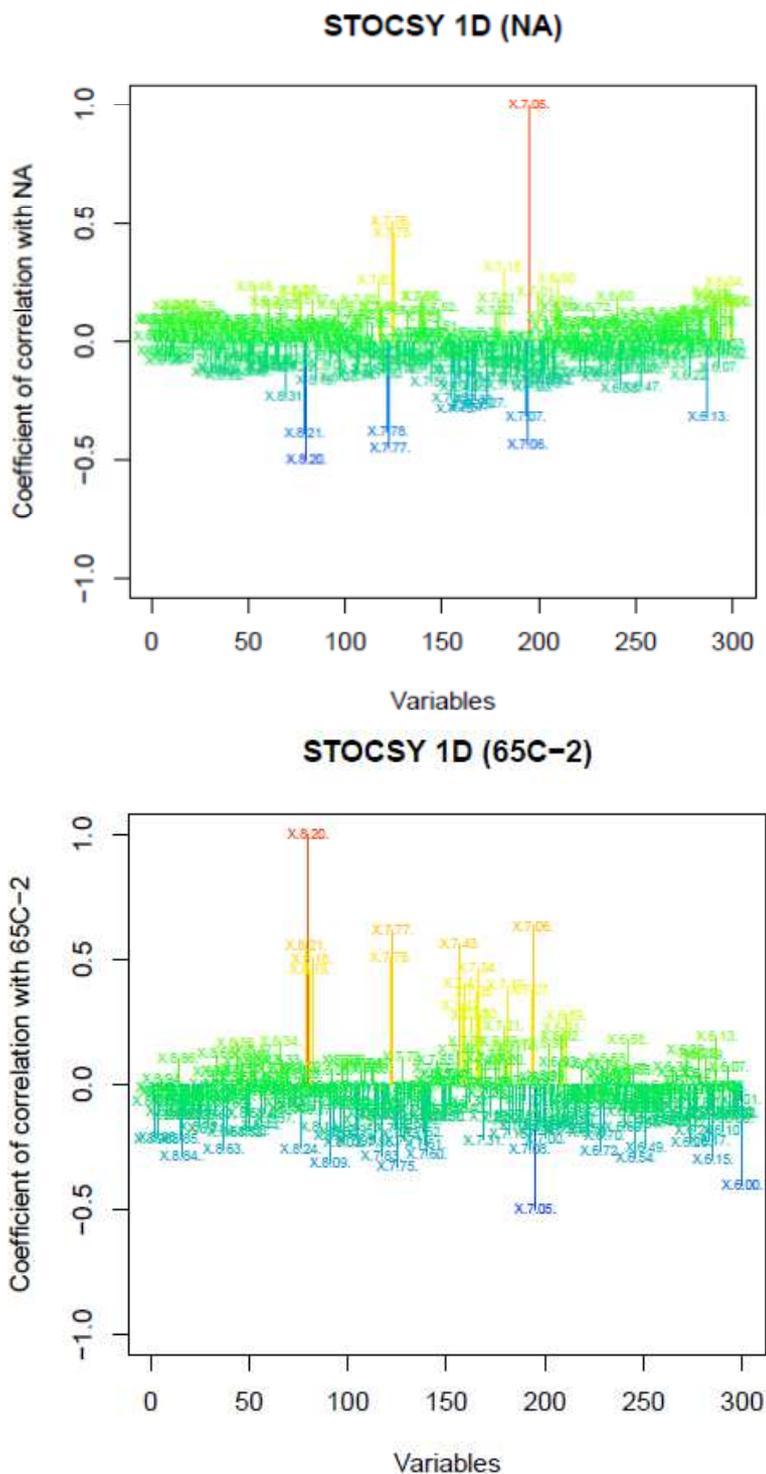
Conforme se observa na Tabela 4 a maior parte dos sinais não identificados se encontra na região aromática, na qual os sinais apresentam baixa intensidade e, portanto não são facilmente observados em experimentos bidimensionais para auxiliar na identificação. A falta de correlação destes com sinais em experimentos de correlação heteronuclear de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  também pode estar relacionada ao fato destes hidrogênios estarem ligados a núcleos de nitrogênio em nucleotídeos ou purinas.

Os experimentos de STOCSY e RANSY foram usados para confirmar e tentar obter mais informações que auxiliem na atribuição dos sinais. Estes experimentos foram realizados exportando a matriz criada no programa AMIX para o *muma*. O primeiro conjunto de dados utilizado foi o criado com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquirido com a sequência de pulso *noesypr1d* das amostras de controle A, B e C, sem limite mínimo de variância dos *buckets*. Porém, provavelmente devido à baixa relação sinal/ruído, não foi possível obter informações adicionais que permitissem atribuir sinais não identificados, apenas permitiu confirmar algumas atribuições. Portanto o mesmo conjunto de dados, porém agora com exclusão de *buckets* com menos de 5% de variância explicada foi utilizado. Com esta exclusão, apenas sinais na região de 0,4-4,5 foram incluídos, não permitindo que sinais na região aromática fossem elucidados. Similarmente ao que ocorreu com o conjunto anterior, não foi possível obter informações a respeito dos sinais com baixa relação sinal/ruído, sendo estes os que apresentaram maior dificuldade de serem identificados. Basicamente o que se observa são as mesmas correlações observadas para o experimento TOCSY, conforme se observa na Figura 11 com limites de 0,95. Os experimentos de RANSY não forneceram informações adicionais.

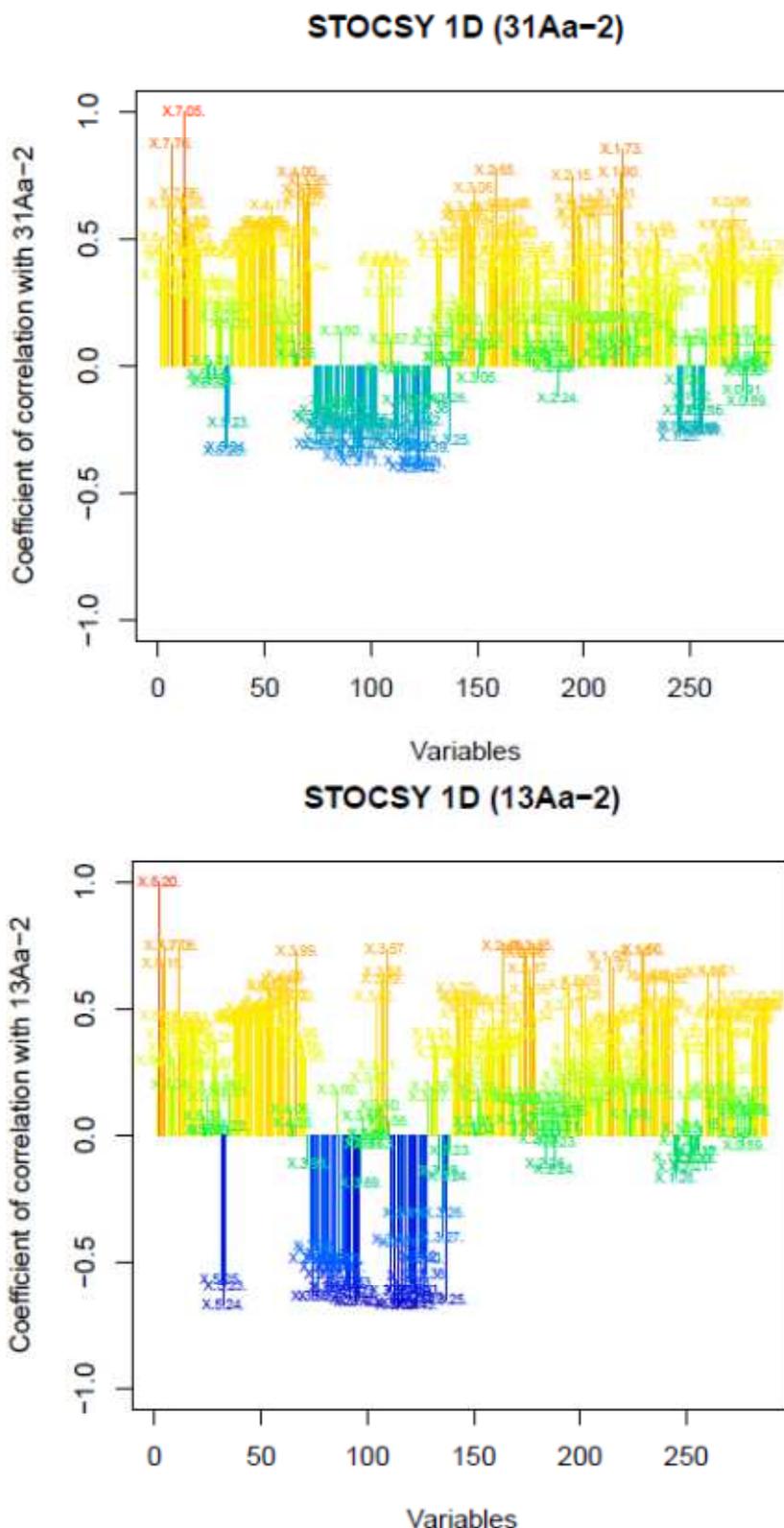


**Figura 11:** Experimento de correlação estatística total (STOCSY) da região  $\delta$  0,4-4,5 de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* de amostras de soro sanguíneo realizado no *muma* mostrando correlações dentro do limite de 0,95.

O mesmo conjunto, agora considerando apenas a região de  $\delta$  6,0-9,0, sem excluir sinais de baixa variância, foi criado. Neste foi possível confirmar algumas atribuições, como por exemplo, a correlação entre os sinais em  $\delta$  7,05 e 7,76 atribuídos à histidina, conforme mostra a Figura 12 em que barras vermelhas e laranjas mostram correlações positivas, barras azuis correlações negativas e barras verdes indicam nenhuma correlação. Destaca-se a correlação entre o sinal em  $\delta$  7,05 com os sinais em  $\delta$  8,20 e 8,21. No entanto, ao se realizar a mesma análise com espectros *cpmgpr1d* não se observou esta mesma correlação com os sinais em  $\delta$  8,20 e 8,21 (Figura 13). Visto que este experimento permite perceber correlações entre sinais de uma mesma molécula ou com sinais de outras moléculas com as quais haja interação, o resultado observado para a sequência de pulso *noesypr1d* pode indicar que esteja havendo interação intermolecular entre os dois metabólitos. Não foi possível obter correlações para sinais não identificados.

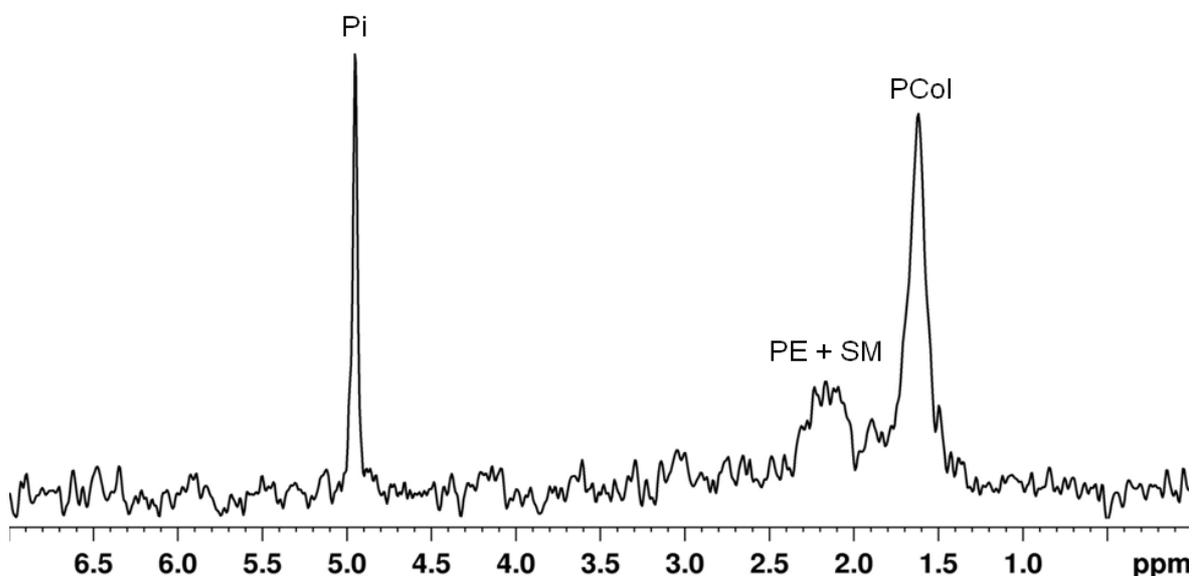


**Figura 12:** Experimento de correlação estatística total (STOCSY) unidimensional da região  $\delta$  6,0-9,0 de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* de amostras de soro sanguíneo realizado no *muma*. Barras vermelhas e laranjas mostram correlações positivas, barras azuis correlações negativas e barras verdes indicam nenhuma correlação.



**Figura 13:** Experimento de correlação estatística total (STOCSY) unidimensional da região  $\delta$  4,0-9,0 (exclusão das regiões  $\delta$  1,30 a 1,37 e  $\delta$  4,0 a 5,2) de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* de amostras de soro sanguíneo realizado no *muma*. Barras vermelhas e laranjas mostram correlações positivas, barras azuis correlações negativas e barras verdes indicam nenhuma correlação.

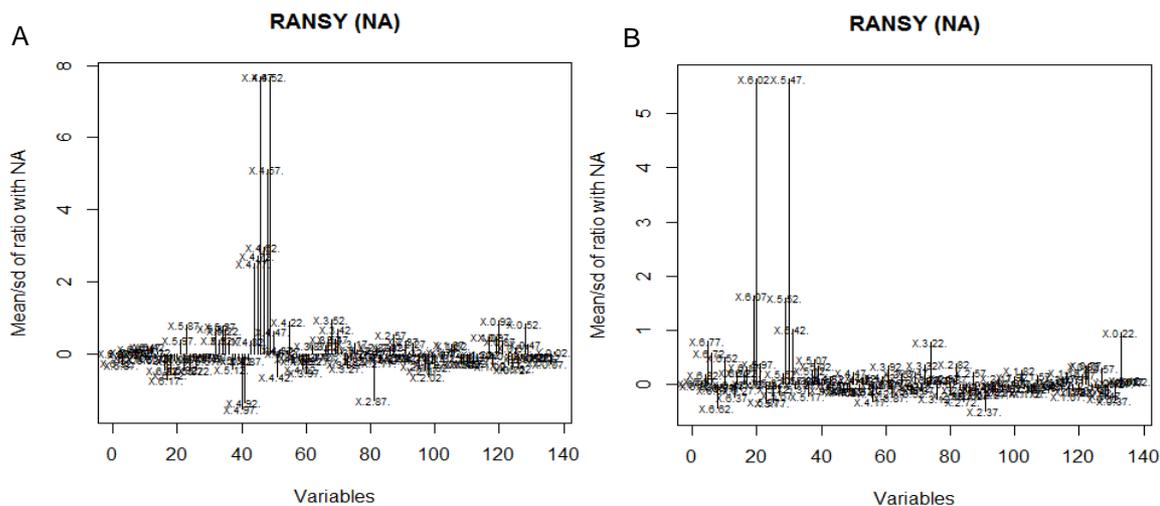
Quanto aos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , a maioria das amostras apresentou dois sinais mais intensos, tendo sido calibrados pelo sinal mais à esquerda em  $\delta$  4,95, como mostrados na Figura 14, visto que a adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  como padrão não foi viável porque o sinal deste se sobrepôs aos sinais da amostra. Também foram observados sinais em  $\delta$  1,50-2,50 com menor intensidade e que variaram em deslocamento químico e intensidade entre as amostras. Conforme Kuliszkievicz-Janus Baczyński (Kuliszkievicz-Janus Baczyński, 1996), o sinal em  $\delta$  4,95 se refere a fosfatos inorgânicos ( $\text{P}_i$ ), os sinais em  $\delta$  1,90-2,50 se referem a sobreposição dos fosfolipídeos fosfatidiletanolamina (PE) e esfingomiéline (SM) e o sinal em torno de  $\delta$  1,66 refere-se a fosfatidilcolina (PCol). Para confirmar estas atribuições, realizaram-se experimentos de correlação heteronuclear a longa distância entre  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  (HMBC  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ ) em água, porém não foi possível obter correlações, independente do experimento ser feito no espectrômetro de 400 ou de 600 MHz, ou utilizando sonda de observação direta ou indireta. Este fato pode ser justificado pelo fato de que os fosfolipídeos são transportados no soro humano em complexos de lipídeos e proteínas, tais como HDL (lipoproteína de alta densidade) (Sullentrop *et al.*, 2002; Meneses e Glonek, 1988).



**Figura 14:** Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  da amostra A do paciente 13 adquirido com sequência de pulso *zgpg30*.

Algumas amostras apresentaram sinais nos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  além destes sinais já relatados. Por exemplo, a amostra 49B não apresentou o sinal em  $\delta$  4,95, porém apresentou multipletos entre  $\delta$  4,50 e 4,75. A amostra 18A apresentou dois doublets em  $\delta$  5,47 e 6,04, a amostra de controle 66B apresentou um sinal intenso em  $\delta$  1,39, além das amostras 7Aa e 7Ab que não apresentaram nenhum sinal. Experimentos

de STOCYSY e RANSY foram realizados para auxiliar na identificação dos sinais, considerando a região de  $\delta$  0,0-7,0 com *buckets* de 0,05 ppm. Neste caso o experimento RANSY forneceu informações mais claras que o STOCYSY para os sinais em torno de  $\delta$  5,47 e 6,04, os quais mostraram razões similares (Figura 15A), o que indica que pertençam à mesma molécula. Os sinais em  $\delta$  4,50 e 4,75 também mostraram razões similares (Figura 15B). Já o *bucket* em  $\delta$  1,39 não mostrou correlação com outros sinais. No entanto, estas informações juntamente dos dados encontrados na literatura não foram suficientes para fazer a atribuição destes sinais.

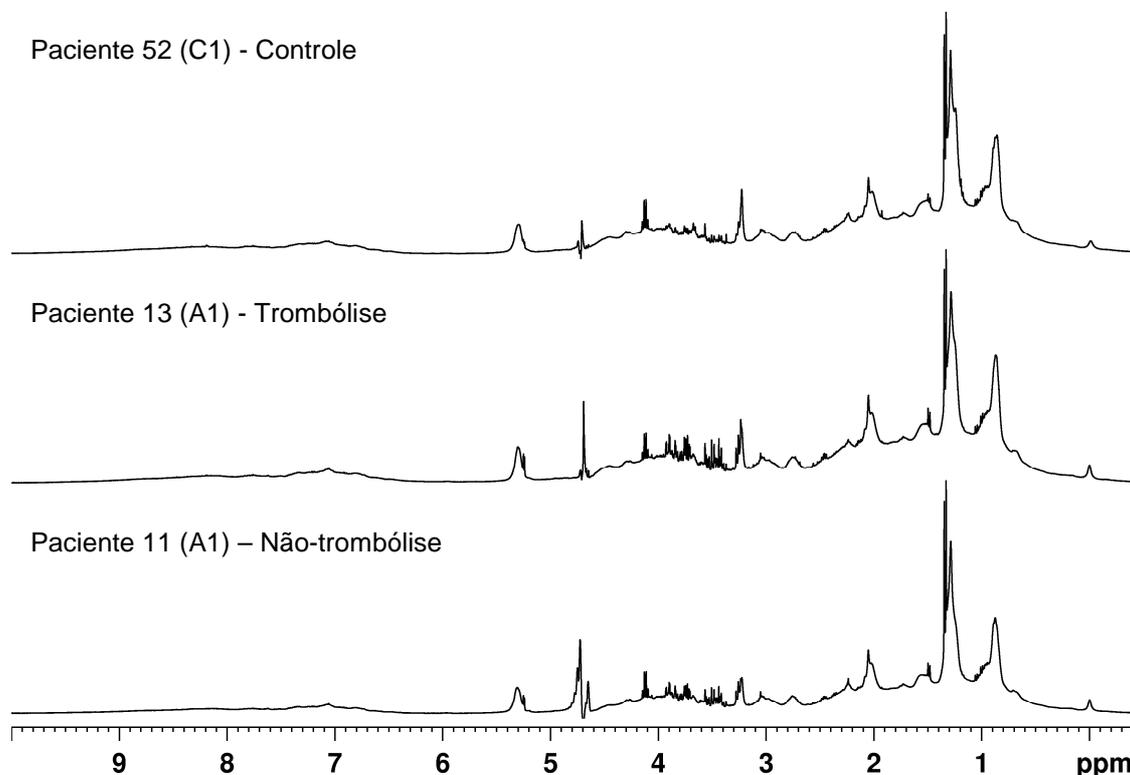


**Figura 15:** Experimento de RANSY da região  $\delta$  0,0-7,0 de espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  de amostras de soro sanguíneo realizado no *muma* referente aos *buckets* em  $\delta$  4,52 (A) e 6,02 (B).

#### 4.1.5 Análise visual dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ das amostras de soro sanguíneo

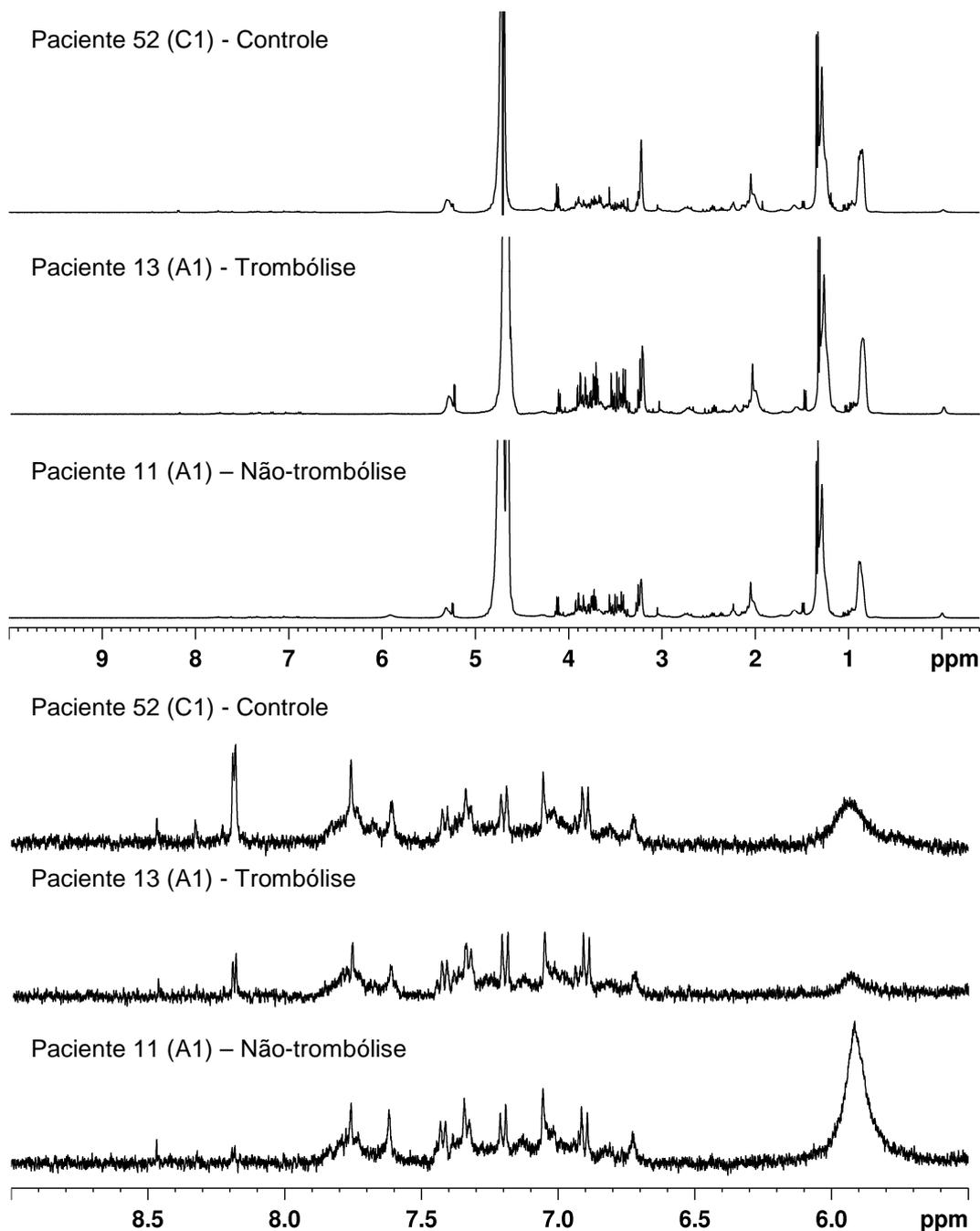
Primeiramente analisaram-se os espectros em geral para analisar as principais características e procurar possíveis tendências em cada grupo analisado. A Figura 16 mostra espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência *noesypr1d* de pacientes com AVEi, incluindo pacientes que receberam tratamento de trombólise ou não, e pacientes de controle, ilustrando o que foi observado nas amostras em geral. Nota-se que os três espectros apresentam um padrão semelhante de sinais, sendo que a maior parte dos sinais mais intensos está concentrada na região de  $\delta$  0,4 a 4,2 e se referem principalmente a lipoproteína, lipídeos, aminoácidos e açúcares, conforme identificados na seção 4.1.4. Já a região aromática apresentou sinais pouco intensos. Nos três casos os sinais mais intensos foram os referentes a lipídeos e lactato. O lactato ( $\delta$  1,34 e  $\delta$  4,12) está presente na maioria das amostras em grande intensidade e variou de forma aleatória entre os espectros. Considerando que o lactato é um indicativo de inflamações, a grande variação pode ser devido ao tamanho do enfarte ocorrido, visto que enfartes

maiores causam uma resposta inflamatória proporcional (Jickling e *col.*, 2011). Porém, levando em conta que este sinal também foi observado em grande intensidade em amostras de controle, não pode ser utilizado como medida do grau do AVEi nem como indicativo da ocorrência do mesmo.



**Figura 16:** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* dos pacientes 11 e 13 nas primeiras 24 horas após o AVC (amostras A1) e da primeira coleta (amostra C1) do paciente de controle (paciente 52).

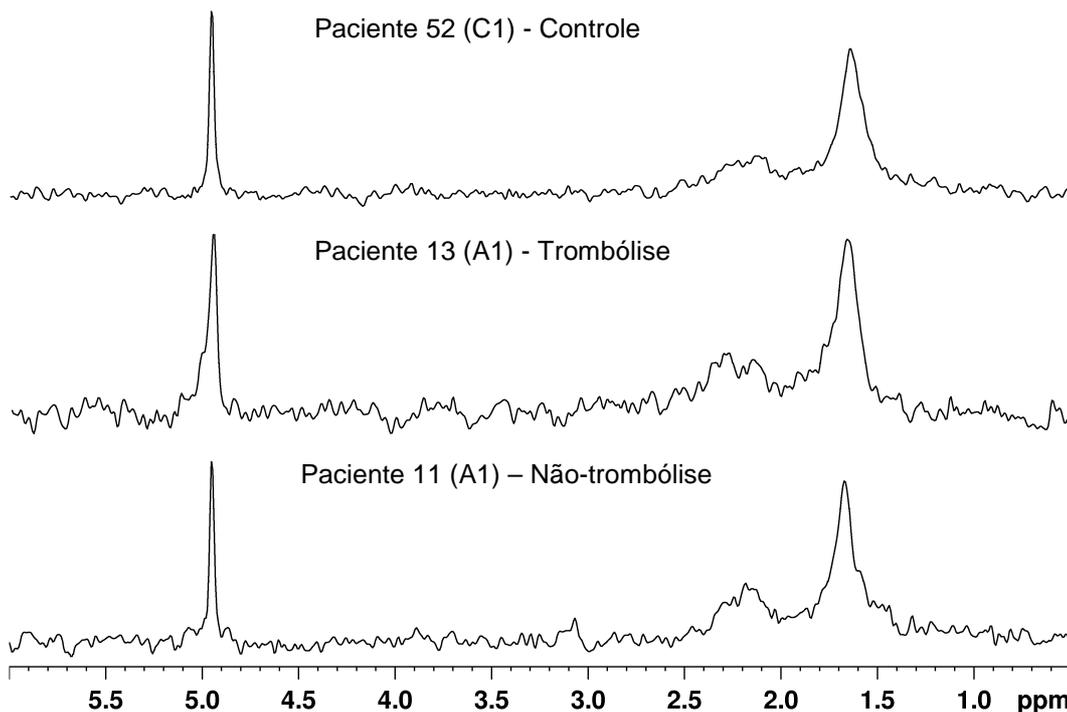
Analisando os espectros de RMN de <sup>1</sup>H adquiridos com a sequência *cpmgpr1d* percebe-se que com a eliminação dos sinais alargados de macromoléculas é possível a melhor visualização dos sinais menos intensos, tanto na região alifática como aromática (Figura 17). Também facilita a observação de variações nas intensidades dos sinais. Por exemplo, se observa muito mais claramente que a amostra do paciente 52 de controle apresenta os sinais em  $\delta$  3,3 a 4,0, região dominada por sinais de açúcares, com menor intensidade em relação à colina e derivados ( $\delta$  3,22) e em relação ao sinal de lactato em  $\delta$  1,38 do que os espectros dos outros dois pacientes. No entanto, esta observação não foi constante para todas as amostras de controle. Especialmente a região aromática ( $\delta$  6,5 a 8,5) apresenta melhor definição dos sinais. Essa região apresentou grande variação nos sinais nos espectros das diferentes amostras, não sendo possível perceber um padrão apenas por análise visual.



**Figura 17:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* dos pacientes 11 e 13 nas primeiras 24 horas após o AVC (amostras A1) e da primeira coleta (amostra C1) do paciente de controle (paciente 52). Espectros abaixo referem-se a ampliação da região aromática  $\delta$  5,5-9,0.

Os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  similarmente aos de  $^1\text{H}$  apresentaram sinais muito similares para as amostras dos três pacientes analisados (Figura 18), bem como da maioria dos pacientes. Os espectros foram bastante simples, com apenas um sinal em  $\delta$  4,95 e multipletos na região de  $\delta$  2,10-2,70, cujos deslocamentos químicos apresentaram pequenas variações entre os espectros. Desta forma, amostras que

apresentaram sinais diferentes deste padrão geral foram facilmente observadas. Destaca-se o paciente 7, cujas amostras de 24 horas antes e depois da tratamento trombolítico (A1 e A1t) não apresentaram sinal algum no espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ . Porém, as amostras de sete dias (A7) do mesmo paciente apresentaram os mesmos sinais padrões das demais amostras. Não se encontrou uma explicação clínica que justificasse esta observação. Além disso, alguns apresentaram sinais extras, conforme explicado na seção 4.1.4.



**Figura 18:** Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  dos pacientes 11 e 13 nas primeiras 24 horas após o AVC (amostras A1) e da primeira coleta (amostra C1) do paciente de controle (paciente 52).

#### 4.1.6 Análises quimiométricas dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ das amostras de soro sanguíneo

Embora o perfil dos sinais tenha variado tanto entre amostras de soro ou plasma do mesmo paciente como entre pacientes diferentes, não foi possível perceber um padrão de mudanças nos sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ou  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  que identificasse um grupo específico apenas por avaliação visual. Assim se tornou essencial a realização de análises quimiométricas para tentar discriminar as amostras de acordo com grupos específicos, principalmente entre grupos de controle e com AVEi, administração de tratamento trombolítico ou não, etiologia da doença e prognóstico. Todas estas foram realizadas para todos os períodos após a ocorrência do AVEi.

Vale ressaltar que em condições complexas, tais como o AVEi, é comum encontrar grande heterogeneidade entre os pacientes, sendo que o perfil bioquímico pode ser alterado devido ao local, intensidade e duração do AVEi. Outros fatores como etnia, comorbidades, técnicas analíticas e interpretação dos resultados limitam a reprodutibilidade entre estudos, além de que pequenas populações de amostras tornam difícil aferir a respeito da verdadeira relação entre um possível biomarcador e o diagnóstico ou prognóstico. Portanto, para minimizar a influência destes fatores, é ideal que se use a maior população possível com fatores de riscos conhecidos (Hasan *et al.*, 2012).

#### 4.1.6.1 Análises no AMIX

A realização das análises quimiométricas exige a utilização de programas computacionais, visto a grande quantidade de variáveis e de amostras a serem analisadas. O programa inicialmente escolhido para a realização das análises foi o AMIX, especialmente desenvolvido para análises de espectros de RMN.

Em todos os casos primeiramente foi realizada a PCA, a qual permite visualizar possíveis discriminações entre os grupos e também identificar possíveis amostras anômalas, pois fornece gráficos que mostram a posição de cada amostra em relação ao espaço e ao centro do novo conjunto de dados com dimensão reduzida, de acordo com o nível de confiança determinado pelo analista, neste caso de 99%. Vale ressaltar que mesmo que uma amostra apareça nestes gráficos como anômala, é preciso primeiro analisar se a amostra realmente apresenta algum fator que justifique a mesma ser excluída das análises, como por exemplo, um erro no preparo ou alguma contaminação, ou se apenas ocorreu uma variação natural, como por exemplo, a presença de sinal de etanol em amostras de alguns pacientes. Portanto, amostras que se apresentaram como anômalas foram primeiramente investigadas, e nenhuma amostra precisou ser retirada. Em sequência à PCA, foi realizada a PLS-DA, método supervisionado em que uma segunda matriz, a matriz Y, é fornecida com informações que identificam os grupos que estarão sendo analisados. A PLS-DA procura então encontrar a melhor correlação entre essa matriz Y e a matriz X utilizada na PCA, composta pelos valores das integrais dos *buckets* gerados a partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Wishart, 2008), conforme explicado na seção 1.4.2.2.

Foram testados vários parâmetros a serem utilizados nas análises quimiométricas, incluindo as regiões do espectro, tamanho dos *buckets*, bem como métodos de construção dos *buckets*, integração e escalamento dos *buckets*. A região do espectro a ser analisada foi escolhida de acordo com o espectro adquirido e estão descritas na seção 3.5.1. Foram excluídos os sinais da água e do lactato ( $\delta$  1,30 a 1,37 e  $\delta$  4,00 a

5,20) nas análises com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , pois o lactato está presente na maioria das amostras em grande intensidade e variou de forma aleatória entre os espectros. As análises iniciais em que foram considerados os sinais de lactato ( $\delta$  1,34 e  $\delta$  4,12) apresentaram quase que exclusivamente estes sinais como os de maior influência nos gráficos de *loadings* sem resultar em discriminações entre os grupos analisados. Além disso, o lactato está correlacionado a diversas outras doenças (Wishart e *col.*, 2013; Vander Heiden *et al.*, 2009), e, portanto, foram excluídos das análises quimiométricas dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . No caso das amostras de plasma também foram excluídas as regiões dos sinais de EDTA ( $\delta$  2,50 a 3,30 e  $\delta$  3,58 a 3,67).

Optou-se por utilizar o método de *bucketing* ou *binning*, em que o espectro é dividido em um determinado número de *buckets* e as medidas, no caso as integrais dos sinais, dentro de cada *bucket* são somadas para formar um novo espectro com menos variáveis. Isto resolve o problema de se ter um número de variáveis muito alto, o que tornaria as análises muito lentas para serem realizadas em computadores comuns. Também implica em alisamento do espectro e possui o potencial de corrigir pequenas variações de deslocamento (Liland, 2011). Embora resulte em diminuição da resolução, não há motivos para se incluir informações além da resolução dos sinais dos compostos que geraram o espectro. No entanto há cuidados que devem ser tomados. Assim como no caso de quando se considera cada ponto como uma variável, o método de *bucketing* pode resultar em separações espúrias se os dados não forem corretamente tratados, por ser suscetível a influência de ruídos espectrais (Liland, 2011). Também se deve tomar cuidado para que posições erradas de *buckets* possam resultar em perda de informações ou informações incorretas. Caso aconteça de um sinal estar levemente deslocado em relação aos demais espectros, este pode ser somado a um *bucket* indevido, adicionando assim valores a *buckets* vizinhos o que tornará as análises quimiométricas realizadas em sequência menos precisas (Liland, 2011). Portanto, os espectros devem ser corretamente alinhados.

Os *buckets* foram construídos por dois métodos diferentes: retangular e avançado. O método retangular é um método padrão, normalmente utilizado quando não se tem informações adicionais a respeito dos espectros. Caso não seja possível dividir a faixa espectral escolhida de forma que todos *buckets* sejam completos, quer dizer, caso sobre faixas menores que um *bucket* inteiro (p. ex. resta 0,02 ppm e está se utilizando *buckets* de 0,04 ppm), então frações serão calculadas. Isto evita problemas denominados ruído de *bucketing*. Esse método, porém, pode apresentar problemas, principalmente em casos especiais em que se utiliza análise de covariância combinada (Neidig, 2009). O método avançado por sua vez se baseia nos sinais existentes em cada espectro. Isto resulta em pelo menos duas vantagens. A primeira é que as integrais correspondentes a sinais

existentes em apenas um espectro são armazenados em colunas preenchidas com zeros para os demais espectros, aumentando assim a significância destes sinais. A segunda vantagem é que esse método diminui o tamanho das tabelas de *buckets*, porque apenas cria colunas se houver sinais naquele deslocamento (Neidig, 2009). Portanto, este método apresenta potencial de apresentar melhores resultados que o método retangular e foi utilizado para todas as análises com espectros de RMN de  $^1\text{H}$  paralelamente ao método retangular tradicional, sendo o melhor resultado considerado. Notou-se que em muitos casos este método obteve de fato melhores resultados. Quando se considerou apenas a região aromática no caso dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência *cpmgpr1d*, apenas o método avançado para construção dos *buckets* resultou em análises satisfatórias. Ao se utilizar o método retangular, *buckets* contendo apenas ruído apresentaram significância muito alta, sendo necessário retirar *buckets* com mínimo de 80 a 90% de significância para excluir a maior parte do ruído. Neste sentido o método avançado foi bastante vantajoso, pois inclui apenas *buckets* correspondentes a sinais e não a ruído. Apenas para análises com espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  o método avançado não pode ser usado devido haver espectros sem sinais ou relação sinal/ruído muito baixa, que impossibilitam os cálculos pelo método avançado.

O tamanho dos *buckets* foi fixado em 0,01 ppm porque resultou em gráficos de influência bem compreensíveis, o que não ocorre para *buckets* menores que 0,01, e ao mesmo tempo abrange uma faixa compatível com a largura dos sinais sem abranger muitos sinais em um mesmo *bucket*. Se o *bucket* for muito largo abrangerá mais de um sinal e reduzirá a quantidade de informações (Liland, 2011). A desvantagem ocorre no caso de multipletos para os quais mais de um *bucket* pode abranger o mesmo sinal.

No caso dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  foi utilizada exclusivamente a região que apresentou sinais,  $\delta$  0,00 a 7,00. Foram realizadas de duas formas diferentes: a primeira com *buckets* de 1,40 ppm, para que as duas regiões que apresentaram sinais fossem integradas separadamente considerando os sinais em cada uma delas como conjuntos únicos; e a segunda considerando a região de  $\delta$  0,50 a 5,50 com *buckets* de 0,05 ppm. Os resultados obtidos foram comparados.

As linhas da tabela de *buckets* devem ser escaladas de forma que os espectros produzam *buckets* comparáveis (Neidig, 2009), e para isto foram utilizados dois métodos: escalamento em relação à intensidade total dos sinais e escalamento em relação ao maior *bucket*. Observou-se que o segundo tipo de escalamento resultou em dados mais agrupados do que o primeiro no caso dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , com menor número de amostras fora dos limites determinados pelo nível de confiança. Portanto, se utilizou o escalamento em relação ao maior *bucket* para as análises. Ambos os métodos podem não ser ideais para amostras com grandes variações de intensidade no mesmo espectro,

pois em casos extremos, sinais pouco intensos podem ser desconsiderados. Por isso, as análises da região aromática, cujos sinais são muito menos intensos do que os sinais da região alifática foram realizadas separadamente. Com a exclusão do sinal da água e do lactato, cada uma das regiões analisadas apresenta sinais em intensidades semelhantes e evita potenciais problemas causados pelo escalamento.

O método de integração, que deve ser ajustado quando se utiliza o método retangular para construção dos *buckets*, variou entre soma das intensidades absolutas e modo especial de integração. Este último método apresenta vantagens por suprimir efeitos causados pela variação no ajuste da fase do espectro e na linha de base do espectro (Neidig, 2009), e foi o método com melhor resultado para praticamente todas as análises com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  quando utilizado o método retangular para construção dos *buckets*. No entanto, no caso das análises dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  foi sempre utilizado a soma das intensidades absolutas, porque o modo especial pode apresentar problemas no caso de espectros com grandes larguras de linha (Neidig, 2009).

Na realização da PCA as colunas também podem ser escaladas. Ao se testar escalamentos das colunas, buscando aumentar a significância de variações em sinais menos intensos, os quais muitas vezes correspondem a substâncias afetadas pela doença, não se observou diferenças nos gráficos obtidos pelo método de PLS-DA, além de não melhorar a discriminação entre os grupos nas análises por PCA em relação à análise sem escalamento das colunas. Portanto, após as opções disponíveis serem testadas, optou-se por não realizar qualquer tipo de escalamento, o que permitiu obter melhores resultados e gráficos de *X-loadings* mais claramente interpretáveis. Isto se justifica porque o não escalamento das colunas preserva diferenças naturais nas intensidades e destaca os efeitos dominantes. Além disso, permite que variâncias pequenas sejam suprimidas, sendo possível determinar a variância mínima que uma variável deve apresentar para ser incluída nos cálculos da PCA. O resultado é a exclusão dos ruídos, um menor número de variáveis e um gráfico de *X-loadings* mais limpo e mais fácil de ler.

Para a realização do PLS-DA é necessário a escolha cuidadosa do número de variáveis latentes (VL), que equivalem às componentes principais. Deve-se escolher um número de VL que seja suficiente para explicar a maior parte da variância das matrizes X e Y, e, ao mesmo tempo, produzir conjuntos de dados de dimensão reduzida com boa capacidade de previsão. O número de VLs para cada grupo analisado foi determinado utilizando-se o procedimento de validação cruzada *leave-one-out* e tendo como base os gráficos R2X e R2Y, os quais mostram o valor da variância não explicada das matrizes X e Y, respectivamente, conforme aumenta o número de variáveis latentes. No método de

validação cruzada *leave-on-out* uma amostra é retirada aleatoriamente do conjunto de dados, e um novo conjunto de dados de dimensão reduzida é desenvolvido com as amostras ( $n - 1$ ) restantes (chamado então de calibração). A amostra retirada é então testada como uma primeira validação do modelo criado. Esse processo será contínuo até que seja criado um “ $n$ ” número de conjuntos de dados testados. Para cada amostra retirada, um conjunto de dados de dimensão reduzida é criado e testado. A exatidão na classificação do modelo para “ $n$ ” números de validações e testes é então determinada (Neidig, 2009; Reche *et al.*, 2009). No caso das análises considerando todas as amostras de AVEi, com exceção das análises da região aromática e dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , a validação cruzada foi realizada retirando cerca de 5%, ao invés da *leave-one-out*, porque esta última é bastante demorada quando o número de espectros e de variáveis é muito grande.

Para cada discriminação foi avaliada a porcentagem de variância explicada pelas variáveis latentes consideradas e o valor de RMSECV (*root mean square error of cross validation*) gerado após a validação cruzada. Este valor é dado pela fórmula abaixo, em que  $y_i^*$  e  $y_i$  são respectivamente os valores preditos e originais de cada amostra, e “ $n$ ” o número total de amostras (Neidig, 2009).

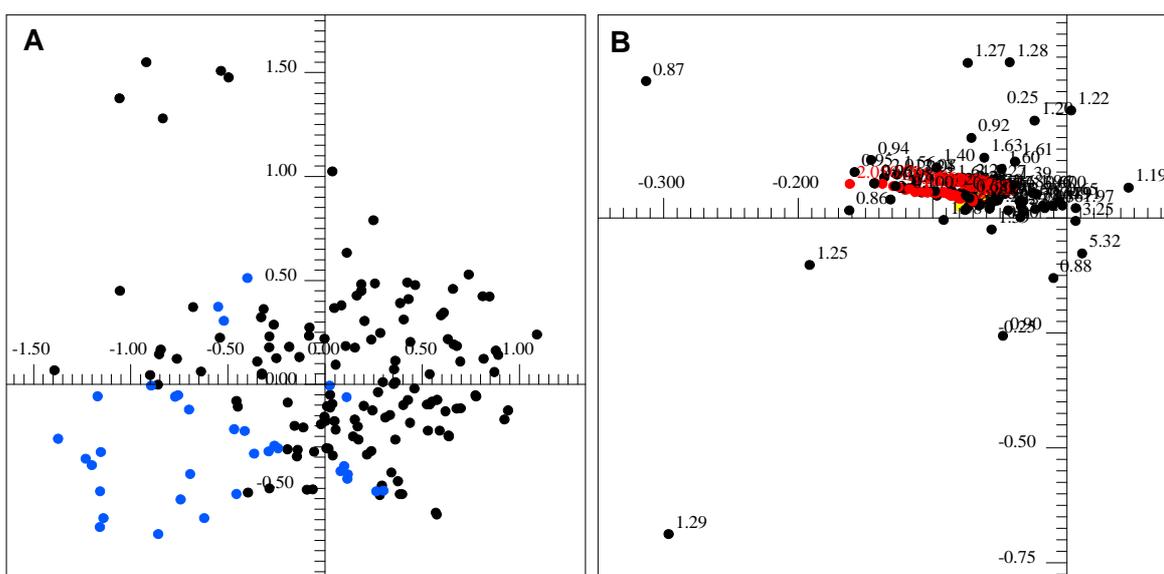
$$\text{RMSEC} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i^* - y_i)^2 / n}$$

No cálculo de RMSECV consideram-se as amostras que foram usadas na construção do conjunto de dados de dimensão reduzida resultante daquela análise, e, portanto, expressa quão bem o conjunto de dados prediz a si mesmo. O valor de RMSECV deve ser o menor possível. No caso de se utilizar este conjunto de dados para prever novas amostras, se utiliza o valor de RMSEP (*root mean square errors of prediction*) para expressar a capacidade do modelo prever valores de novas amostras. Este é calculado similarmente ao RMSECV, porém um novo conjunto de amostras não incluídas na construção do conjunto de dados com valores conhecidos deve ser fornecido (Neidig, 2009).

Por fim, para cada avaliação realizaram-se análises estatísticas de significância com os *buckets* apresentados no gráfico de *X-loadings*, conforme descrito na seção 3.6.2.

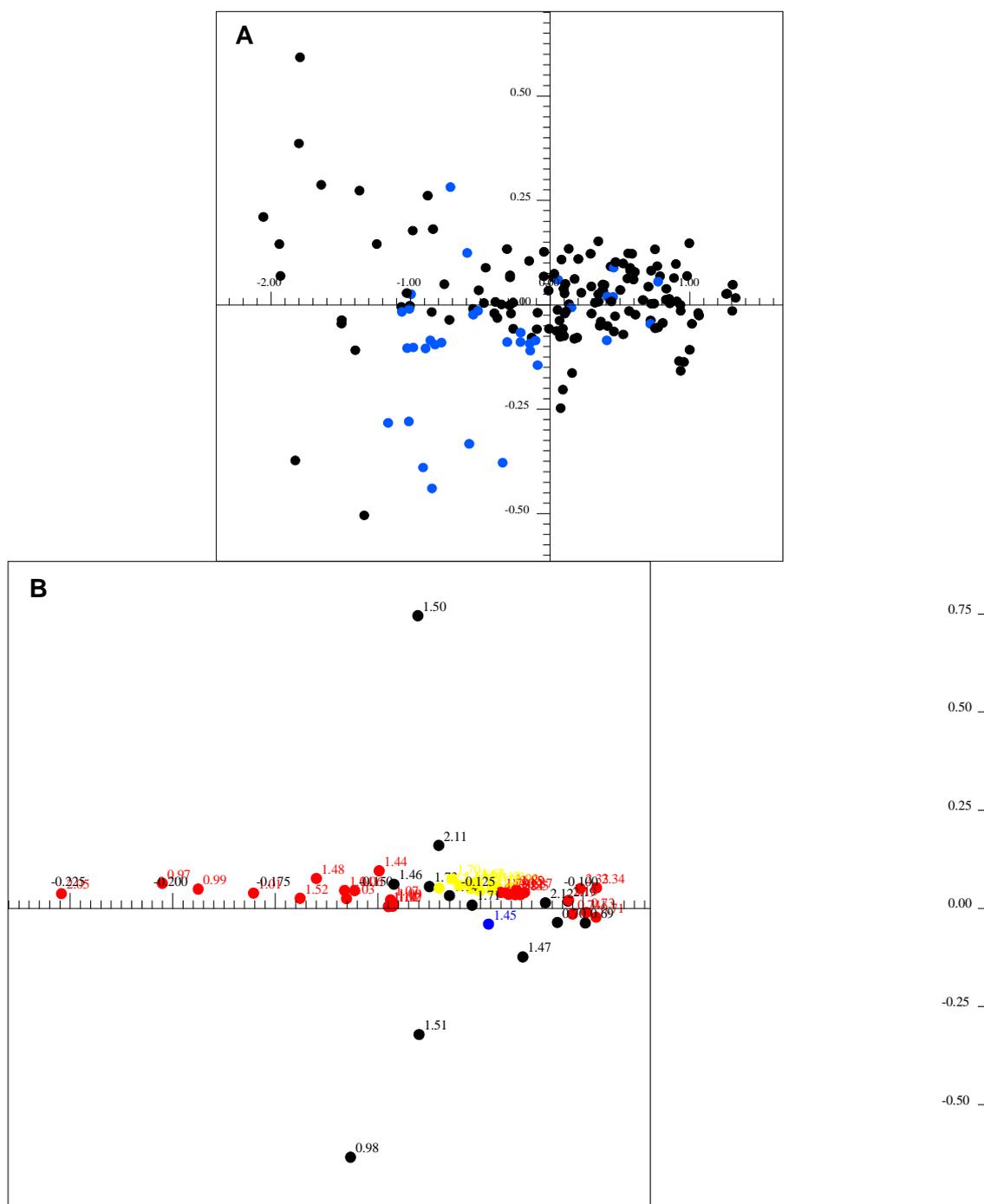
No entanto, notou-se que em geral apenas um pequeno número de *buckets* mostrou-se significativo, havendo casos em que, embora se tenha observado certa discriminação, nenhum *bucket* foi tido como significativo. Assim avaliou-se se, considerando apenas os *buckets* tidos como significantes, se seria possível obter discriminação similar à obtida considerando todos os *buckets*. Desta forma, pode-se avaliar a importância dos demais *buckets* não significantes para a discriminação obtida.

Nos casos em que apenas um *bucket* foi tido como significativo, não é necessário fazer uma análise multivariada. Já no caso em que vários *buckets* são considerados significantes foi realizada a análise apenas com estes *buckets*. Por exemplo, no caso da análise das amostras A de todos os pacientes que sofreram AVEi juntamente com as amostras A dos pacientes de controle obteve-se o resultado apresentado na Figura 19. Observa-se na Figura 19A uma pequena discriminação entre os grupos, ao passo que no respectivo gráfico de *X-loadings*, após serem retirados *buckets* com variância explicada inferior a 10%, a maioria dos *buckets* não foram considerados significantes. Ao se realizar a mesma análise considerando apenas as regiões dos *buckets* considerados significantes o resultado foi bastante diferente, com sobreposição total dos dois grupos, conforme observado na Figura 20. Enquanto no primeiro caso foram considerados 151 *buckets*, no segundo foram apenas 57. Outro problema apresentado neste segundo caso foi na questão da variância explicada da matriz Y, a qual apresentou valores negativos para todas variáveis latentes ao se realizar a validação cruzada retirando cerca de 5%, a mesma utilizada para a primeira análise. Portanto, foi necessário utilizar a validação cruzada *leave-one-out*, mais demorada quando se analisa um grande número de espectros, porém permitiu obter valores positivos para as duas primeiras variáveis latentes, 4,21% e 8,75%, respectivamente. Ilustrou-se assim que não se pode levar em conta apenas os *buckets* considerados significantes, deve-se também considerar a influência dos demais *buckets* nas análises. As Figuras 21 e 22 mostram resultados similares para as análises da região de  $\delta$  0,4 a 4,0 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com sequência de pulso *cpmgpr1d* referentes às mesmas amostras.



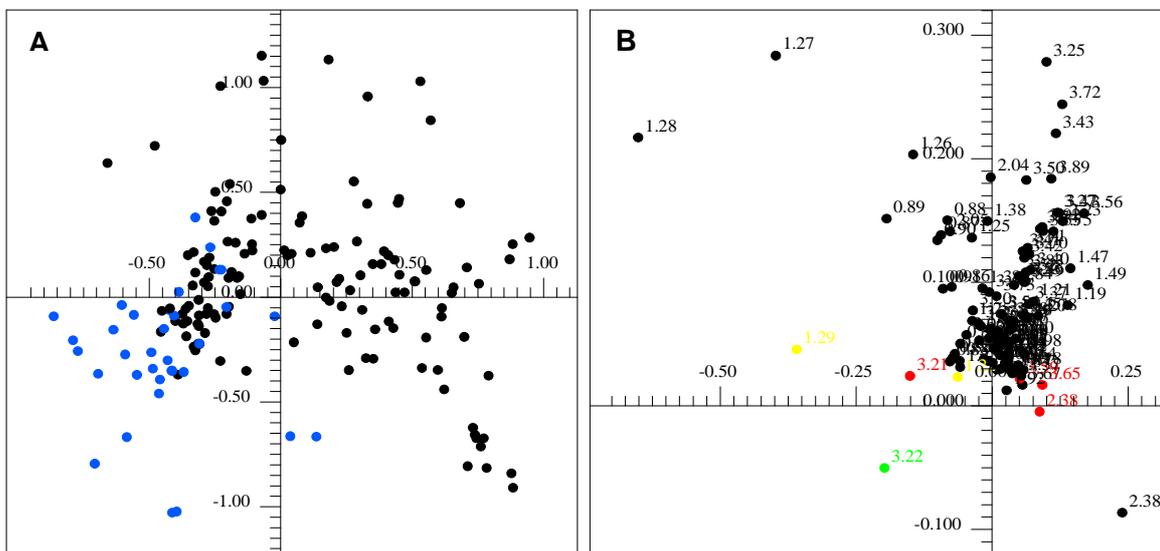
**Figura 19:** (A) Gráfico de escores de PC1 (40,4%) versus PC2 (20,7%) referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (*noesypr1d* – região de  $\delta$  0,4 a 9,0) das amostras A1 de

pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (azul). (B) Gráfico de *X-loadings* de PC1 versus PC2. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto.

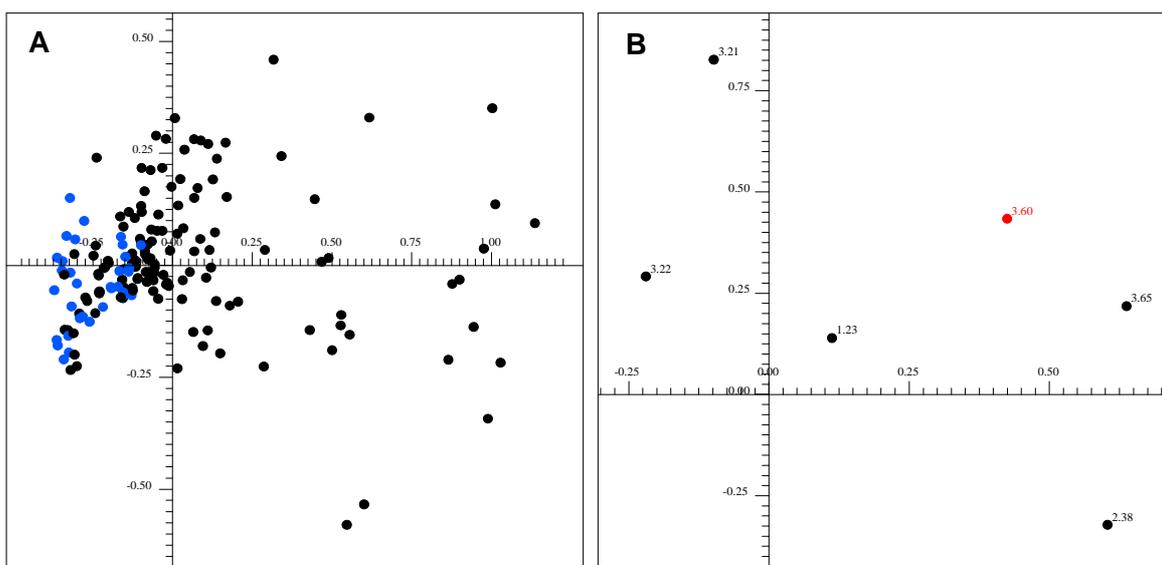


**Figura 20:** (A) Gráfico de escores de PC1 (87,8%) versus PC2 (4,12%) referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (*noesypr1d* – região de  $\delta$  0,4 a 9,0) das amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (azul) considerando apenas as regiões dos *buckets* significantes da análise anterior. (B) Gráfico de *X-loadings*

de PC1 versus PC2. *Buckets* considerados como significantes (valor- $p <$  valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor- $p$ : azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto.



**Figura 21:** (A) Gráfico de escores de PC1 (49,9%) versus PC2 (11,1%) referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (*cpmgpr1d* – região de  $\delta$  0,4 a 4,0) das amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (azul). (B) Gráfico de X-loadings de PC1 versus PC2. *Buckets* considerados como significantes (valor- $p <$  valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor- $p$ : azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto.



**Figura 22:** (A) Gráfico de escores de PC1 (49,7%) versus PC2 (14,9%) referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (*cpmgpr1d* – região de  $\delta$  0,4 a 4,0) das amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (azul) considerando

apenas *buckets* significantes da análise anterior. (B) Gráfico de *X-loadings* de PC1 versus PC2. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho.

*Buckets* não significantes são apresentados em preto.

Alguns trabalhos já foram publicados na literatura relatando o uso desta análise estatística de significância utilizando o programa AMIX. Por exemplo, Watanabe e colaboradores (2012) fizeram uso desta ferramenta na análise por PCA de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de meios de culturas de células pancreáticas humanas e cancerígenas. Neste, os autores identificaram os metabólitos que sofreram alterações com base nos dados de análise de significância juntamente com dados obtidos da comparação das intensidades médias dos sinais dos metabólitos de cada grupo. Analisando os dados apresentados, nota-se que nem todos os metabólitos cujos sinais sofreram alterações nas intensidades entre os espectros de diferentes culturas foram considerados significantes, ainda assim os autores consideraram estes metabólitos na diferenciação entre células não cancerígenas e cancerígenas. Já Roomick-Rosendale e colaboradores (2011) também aplicaram a análise estatística de significância às análises por PCA, resultando apenas em poucos *buckets* significantes, cujos metabólitos correspondentes foram destacados pelos autores sem se levar em consideração os demais *buckets* não considerados significantes. Porém, na conclusão do trabalho os autores destacam que os metabólitos destacados não são os únicos potenciais biomarcadores.

Portanto, embora a análise estatística de significância tenha sido realizada, os *buckets* não considerados como significantes também foram levados em conta nas análises dos resultados.

#### 4.1.6.2 Análises no *muma*

*Metabolomic univariate and multivariate analysis (muma)* é uma ferramenta recentemente desenvolvida para análises metabonômicas escrita na forma de pacote para o programa gratuito R. Embora permita a análise de dados obtidos por meio de diferentes técnicas analíticas, provê métodos específicos para análises metabonômicas baseadas em análises por RMN. Análises por reconhecimento de padrões, PCA, PLS-DA e OPLS-DA, podem ser facilmente realizadas no *muma*. Em especial, *muma* possui duas ferramentas, STOCSY e RANSY que podem auxiliar na atribuição de sinais de RMN ou até mesmo sugerir possíveis interações entre diferentes moléculas (Gaude *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2009). Quando se realiza a análise de OPLS-DA, também é possível realizar o STOCSY com filtro OSC (OSTOCSY) (Blaise *et al.*, 2011). Esta ferramenta permite visualizar correlações entre metabólitos em uma matriz relacionada às informações descritivas fornecidas.

Neste trabalho, nas análises em que houve discriminação entre os grupos, pelo menos parcial e observaram-se *buckets* significantes, realizou-se uma análise adicional no *muma*. Análises em que não se obteve discriminação com *buckets* significantes também não mostraram boa discriminação ao se utilizar o *muma*. Para que a tabela de dados com os valores das integrais dos *buckets* exportada do AMIX fosse lida pelo *muma* foi necessário que o método de escalamento utilizado fosse alterado para o escalamento em relação à intensidade total dos sinais, ao invés do escalamento em relação ao maior *bucket*. Antes de ser analisada no *muma*, a matriz de dados precisa ser ajustada, adicionando uma coluna com as classes de amostras em que todas as amostras de cada grupo são numeradas com o mesmo valor (Gaude *et al.*, 2013). Também os valores de deslocamento químico foram corrigidos de oito para duas casas decimais e então transformados para o formato .csv, o qual pode ser utilizado para análise no *muma*.

Ao realizar a análise por PCA e a análise univariada no *muma* há opções de escalamento, normalização em relação à intensidade total e imputação. Este último permite substituir valores que estão faltando por um valor específico, que pode ser a média dos demais valores, o valor mínimo observado, a metade do valor mínimo observado ou com zeros. Como no conjunto de dados obtidos não há valores faltando, não foi realizada a imputação. Embora ao se construir a tabela com os dados dos *buckets* já se tenha realizado o escalamento em relação à intensidade total, a análise por PCA no *muma* sem nenhum escalamento adicional não resultou em bons resultados. Assim, para cada análise tanto de PCA, PLS-DA e OPLS-DA testou-se cada um dos métodos de escalamento, que são: *pareto*, *auto*, *vast*, *range* e *medium*. O melhor resultado, ou seja, a melhor discriminação é facilmente avaliada por meio de uma listagem das cinco melhores discriminações obtidas por meio de uma ferramenta que calcula a significância estatística da separação dos grupos envolvidos para cada par de componentes principais conforme proposto por Goodpaster e Kennedy (Goodpaster e Kennedy, 2011). As melhores separações obtidas são avaliadas por meio do par de componentes principais com seu respectivo valor-*p* calculado a partir de teste estatístico F e da porcentagem total de variância explicada. Por meio desta listagem, o par de componentes principais que resulta na melhor discriminação é facilmente visualizado ou com a melhor capacidade de separação, conforme exemplificado na seção 4.1.6.3.

Quanto à normalização, embora o método de escalamento realizado no AMIX, escalamento em relação à intensidade total dos sinais, tenha um efeito de normalizar os valores das integrais dos *buckets*, a maioria das análises no *muma* foi realizada com normalização adicional, visto ter resultado em melhor discriminação, permitindo que os sinais menos intensos passem a ter maior significância. Em alguns casos, como nas

análises dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  a normalização adicional não resultou em nenhum efeito.

Quanto às análises estatísticas univariadas, *muma* permite testar a significância de cada variável individualmente entre os grupos, identificados na matriz de dados fornecida. Um ponto a ser destacado é que estas análises independem das análises multivariadas. Para as análises univariadas há opção de se utilizar a imputação e a normalização, assim como no caso das análises multivariadas. Esta função implementa a proposta de Goodpaster e col. (Goodpaster e col., 2010) de um algoritmo de árvore de decisão, no qual inicialmente é feito o teste de normalidade de Shapiro Wilk a fim de avaliar se cada variável tem ou não uma distribuição normal o que levará a decidir se deverá ser feito um teste paramétrico (teste de Welch) ou não paramétrico (teste de Wilcoxon-Mann Whitney) (Gaude e col., 2013). Estes testes resultam em valores-*p* que são corrigidos por meio da aplicação de testes múltiplos pelo método de Benjamini-Hochberg. Porém se o usuário não desejar realizar esta correção é possível anular a opção no momento da análise. De acordo com esta correção realizada é gerado um arquivo com todas variáveis significantes, cujo valor-*p* é menor que 0,05, semelhantemente ao realizado no programa AMIX.

Os resultados gerados pela análise univariada podem ser visualizados pelo gráfico denominado Volcano para cada par de grupos comparados. Neste gráfico cada variável é representada por um ponto, o qual é colorido de acordo com um limite duplo, incluindo o valor-*p* máximo de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8. Ainda para uma análise mais detalhada de cada variável e de sua variação dentro de cada grupo são providos gráficos denominados *Boxplots*. Exemplos deste gráficos são fornecidos na seção seguinte.

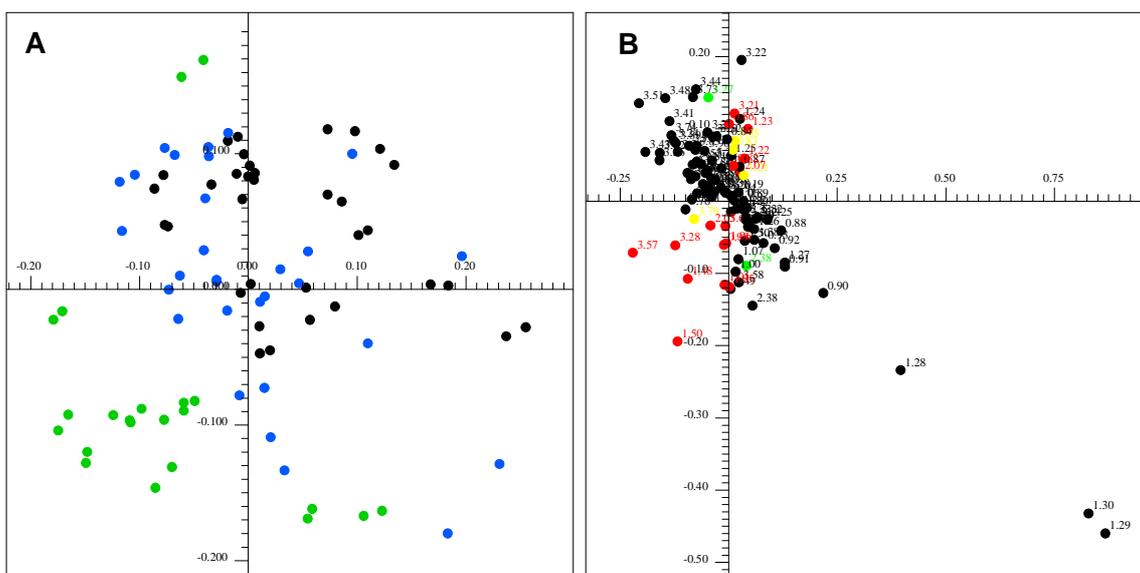
Pela revisão recente realizada, não se encontrou nenhuma utilização deste programa em artigos publicados até o momento.

#### **4.1.6.3 Comparação entre os programas AMIX e muma - Discriminação das amostras C1 versus C60 versus C180 dos pacientes de controle**

Foi avaliado se haveria discriminação entre as amostras com o passar do tempo. Para isto, compararam-se as amostras retiradas em um primeiro momento (amostras C1), após 90 (amostras C90) e 180 dias (amostras C180) por meio de análises quimiométricas. Estas análises foram primeiramente realizadas no programa AMIX e após no *muma*.

As análises realizadas no AMIX com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  apresentaram separação parcial entre as amostras C180 e as demais. A melhor separação foi para os espectros adquiridos com a sequência *noesypr1d*, utilizando o método de *bucketing*

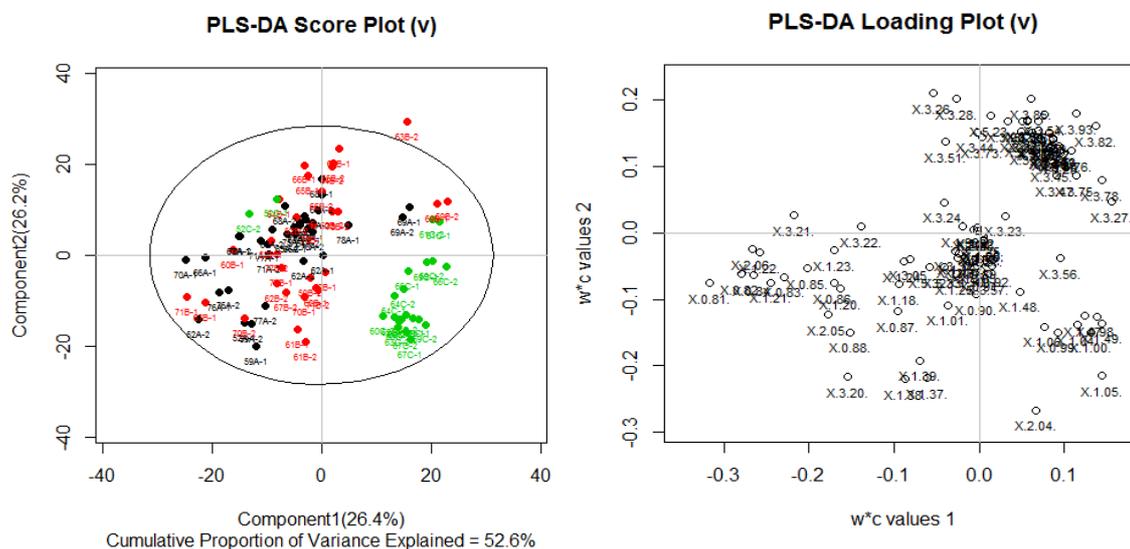
retangular e o modo especial de integração, após retirar *buckets* com menos de 5% da variância explicada (Figura 23A). O método de escalamento utilizado foi em relação à intensidade total dos sinais para que a matriz de dados também pudesse ser utilizada no *muma*. Obteve-se valor de RMSECV de 0,448 e a variância explicada em X de 89,5% e em Y de 48,1%. A primeira análise estatística de significância se deu por comparação do grupo C90 com os grupos C1 e C180. Apenas os *buckets* em  $\delta$  2,37 e 2,38 foram significantes. Após análise estatística de significância comparando as amostras C180 com as C1 e C90, obteve-se que o valor-*p* abaixo do qual os *buckets* são considerados significantes é de  $4,76 \times 10^{-4}$ . Observa-se que os sinais estatisticamente significantes foram:  $\delta$  0,81; 0,82; 0,84-0,86; 0,98; 1,00; 1,04; 1,05; 1,20-1,22; 1,47; 1,49; 2,04; 2,06; 2,38; 3,21; 3,26; 3,27; 3,56; 3,65; 3,78 (Figura 23B). Os sinais referem-se à lipídeos, valina, etanol, lactato, glicoproteína, piruvato, e açúcares  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose. Além destes, a maioria dos *buckets* nas seguintes regiões foram observados no gráfico de *X-loadings* (Figura 23B):  $\delta$  0,84-0,88; 0,99-1,00; 1,04; 1,19; 1,21-1,30; 2,04-2,07; 2,24; 2,38; 3,22-3,29; 3,42-3,58; 3,71-3,79; 3,84-3,85; 3,90-3,94; 5,25-5,26. Além dos metabólitos já citados, o sinal em  $\delta$  2,24 refere-se ao acetoacetato.



**Figura 23:** (A) Gráfico de escores de PC1 (42,1%) versus PC2 (25,8%) referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com sequência *noesypr1d* das amostras C1 (preto), C90 (azul) e C180 (verde) de pacientes de controle. (B) Gráfico de *X-loadings* correspondente. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto.

Para confirmar esta discriminação, bem como obter informações mais precisas, os *buckets* gerados no programa AMIX foram exportados para o *muma* e a análise foi

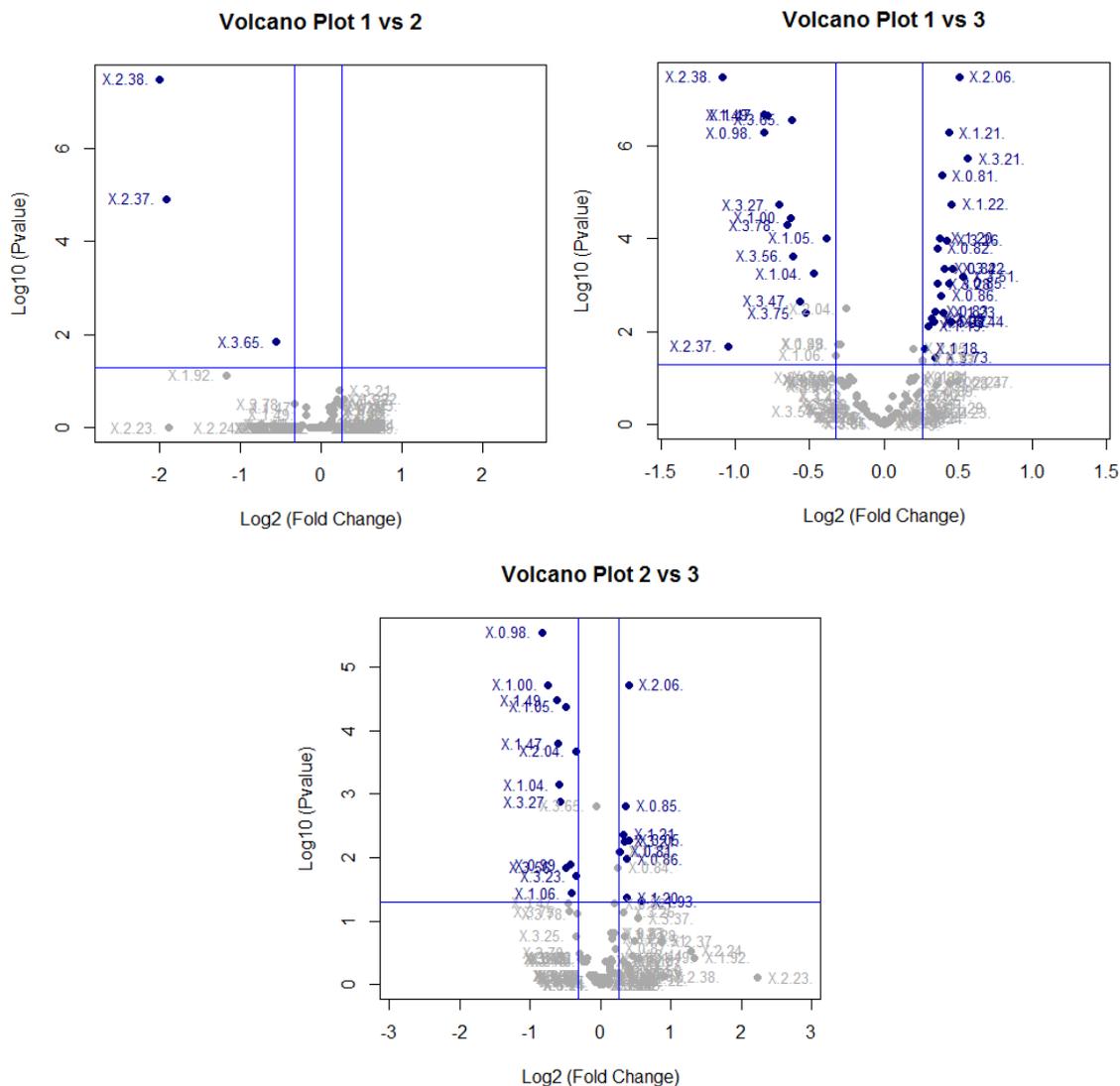
realizada para cada um dos métodos de escalamento disponíveis, com e sem normalização e sem a opção imputação. Os gráficos de PLS-DA mostraram discriminação superior à observada na análise no AMIX (Figura 24), enquanto as análises de PCA mostraram discriminação muito baixa.



**Figura 24:** (A) Gráfico de escores da componente 1 (26,4%) versus componente 2 (26,2%) referentes aos espectros de RMN de <sup>1</sup>H obtidos com sequência *noesypr1d* das amostras C1 (preto), C90 (vermelho) e C180 (verde) de pacientes de controle. O círculo representa a elipse de confiança um nível de 95%. (B) Gráfico de *X-loadings* correspondente.

Os *buckets* considerados nas análises no *muma* foram:  $\delta$  0,81-0,92; 0,98-1,01; 1,04-1,06; 1,17-1,29; 1,37-1,39; 1,47-50; 1,92; 2,04-2,06; 2,22-2,25; 2,37; 2,38; 3,05; 3,22-3,28; 3,37; 3,39-3,57; 3,65; 3,67; 3,70-3,79; 3,82-3,87; 3,90; 3,92; 3,93; 5,23-5,25; 5,32; 5,33. A análise univariada revelou claramente os *buckets* que mais sofreram alterações entre os grupos, conforme observado nos gráficos Volcano para cada comparação (Figura 25). Nos três primeiros meses as alterações foram pequenas, conforme mostra a comparação entre os períodos C1 e C90 (grupos 1 e 2). Os únicos *buckets* significantes foram  $\delta$  2,37 e 2,38, referentes ao piruvato, e  $\delta$  3,65 que está numa região de sobreposição de sinais, podendo se referir ao etanol ou isoleucina. Passados os próximos três meses, muitas alterações foram observadas. Entre os grupos C90 e C180 (2 e 3), percebe-se um grande número de *buckets* sendo significantes, incluindo:  $\delta$  0,81; 0,84-0,86; 0,98-1,00; 1,04-1,06; 1,20-1,22; 1,47; 1,49; 1,93; 2,04; 2,06; 3,05; 3,21; 3,23; 3,27; 3,56; 3,65. O número de *buckets* significantes aumentou ainda mais para a análise entre os grupos A e C:  $\delta$  0,81-0,87; 0,98-1,00; 1,04-1,06; 1,18-1,23; 1,47-1,49; 1,93; 2,04-2,06; 2,37; 2,38; 3,05; 3,21; 3,22; 3,26-3,28; 3,44; 3,47; 3,51; 3,56; 3,65; 3,73;

3,75; 3,78; 5,32; 5,33. Estes incluem os seguintes metabólitos: lipídeos e lipoproteínas, valina, etanol, alanina, acetato, glicoproteína, piruvato, creatinina, colina,  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose. Em sua maior parte estes sinais são similares aos observados na análise no AMIX. No entanto, especialmente na comparação entre os grupos C1 e C180 o número de *buckets* significantes foi maior que o observado para a análise no AMIX, visto que no *muma* é possível fazer a análise de significância entre cada par de grupos.



**Figura 25:** Gráficos Volcano das comparações entre os grupos 1 (amostras C1) e 2 (amostras C90), grupos 1 e 3 (amostras C180) e grupos 2 e 3, respectivamente. Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas.

Além destes sinais, os *buckets* em  $\delta$  7,76 e 8,46 mostraram-se significantes ao considerar a região  $\delta$  6,0-9,0 sem excluir sinais com baixa significância ao se comparar

os grupos B e C, e apenas o *bucket* em  $\delta$  8,46 na comparação entre os grupos A e C. Estes sinais se referem à histidina e formato.

Estas observações indicam que ocorrem alterações no perfil sérico ao longo do tempo independentemente da presença de patologias. Estas podem ocorrer por fatores ambientais, tais como, mudanças no clima, e por mudanças na alimentação. Este resultado será levado em consideração nas análises seguintes, especialmente envolvendo as amostras coletadas ao longo do tempo, por não estar correlacionado à ocorrência do AVEi.

Comparando os dois programas, nota-se que ambos resultaram em discriminação e variáveis significantes similares. O programa AMIX permite criar tabelas de *buckets*, o que facilita a análise por RMN, e a matriz de dados é facilmente gerada apenas estabelecendo-se os parâmetros desejados e escolhendo-se os espectros que compõem cada grupo. Também apresenta alternativas de métodos de *bucketing*, escalamento e integração. Quanto às ferramentas disponíveis, permite a realização de análises por PCA e PLS-DA, além de criar modelos de classificação por SIMCA e/ou PLS-DA. As análises por PCA fornecem gráficos que facilitam a visualização de possíveis amostras anômalas e fornecer linhas que delimitam os grupos de acordo com o nível de confiança estabelecido, o que não é possível ser feito nas análises por PLS-DA. Ainda permitem a fácil determinação das variáveis significantes por meio de análise estatística de significância a partir dos gráficos de *loadings*.

Por sua vez, o *muma* não possui ferramentas que permitam a criação de tabelas de *buckets*, exigindo que se utilize outro programa e se exporte a matriz de dados, caso seja essa a opção desejada para a análise. Ao se exportar os dados são necessários diversos cuidados ao se ajustar a matriz para ser corretamente lida no *muma*, como a adição de uma coluna em que cada amostra é identificada com um valor correspondente ao grupo que pertence. É também necessário ajustar os nomes das amostras e das variáveis de forma que sejam facilmente visualizadas nos gráficos de escores e *loadings*. Após isto a matriz deve ser transformada para o formato .csv. Portanto, o AMIX é muito mais prático e rápido na criação da matriz de dados. No entanto, o *muma* fornece mais opções de escalamento, além de permitir a normalização e imputação. Os gráficos gerados são armazenados em diretórios criados, podendo ser acessados independentemente do programa, ao contrário do que ocorre no AMIX, no qual sempre é necessária a utilização do programa para ter acesso aos gráficos. Além das análises por PCA e PLS-DA, o *muma* também permite a realização de OPLS-DA quando apenas dois grupos são comparados, pois se mais de dois grupos são incluídos os resultados não são estatisticamente confiáveis (Gaude *et al.*, 2013). Em todas estas análises é possível observar linhas de nível de confiança de 95%. Ainda há a possibilidade de realizar

análises univariadas que permitem a clara visualização das variáveis significantes por meio dos gráficos Volcano e *Boxplot*, bem como dos testes realizados e da forma como as variáveis sofreram alterações entre os grupos. Também permite a fácil realização de experimentos que auxiliam na identificação dos sinais, sendo estes STOCYSY e RANSY, ao passo que o AMIX permite a realização do STOCYSY e hetero-STOCYSY.

Uma grande vantagem do *muma* é a análise quantitativa das separações (Goodpaster, 2011), enquanto no AMIX esta deve ser realizada apenas por meio visual. Por exemplo, nas análises realizadas no caso aqui considerado, se realizaram as análises para cada tipo de escalamento com e sem normalização. A avaliação da melhor discriminação pode ser feita por meio da listagem das cinco melhores discriminações obtidas em cada caso com seus respectivos valores-*p*, que serve como medida da capacidade de separação, e da proporção de variância explicada pelo par de PCs considerado. No entanto, não há como se afirmar se a discriminação é ou não significativa, visto não fornecer os valores do teste F conforme proposto por Goodpaster e Kennedy (Goodpaster e Kennedy, 2011). O resultado é apresentado na Tabela 5.

Por meio das informações obtidas na Tabela 5 pode-se avaliar a melhor discriminação levando em consideração as informações em conjunto. Por exemplo, o menor valor-*p* obtido foi para a análise entre PC4 *versus* PC30 sem escalamento e sem normalização, de 0,000131, porém percebe-se que a variância explicada é muito pequena, apenas 4,8%, o que indica que ruído espectral foi incluído. Portanto, neste caso considerou-se que a melhor discriminação foi obtida para análise com escalamento *vaste* para PC2 *versus* PC6, cujo valor-*p* foi de 0,000830 e a variância total de 27,0%. Esta análise também auxilia nas análises por PLS-DA e OPLS-DA, pois como estas são realizadas a partir das análises por PCA o melhor resultado será com o mesmo método de escalamento, conforme se observa na Figura 24.

Um grande atrativo do *muma* é o fato de ser gratuito, além de possuir um grande número de ferramentas facilmente utilizadas mesmo por aqueles que não possuem grande conhecimento do programa R (Gaude *et al.*, 2013). No entanto, o *muma* ainda não apresenta ferramentas que permitam o desenvolvimento de modelos de classificação de novas amostras.

Como o *muma* foi criado recentemente, as análises quimiométricas já haviam sido iniciadas no programa AMIX e foram concluídas no mesmo. Apenas nos casos em que se necessitou de uma análise mais detalhada, o *muma* foi utilizado.

**Tabela 5:** Listagem dos cinco melhores discriminações para cada tipo de escalamento com e sem normalização, incluindo os pares de componentes principais com seus respectivos valores-p e porcentagem de variância explicada.

Escalamento	Com normalização			Sem normalização		
	Par de PCs	Soma de valores-p (estatística F)	Variância (%)	Par de PCs	Soma de valores-p (estatística F)	Variância (%)
Pareto	3 vs 4	0,002833	19,6	3 vs 4	0,001233	19,7
	4 vs 6	0,003069	11,7	4 vs 6	0,001553	11,7
	4 vs 6	0,028585	12,6	4 vs 37	0,007425	8,1
	2 vs 4	0,035822	24,0	2 vs 4	0,007459	24,8
	6 vs 12	0,042542	4,4	4 vs 5	0,009965	12,6
Auto	5 vs 52	0,008645	4,1	5 vs 6	0,024351	8,2
	5 vs 56	0,012856	4,1	2 vs 4	0,040432	22,5
	5 vs 8	0,013134	5,8	3 vs 4	0,043737	14,7
	2 vs 8	0,016640	17,1	4 vs 6	0,052027	9,4
	5 vs 53	0,019154	4,2	2 vs 6	0,052487	20,5
Vaste	<b>2 vs 6</b>	<b>0,007111</b>	<b>20,3</b>	<b>2 vs 6</b>	<b>0,000830</b>	<b>27,0</b>
	2 vs 9	0,012858	19,6	3 vs 6	0,001488	12,7
	3 vs 6	0,013932	11,3	4 vs 6	0,013472	8,9
	3 vs 33	0,015146	18,5	2 vs 49	0,021305	23,9
	3 vs 9	0,016451	10,6	3 vs 49	0,048345	9,6
Range	2 vs 52	0,015740	15,7	3 vs 5	0,012161	12,5
	3 vs 52	0,026817	9,1	3 vs 6	0,018589	11,8
	5 vs 16	0,035494	4,3	2 vs 5	0,023011	21,4
	2 vs 33	0,037185	15,8	2 vs 6	0,028908	20,7
	4 vs 5	0,037197	8,1	3 vs 15	0,034403	9,4
Medium	3 vs 9	0,001650	3,4	5 vs 8	0,000165	0,0
	2 vs 9	0,019564	12,0	3 vs 8	0,002835	0,0
	3 vs 10	0,022581	3,3	4 vs 8	0,007842	0,0
	9 vs 10	0,034769	0,5	7 vs 8	0,010524	0,0
	2 vs 48	0,054956	3,1	5 vs 53	0,016933	0,0
Sem escalamento	4 vs 30	0,000220	5,6	4 vs 30	0,000131	4,8
	4 vs 17	0,000240	5,8	4 vs 12	0,000142	5,3
	4 vs 20	0,000414	5,7	4 vs 36	0,000234	4,8
	4 vs 25	0,000461	5,7	4 vs 50	0,000235	4,8
	4 vs 46	0,000470	5,6	4 vs 21	0,000240	4,9

#### 4.1.6.4 Discriminação entre amostras de paciente de acordo com sexo

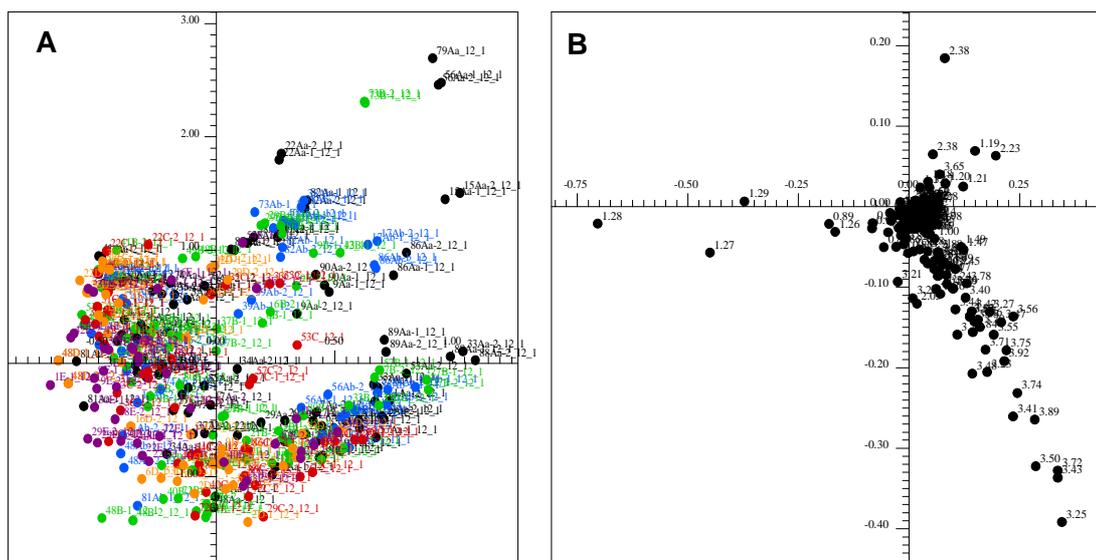
Outro fator avaliado foi se haveria algum tipo de discriminação de acordo com o sexo do paciente. Não se observou discriminação significativa para nenhum dos experimentos realizados, seja com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ou de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ . Desta forma, este fator não estará influenciando na discriminação.

#### 4.1.6.5 Discriminação entre amostras de pacientes que sofreram AVEi ao longo do tempo

O AVEi dá início a uma generalizada série de eventos que ocorrem a partir da isquemia cerebral, denominada cascata isquêmica, iniciando com hipoperfusão cerebral repentina ou gradual e incluindo falha celular bioenergética, excitotoxicidade, estresse

oxidativo, dano microvascular, ativação hemostática seguida por inflamação isquêmica, disfunção da barreira sangue-cérebro, ou barreira hematoencefálica, e por fim, eventual necrose de células gliais, neuronais e endoteliais (Heyndrickx *et al.*, 1978; Saenger e Christenson, 2010). Estes eventos podem se dar após minutos ou até dias após o AVEi, sendo que o tempo de ocorrência de cada evento varia de acordo com vários fatores, como tamanho do infarto, tamanho e duração da isquemia e eficácia da reperfusão. Também a disfunção da barreira sangue-cérebro parece ocorrer em duas fases, nas primeiras 24 horas a barreira apresenta maior permeabilidade e após 48 a 72 horas ocorrem danos adicionais (Saenger e Christenson, 2010). Biomarcadores referentes à barreira sangue-cérebro apresentam diversas limitações para serem utilizados como marcadores do AVEi. Um destes fatores é o fato destes marcadores não serem específicos do AVEi, visto que muitos processos podem causar dano ao tecido cerebral. Além disso, a liberação destes marcadores pela barreira para a corrente sanguínea é restrita, varia de pessoa para pessoa e a localização anatômica influencia no impacto clínico que causará. Portanto, as concentrações dos biomarcadores podem não se correlacionar com o tamanho do enfarte ou com a severidade do AVEi. (Jickling *et al.*, 2011).

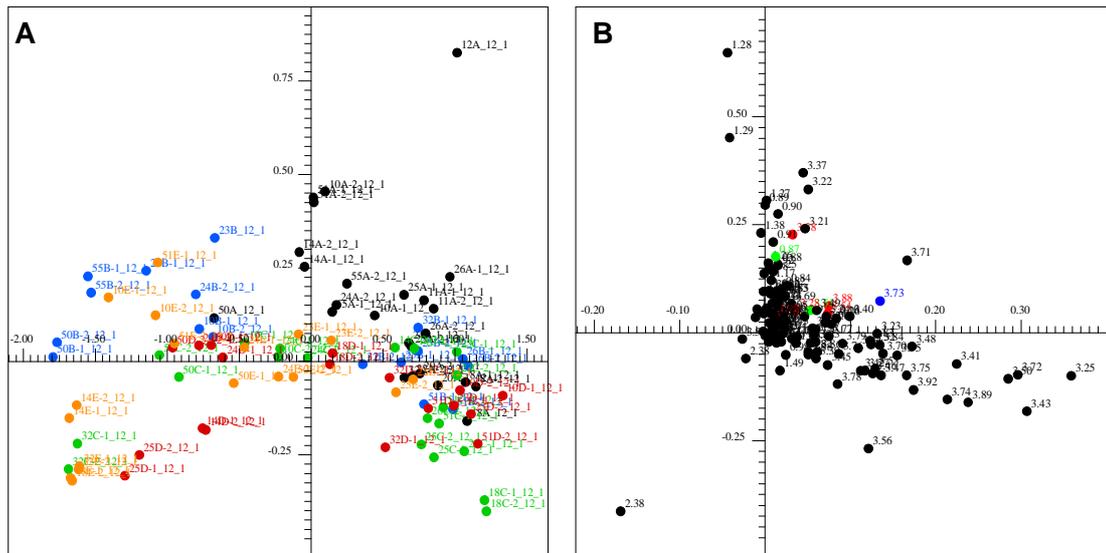
Na busca por possíveis biomarcadores da ocorrência e progressão do AVEi, realizou-se uma análise conjunta incluindo todos os períodos de coleta do soro (A1, A1t, A7, A30, A90 e A180) e não se observou discriminação independente do espectro utilizado, da região utilizada ou do tipo de pré-processamento, conforme exemplificado na Figura 26 em que se utilizaram os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* considerando a região de  $\delta$  0,4 a 4,0. Destaca-se que neste caso não se observou discriminação do período equivalente a seis meses de coleta, seguindo o padrão apresentado para as amostras de controle.



**Figura 26:** (A) Gráfico de escores de PC1 (49,1%) versus PC2 (17,0%) discriminando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A1 (preto), A1t (azul), A7 (verde), A30 (vermelho), A90 (laranja) e A180 (roxo) obtidos com sequência *cpmgpr1d* da região  $\delta$  0,4 a 4,0. (B) Gráfico de *X-loadings* correspondente. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto.

Em uma tentativa de perceber alguma alteração causada pela administração do trombolítico, realizaram-se análises por PLS-DA incluindo apenas as amostras coletadas nas primeiras 24 horas antes (amostras A1) e após (amostras A1t) a administração do trombolítico. No entanto, continuou a não se observar discriminação em nenhuma das análises. Portanto, não se observou efeito significativo em níveis séricos após o tratamento trombolítico.

Análises similares foram realizadas para as amostras dos pacientes que não receberam o tratamento trombolítico (não-trombólise), e neste caso observou-se potencial de discriminação entre os grupos de acordo com o período da coleta do soro no caso de algumas análises, conforme ilustrado na Figura 27 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* considerando a região de  $\delta$  0,4 a 4,0. Portanto foram realizadas as análises separadamente para cada período versus as amostras A1. Os resultados para as análises nas quais se observou discriminação são apresentadas na Tabela 6, juntamente dos *buckets* apresentados em cada uma delas. Observou-se discriminação parcial para os períodos A30, A90 e A180, porém não para o A7. Também em nenhum dos casos foi observada discriminação para as análises com os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ .



**Figura 27:** (A) Gráfico de escores de PC1 (54,0%) versus PC2 (20,6%) discriminando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A1 (preto), A7 (azul), A30 (verde), A90 (vermelho) e A180 (laranja) obtidos com sequência *cpmgpr1d* da região  $\delta$  0,4 a 4,0. (B) Gráfico de *X-loadings* correspondente. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto.

**Tabela 6:** Resultados para as análises das amostras ao longo do tempo nas quais se observou discriminação juntamente dos *buckets* apresentados em cada uma delas e os metabólitos correspondentes.

Grupos	Espectros utilizados	Região utilizada	Pré-processamento	RMSECV	Var. Mín. (%)	Var. em X (%)	Var. em Y (%)	Var. em PC1 (%)	Var. em PC2 (%)	Valor-α de Bonferroni corrigido	<i>Buckets</i> observados nos gráficos de X-loadings (ppm) <sup>4</sup>	Metabólitos Identificados <sup>5</sup>
Todos	<i>cpmgpr1d</i>	0,4-4,0	SIM <sup>1</sup>	0,770	10	87,0	46,7	54,0	20,7	3,94x10 <sup>-4</sup>	0,81- <b>0,87</b> ; 0,88-0,92; 0,94-1,06; 1,16-1,29; 1,37-1,39; 1,47-1,50; <b>1,92</b> ; 2,03-2,06; 2,08; 2,14; 2,23; 2,34; 2,36-2,38; 2,45; 2,46; 3,04; 3,05; 3,19- <b>3,28</b> ; 3,36- <b>3,38</b> ; 3,39- <b>3,51</b> ; 3,52- <b>3,54</b> ; 3,55-3,57; 3,59-3,62; 3,65; 3,67; 3,69- <b>3,73</b> ; 3,74- <b>3,88</b> ; 3,89-3,93; 3,97; 3,98	Colesterol; <b>lipídeos</b> e lipoproteínas; valina; isoleucina; leucina; etanol; alanina; <b>acetato</b> ; glutamina; glicoproteína; acetoacetato; piruvato; creatinina; colina; <b>α e β-glucose</b>
	<i>cpmgpr1d</i>	0,4-4,0	SAI <sup>2</sup>	0,837	10	95,7	39,0	74,3	14,7	3,52x10 <sup>-4</sup>	0,81- <b>0,89</b> ; 0,90-1,00; 1,04; 1,05; 1,16-1,29; 1,37; 1,38; 1,47-1,50; 1,97-2,14; 2,23; 2,34; 2,36-2,38; 2,45; 2,46; 2,72; 3,03-3,05; 3,19-3,28; 3,36; 3,38-3,50; 3,52-3,98	Colesterol; <b>lipídeos</b> e lipoproteínas; valina; isoleucina; leucina; etanol; alanina; acetato; glutamina; glicoproteína; acetoacetato; piruvato; creatinina; colina; α e β-glucose

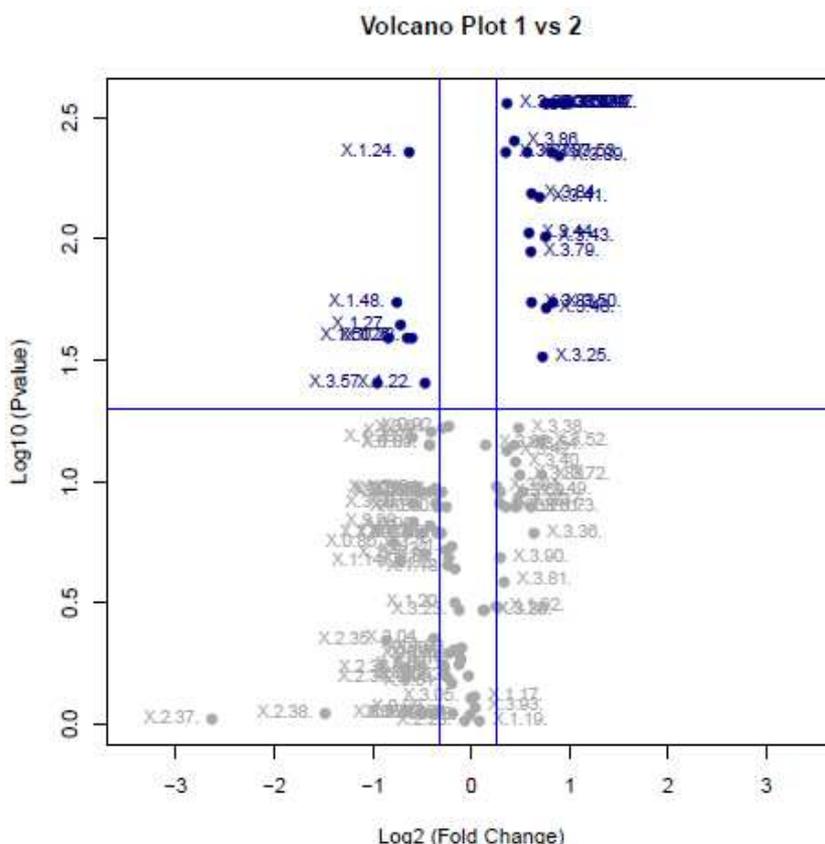
A1 x A30	<i>cpmgpr1d</i>	0,4-4,0	SIM	0,171	10	78,0	60,7	44,5	22,7	4,03x10 <sup>-4</sup>	0,80- <b>0,93</b> ; 0,94- <b>0,97</b> ; 0,98-1,01; 1,03-1,06; 1,16; <b>1,17</b> -1,29; 1,37-1,40; 1,47-1,50; <b>1,92</b> ; 2,03-2,06; 2,08; 2,14; 2,23; 2,34; 2,36-2,38; 2,45; 3,04; 3,05; 3,19-3,28; 3,36- <b>3,38</b> ; 3,39-3,57; 3,59-3,62; 3,65; 3,69-3,93	Colesterol; lipídeos e lipoproteínas; valina; <b>isoleucina</b> ; <b>leucina</b> ; etanol; alanina; <b>acetato</b> ; glutamina; glicoproteína; acetoacetato; piruvato; creatinina; colina; $\alpha$ e $\beta$ - <b>glucose</b> e <b>composto não identificado</b>
	<i>cpmgpr1d</i>	0,4-4,0	ADV <sup>3</sup>	0,332	10	75,7	24,1	55,2	18,0	8,62x10 <sup>-4</sup>	0,85-0,87; 0,89; 0,91; 0,92; 1,21; 1,24; 1,25; 1,28; 1,47; 1,49; 1,99- <b>2,05</b> ; 2,07; <b>2,08</b> ; 3,22; 3,23; 3,25-3,27; 3,37; 3,38; 3,40-3,56; 3,67; 3,71-3,79; 3,82-3,93	Lipídeos e lipoproteínas; valina; alanina; <b>glicoproteína</b> ; acetoacetato; colina; $\alpha$ e $\beta$ - <b>glucose</b> e <b>composto não identificado</b>
A1 x A90	<i>cpmgpr1d</i>	0,4-4,0	SIM	0,027	10	92,2	77,6	39,6	22,4	3,68x10 <sup>-4</sup>	0,80-1,06; 1,16-1,29; 1,37-1,40; 1,47-1,50; 1,92; 2,03-2,08; 2,14; 2,15; 2,23; 2,34; 2,36-2,38; 2,45; 2,46; 2,68; 3,04; 3,05; 3,19-3,28; 3,36- <b>3,54</b> ; 3,55-3,99	Colesterol; lipídeos e lipoproteínas; valina; isoleucina; leucina; etanol; alanina; acetato; glutamina; glicoproteína; acetoacetato; piruvato; creatinina; colina; $\alpha$ e $\beta$ - <b>glucose</b>
A1 x A180	<i>cpmgpr1d</i>	0,4-4,0	SIM	0,020	10	94,0	70,2	50,4	19,5	4,06x10 <sup>-4</sup>	0,80-0,93; 0,96-1,06; 1,16-1,29; 1,37-1,40; 1,47-	Colesterol; lipídeos e lipoproteínas; valina; isoleucina;

											1,50; 1,92; 2,03-2,08; 2,14; 2,23; 2,34; 2,36-2,38; 3,04; 3,05; 3,19- <b>3,23</b> ; 3,24; 3,25; <b>3,26-3,28</b> ; 3,36; <b>3,37-3,55</b> ; 3,56- <b>3,60</b> ; 3,61; 3,65; 3,69; <b>3,70-3,72</b> ; 3,73; <b>3,74-3,79</b> ; 3,80; <b>3,81-3,87</b> ; 3,88; <b>3,89</b> ; 3,90; <b>3,91-3,93</b> ; 3,97; 3,98	leucina; etanol; alanina; acetato; glutamina; glicoproteína; acetoacetato; piruvato; creatinina; colina; <b>α e β-glucose</b>
	<i>cpmgpr1d</i>	0,4-4,0	SAI	0,200	15	95,0	38,4	74,0	16,1	4,55x10 <sup>-4</sup>	0,81-1,00; 1,16-1,27; 1,29; 1,37; 1,47-1,49; 1,98-2,09; 2,23; 2,36-2,38; 3,20- <b>3,25</b> ; 3,26; 3,27; 3,36; 3,39; <b>3,40-3,46</b> ; 3,47; <b>3,48</b> ; 3,49-3,51; <b>3,52-3,55</b> ; 3,56-3,60; 3,65-3,69; <b>3,70-3,75</b> ; 3,76- <b>3,79</b> ; 3,80; 3,81; <b>3,82-3,84</b> ; 3,85; <b>3,86</b> ; 3,87- <b>3,89</b> ; 3,90-3,93	Colesterol; lipídeos e lipoproteínas; valina; isoleucina; leucina; etanol; alanina; acetato; glutamina; glicoproteína; acetoacetato; piruvato; creatinina; colina; <b>α e β-glucose</b>
	<i>cpmgpr1d</i>	0,4-4,0	ADV	0,272	15	78,8	32,2	58,6	16,9	5,62x10 <sup>-4</sup>	0,85-0,89; 0,91-1,00; 1,17-1,21; 1,25; 1,26; 1,28; 1,37; 1,38; 1,48; 1,49; 1,57-1,60; 1,98-2,08; 2,22; 2,23; 2,25; 2,38; 3,05; 3,21-3,29;	Lipídeos e lipoproteínas; isoleucina; leucina; etanol; alanina; glicoproteína; acetoacetato; piruvato; creatinina; colina; α

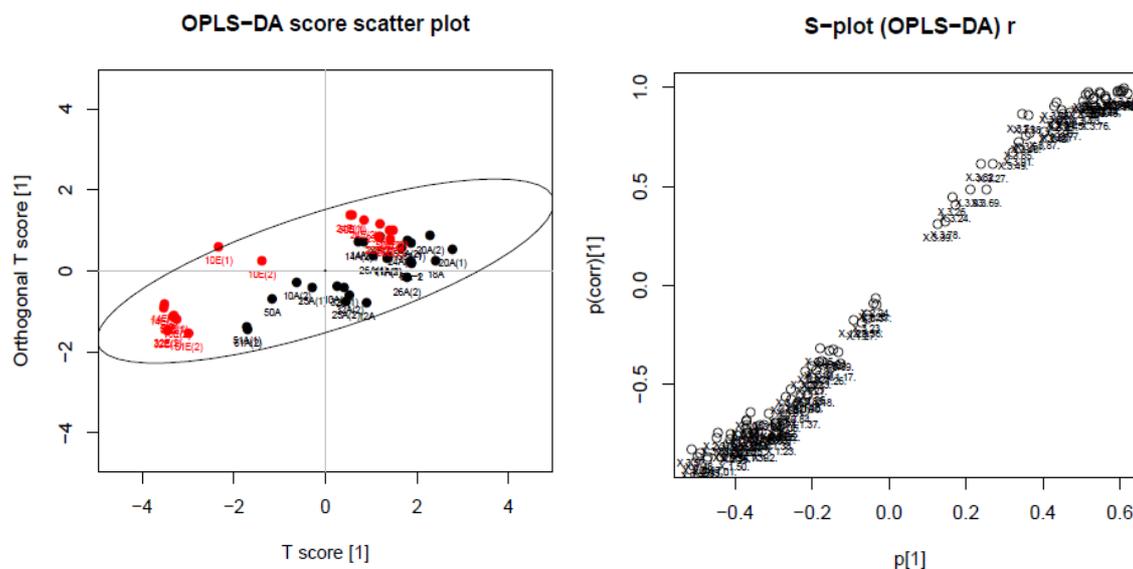
											<b>3,37</b> ; 3,38; 3,40-3,50; 3,53-3,56; 3,59-3,62; 3,66-3,79; 3,92-3,93	<b>e <math>\beta</math>-glucose</b>
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	-------------------------------------

<sup>1</sup>Modo especial de integração, utilizado com o modo retangular de construção dos *buckets*. <sup>2</sup>Soma das intensidades absolutas, utilizado com o modo retangular de construção dos *buckets*. <sup>3</sup>Modo avançado de construção dos *buckets*. <sup>4</sup>Em negrito *buckets* significantes (valor de P < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido). <sup>4</sup>Em negrito metabólitos referentes aos *buckets* significantes.

Todos os conjuntos construídos com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* considerando a região de  $\delta$  0,4 a 4,0 com modo especial de integração foram submetidos à análise no programa *muma*, sendo que para tanto o escalamento foi alterado para soma das intensidades totais e considerou-se *buckets* com no mínimo 5% de variância. Observou-se discriminação satisfatória acompanhada de *buckets* significantes apenas no caso da análise das amostras A versus E. O melhor resultado foi para o método de escalamento *range* em que PC1 versus PC4, o qual obteve valor-*p* calculado da estatística F de  $7,23 \times 10^{-3}$  e variância explicada total de 62,5%. O gráfico Volcano (Figura 28), gerado pela análise univariada, mostra que as variáveis significantes, em azul, foram:  $\delta$  1,22-1,24; 1,26; 1,27; 1,48; 1,50; 3,25; 3,27; 3,41; 3,43-3,48; 3,50; 3,53; 3,55; 3,57; 3,70; 3,17; 3,74; 3,75; 3,79; 3,83-3,87; 3,89; 3,92. Comparando com o resultado obtido no programa AMIX, percebe-se que além dos sinais referentes à  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose, também nota-se sinais significantes referentes à lipídeos e VLDL e alanina. O gráfico de OPLS-DA também é apresentado na Figura 29 mostrando a discriminação entre os dois grupos.



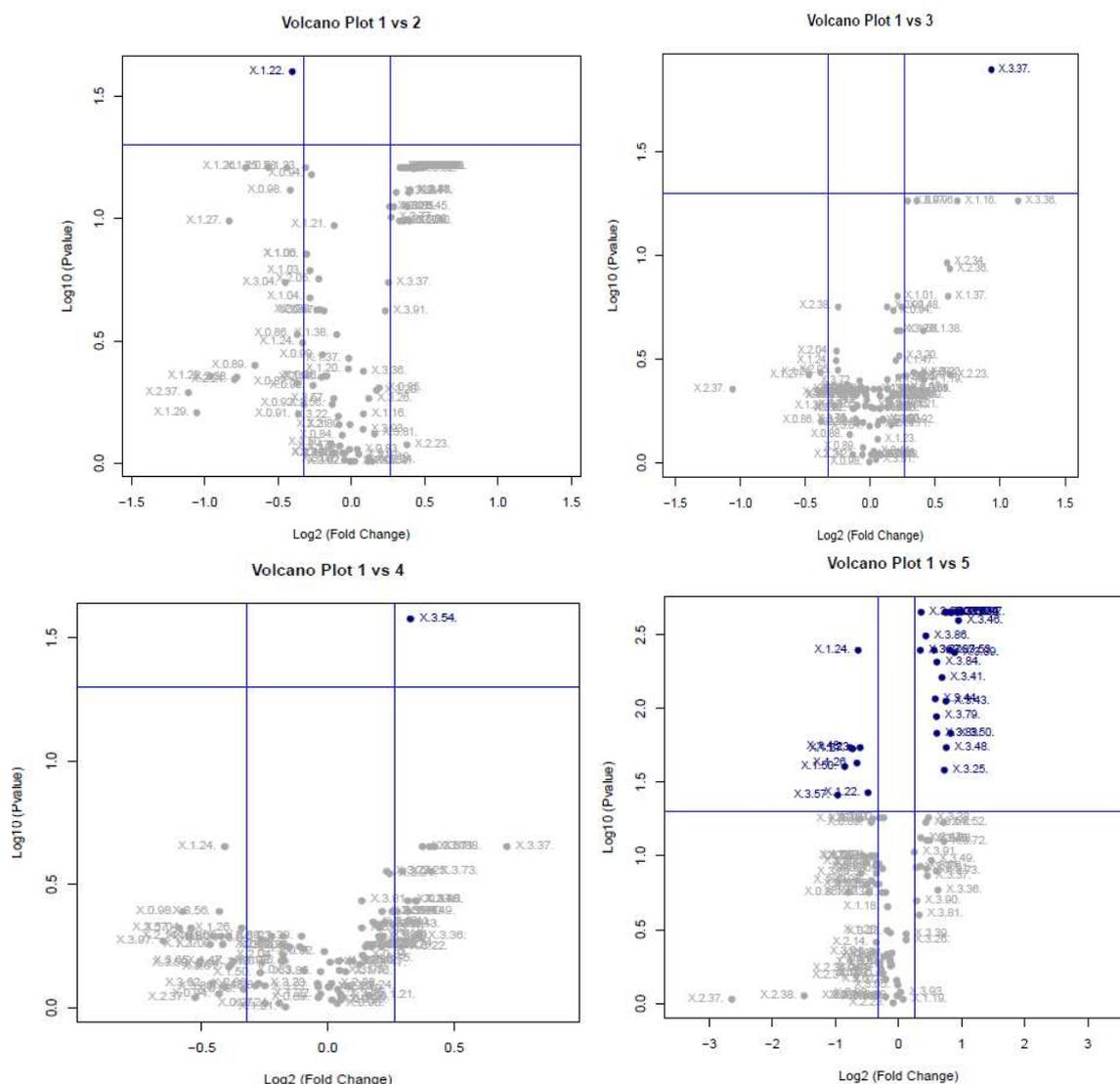
**Figura 28:** Gráfico Volcano das comparações entre os grupos 1 (amostras A1) e 2 (amostras A180). Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de *p* de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas.



**Figura 29:** (A) Gráfico de escores da componente 1 *versus* componente 2 referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com sequência *cpmgrp1d* das amostras A1 (preto) e A180 (vermelho) de pacientes não-trombólise. O círculo representa a elipse de confiança um nível de 95%. (B) Gráfico de *X-loadings* (*S-plot*) correspondente.

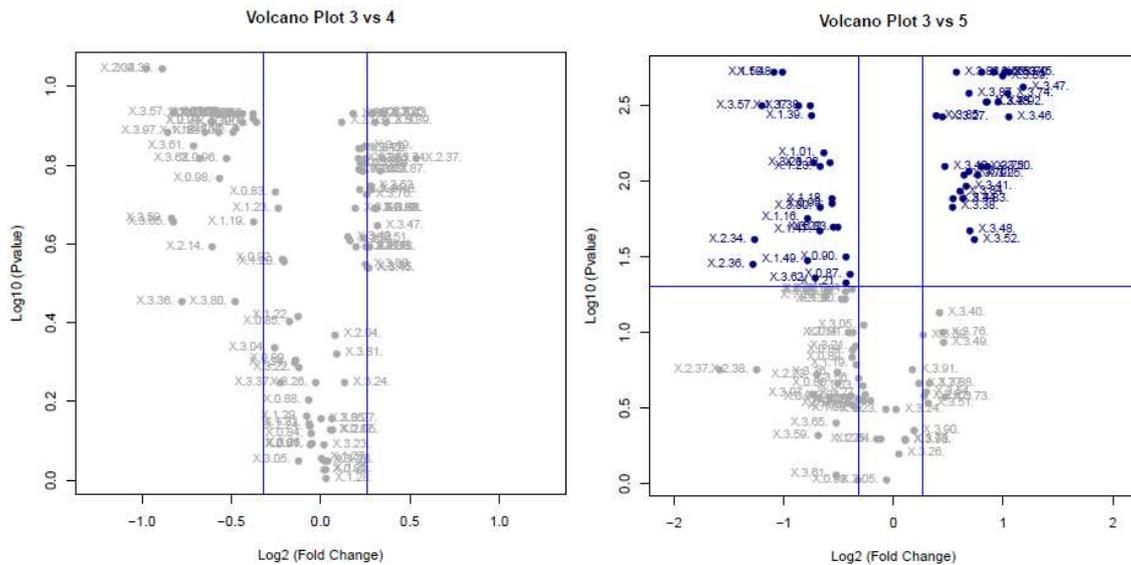
A análise considerando os espectros de todos os períodos resultou em pequena discriminação entre os grupos, sendo o melhor resultado obtido para PC1 *versus* PC7, com método de escalamento *vast* cujo valor-*p* calculado da estatística F foi de 0,43 e variância explicada total de 54,0%. Porém a análise univariada revelou *buckets* significantes para comparação entre diversos grupos (Figura 30 a 33). Como se percebe nas Figuras 30 a 33, os grupos que tiveram maior número de *buckets* significantes na comparação entre os grupos foram: grupos A1 e A180 (1 e 5), grupos A1 e A30 (2 e 3) e grupos A30 e A180 (3 e 5). Enquanto os grupos A1 e A30 tiveram um número cada vez maior de *buckets* significantes conforme se comparou este com grupos de períodos mais longos, o grupo A7 apresentou um comportamento diferente. Quando comparado com o grupo A30 o número de *buckets* significantes foi muito maior que para o grupo A90, e quando comparado com o grupo E não houve *buckets* significantes. Isto mostra que o grupo A7, coletado apenas sete dias após o AVEi, se assemelhou mais com as amostras A180, obtidas seis meses após o AVEi, do que as amostras A1 e A30. Já as amostras A90 apresentaram apenas o *bucket* em  $\delta$  3,85 como significativo, apresentando grande similaridade entre os dois grupos. Desta forma revelou que, embora discretas, ocorreram mudanças no perfil sérico ao longo do tempo. Aparentemente, houve uma melhora breve para a maioria dos pacientes no curto período de uma semana após o AVEi, mas após um mês o quadro geral voltou a se tornar mais semelhante ao encontrado logo após a ocorrência do AVEi. Passados três meses, o perfil geral tornou-se semelhante ao de seis

meses, no qual houve um melhor prognóstico para a maioria dos pacientes. Quanto aos sinais significantes, estes foram bastante similares aos obtidos para a análise entre os grupos A1 e A180. Para as análises entre os grupos A7 e A30 e A30 e A180, além dos sinais referentes à  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose, lipídeos, VLDL e alanina, também se observou os sinais em  $\delta$  0,83, 0,87, 0,90, 0,99-1,05, 2,34 e 2,36. Estes se referem a colesterol, LDL e VLDL, valina e isoleucina. Os sinais em  $\delta$  2,34 e 2,36 devem ser referentes a 3-hidroxitirato ou piruvato. A maior parte destes sinais é semelhante aos observados para as análises das amostras de controle. Portanto, estas alterações provavelmente se devem a fatores externos e não ao AVEi.

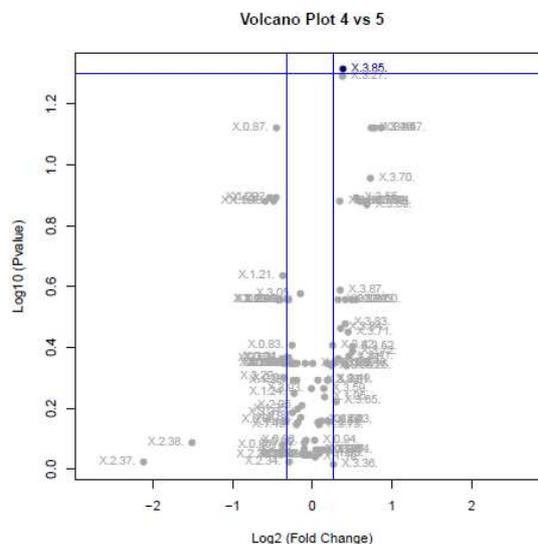


**Figura 30:** Gráficos Volcano das comparações entre o grupo 1 (amostras A1) e cada um dos grupos coletados com o passar do tempo, sendo grupo 2 (amostras A7), grupo 3 (amostras A30), grupo 4 (amostras A90) e grupo 5 (amostras A180). Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas.





**Figura 32:** Gráficos Volcano das comparações entre o grupo 3 (amostras A30) e cada um dos grupos coletados com o passar do tempo, sendo grupo 4 (amostras A90) e grupo 5 (amostras A180). Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas.



**Figura 33:** Gráficos Volcano das comparações entre o grupo 4 (amostras A90) e grupo 5 (amostras A180). Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas.

#### 4.1.6.6 Discriminação entre amostras de paciente controle versus pacientes que sofreram AVEi

Com o objetivo de identificar a presença da doença, realizaram-se as análises quimiométricas dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  entre as amostras de pacientes controle e que sofreram AVEi. Esta análise foi realizada para todos os períodos, sendo que as amostras A1, A7 e A30 de pacientes de AVEi foram analisadas juntamente com as amostras C1 dos pacientes de controle; as amostras A90 dos pacientes de AVEi com as amostras C90 dos pacientes de controle; e as amostras A180 dos pacientes de AVEi com as amostras C180 dos pacientes de controle. As análises quimiométricas iniciais foram realizadas com todas as amostras dos pacientes de AVEi, inclusive dos pacientes sem identificação com respeito ao tratamento trombolítico. Em seguida, análises similares foram realizadas separadamente para as amostras de pacientes de AVEi que receberam tratamento trombolítico e para os que não receberam.

##### 4.1.6.6.1 Análise dos espectros de RMN de $^1\text{H}$

O resumo dos resultados das análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em que se obteve discriminação está na Tabela 7. No caso das amostras A1, os metabólitos cujos sinais foram estatisticamente significantes incluíram: colesterol, lipídeos e lipoproteínas, valina, leucina, isoleucina, alanina, piruvato, colina, glicoproteína, acetoacetato, glutamina, glucose e possivelmente tirosina e histidina. Porém, além destes, outros metabólitos também foram observados nos gráficos de *X-loadings*, incluindo etanol, 3-hidroxitirato, creatinina, hipoxantina, formato e outros compostos não identificados. Como é possível notar analisando a Tabela 7, o maior número de metabólitos significantes se destacaram nas análises considerando todas as amostras de AVEi, talvez porque neste caso o maior número de amostras permitiu que mesmo pequenas diferenças nas concentrações de metabólitos entre os grupos doente e controle fossem percebidas. Também nota-se que os metabólitos significantes nas análises dos pacientes trombolise foram em geral diferentes dos observados nas análises dos pacientes não-trombolise, indicando que diferentes mecanismos ocorreram provavelmente por efeitos do tratamento.

Observando as discriminações obtidas com as amostras A7, os metabólitos significantes foram: lipídeos e lipoproteínas, valina, leucina, isoleucina, alanina, glicoproteína, arginina, colina, glucose, tirosina e fenilalanina, sendo esta última observada apenas para a análise das amostras de AVEi não-trombolise. Outros metabólitos também observados nos gráficos de *X-loadings*, incluíram etanol, acetoacetato, arginina, 3-hidroxitirato, piruvato, creatinina, histidina, hipoxantina, formato e outros compostos não identificados. Portanto, nas primeiras 24 horas houve um

maior número de metabólitos sendo afetados pela ocorrência do AVEi ou pelo estresse decorrente.

Conforme se observa na Tabela 7, em todos os casos houve discriminação para as amostras A1 e A7. Este resultado é bastante relevante, visto que a identificação da ocorrência do AVEi precisa ser feita nas primeiras horas após o AVEi, para então se determinar as providências que devem ser tomadas. Quanto às análises das amostras A30 de pacientes de AVEi juntamente com as amostras C1 dos pacientes controle e das amostras C90 dos pacientes de AVEi com as amostras C90 dos pacientes controle não se observou discriminação para qualquer dos espectros e parâmetros utilizados. Já para as análises das amostras A180, apenas se observou discriminação parcial na análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com todos os pacientes de AVEi comparadas às amostras C180 dos pacientes controle. Os sinais significativos pela análise estatística incluíram os sinais em  $\delta$  1,47 e 3,78, provavelmente referentes à alanina, embora no deslocamento químico em  $\delta$  3,78 ocorra sobreposição dos sinais da alanina com sinais de  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose, e o sinal em  $\delta$  3,47 também correspondente a sinais de  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose. Esta discriminação provavelmente se deu devido às diferenças entre as amostras do grupo C180 de controle observadas na análise destas com as demais amostras de controle.

Tanto no caso dos pacientes que receberam o trombolítico como os que não receberam houve discriminação parcial apenas para as amostras de 24 horas e sete dias após o AVEi. Após esse período nenhum *bucket* mostrou-se estatisticamente significativo, embora se tenha observado uma discriminação parcial para as amostras A180 dos pacientes não-trombólise. Este resultado era esperado visto que com o passar do tempo da ocorrência do AVEi, esperasse que os efeitos causados pelo AVEi não sejam mais observados e o perfil sérico passe a assemelhar com os pacientes saudáveis.

**Tabela 7:** Resumo dos resultados das análises quimiométricas das amostras dos pacientes de controle e que sofreram AVEi em que se obteve discriminação total ou parcial.

Grupo doente x Grupos controle <sup>1</sup>		Espectros utilizados	Região do espectro (ppm)	Pré-processamento	RMSECV	Var. Mín (%)	Var. em X (%)	Var. em Y (%)	PC1 (%)	PC2 ou PC3	Valor-α de Bonferroni corrigido	Buckets observados nos gráficos de X-loadings (ppm) <sup>4</sup>	Metabólitos identificados nos gráficos de X-loadings <sup>4</sup>
Trombólise	A1 x C1	<i>noesypr1d</i>	0,40-9,00	SIM <sup>2</sup>	0,18	30	95,1	57,3	50,0	19,4	6,58x10 <sup>-4</sup>	0,81-0,88; 0,99-1,01; 1,04; 1,17; 1,19-1,29; 1,37; 1,47-1,50; 2,04-2,06; 2,23; 2,37; 2,38; 3,21; <b>3,22</b> -3,28; 3,41-3,44; 3,46-3,50; 3,52; 3,53; 3,55-3,57; <b>3,65</b> ; 3,67; 3,70-3,76; 3,78; 3,83; 3,84; 3,89; 3,90; 3,92; 5,23-5,25	Colesterol; lipídeos e lipoproteínas; etanol; alanina; glicoproteína; acetoacetato; piruvato; <b>colina</b> ; açúcares (α e β-glucose)
	A1t x C1	<i>cpmgpr1d</i>	6,50-9,00	ADV <sup>3</sup>	0,248	10	40,3	63,7	27,3	17,2	6,67x10 <sup>-4</sup>	6,72-6,74; 6,82-6,84; 6,89; 6,90; <b>6,91</b> -6,93; 6,95-6,97; 6,99-7,17; 7,19; 7,21; 7,22; 7,24-7,28; 7,30; 7,32; 7,34-7,45; 7,60-7,65; 7,70; 7,72- <b>7,77</b> ; 7,78; 7,80; 7,82; 7,85; 7,86; 8,18-8,23; 8,32; 8,34; 8,47	<b>Tirosina</b> ; histidina; fenilalanina; hipoxantina, formato; outros compostos não identificados
	A7 x C1	<i>cpmgpr1d</i>	6,50-9,00	ADV	0,242	10	49,3	57,8	22,3	16,1	6,25x10 <sup>-4</sup>	6,72; 6,74; 6,81; 6,83; 6,87; 6,98; <b>6,90</b> -6,93; 6,95-6,97; 6,99; 7,01; 7,02; 7,04; 7,06-7,09; 7,11-7,13; 7,15-7,17; 7,19; 7,21; 7,23-7,25; 7,27; 7,29-7,32; 7,34; 7,36-7,39; 7,41; 7,43-7,51; 7,60-7,64; 7,66; 7,69; 7,70; 7,72; 7,73; 7,75-7,78; 7,80-7,85; 8,17-8,23; 8,32-8,34; 8,47	<b>Tirosina</b> ; histidina; fenilalanina; hipoxantina, formato; outros compostos não identificados

Não-trombólie	A1 x C1	<i>cpmgpr1d</i>	0,40-4,00	SIM	0,297	30	76,9	51,6	49,9	18,8	$1,02 \times 10^{-3}$	0,83-0,85; 0,89; 1,37; 1,47-1,49; 2,05; 2,23; <b>2,38</b> ; 3,20-3,27; 3,36; 3,40-3,48; 3,50; 3,52; 3,53; <b>3,55</b> -3,57; 3,70-3,75; <b>3,83</b> ; 3,84; 3,89; 3,92	Colesterol; lipídeos e lipoproteínas; etanol; alanina; glicoproteína; acetoacetato; colina; <b>piruvato</b> e açúcares ( $\alpha$ e $\beta$ -glucose)
	A7 x C1	<i>noesypr1d</i>	0,40-9,00	ADV	0,324	20	42,1	35,7	40,6	12	$9,62 \times 10^{-4}$	0,77-0,79; 0,86-0,89; 0,92- <b>0,96</b> ; 0,98; <b>0,99</b> ; <b>1,01</b> ; <b>1,16</b> -1,19; 1,24-1,28; 1,39; 1,40; 1,49- <b>1,51</b> ; 1,54-1,63; 2,01; <b>2,03</b> ; 2,05; 2,08; 2,10; 2,21; 2,22; 2,25-2,27; 3,22; 3,23; 3,26; 3,27; 5,29-5,31	Colesterol; lipídeos e lipoproteínas, <b>leucina, isoleucina</b> alanina, <b>glicoproteína</b> , acetoacetato, colina e açúcares ( $\alpha$ e $\beta$ -glucose).
		<i>cpmgpr1d</i>	6,50-9,00	ADV	0,194	15	50	48,3	21,7	16,5	$8,06 \times 10^{-4}$	6,72; 6,73; 6,89; 6,90-6,93; 6,95; 6,66; 6,99; 7,00; 7,02, 7,04-7,13; 7,15-7,29; 7,31; <b>7,32</b> -7,34; 7,36-7,39; <b>7,41</b> ; 7,42; <b>7,43</b> ; 7,44; 7,45; 7,60-7,66; 7,72-7,82; 8,18-8,20; 8,23; 8,32; 8,33; 8,47	Tirosina; histidina; <b>fenilalanina</b> ; hipoxantina, formato; outros compostos não identificados
Todas as amostras de AVEi	A1 x C1	<i>noesypr1d</i>	0,40-9,00	ADV	0,300	10	63,1	24,7	40,4	20,8	$3,31 \times 10^{-4}$	0,64- <b>0,69</b> ; 0,70; <b>0,71-0,74</b> ; 0,75-0,79; 0,86- <b>0,97</b> ; 0,98; <b>0,99-1,14</b> ; 1,15-1,17; 1,19; 1,20; 1,22; 1,25; 1,27-1,29; 1,39-1,41; <b>1,43-1,45</b> ; 1,47; <b>1,48</b> ; <b>1,50</b> ; 1,51; <b>1,52</b> ; 1,53-1,64; <b>1,65-1,73</b> ; 1,74; <b>1,76-1,93</b> ; 1,95-1,97; 2,01-2,03; <b>2,05</b> ; 2,07-2,11; <b>2,12-2,15</b> ; 2,17; <b>2,18</b> ; <b>2,20</b> ; 2,21; 2,22; <b>2,24</b> ; 2,25-2,28; <b>2,29</b> ; 2,30; <b>2,31-2,33</b> ; 2,77; 3,22-3,27; 3,41; 3,44; 3,48; 3,51; 3,57; 3,66-3,80; 3,82-3,94; 5,26-5,32	<b>Colesterol, valina, leucina, isoleucina</b> , etanol, acetato, 3-hidroxibutirato, <b>alanina, glicoproteína, acetoacetato, glutamina</b> , colina, $\alpha$ e $\beta$ -glucose

A7 x C1	<i>cpmgpr1d</i>	0,40-4,00	SIM	0,308	15	57,3	35,7	45,9	11,1	$4,46 \times 10^{-4}$	0,81-0,91; 0,96; 0,98-1,00; 1,03-1,05; 1,17- <b>1,22</b> ; 1,23- <b>1,29</b> ; 1,37-1,39; 1,47-1,50; 1,92; 2,03-2,06; 2,14; 2,23; 2,36- <b>2,38</b> ; 2,45; 2,46; 3,04; 3,05; 3,19- <b>3,21</b> ; <b>3,22</b> -3,28; 3,36- <b>3,59</b> ; <b>3,65</b> ; 3,67; 3,69-3,93	Colesterol; <b>lipideos</b> , <b>VLDL e LDL</b> ; valina; leucina; isoleucina; etanol; glicoproteína; acetoacetato; glutamina; creatinina; <b>piruvato, colina, <math>\alpha</math> e <math>\beta</math>-glucose</b>
	<i>cpmgpr1d</i>	6,50-9,00	ADV	0,237	20	53	48,6	24,9	12,9	$8,06 \times 10^{-4}$	6,72; 6,73; 6,89; <b>6,90</b> -6,93; 6,95; 6,96; 6,99; 7,00; 7,02; 7,04-7,13; 7,15-7,29; 7,31-7,34; 7,36-7,39; 7,41-7,45; 7,60-7,66; 7,72-7,82; 8,18-8,20; 8,23; 8,32; 8,33; 8,47	<b>Tirosina</b> , histidina, fenilalanina, hipoxantina; formato; outros compostos não identificados
	<i>noesypr1d</i>	0,40-9,00	ADV	0,215	15	72,2	26,8	39,7	9,04	$5,50 \times 10^{-4}$	0,66; 0,76-0,78; 0,80; 0,86-0,88; 0,90-0,95; <b>0,96</b> ; 0,98; <b>0,99-1,15</b> ; 1,18; 1,19; 1,22; 1,24-1,26; 1,28; 1,39; 1,40; <b>1,42-1,52</b> ; 1,54-1,64; <b>1,68-1,77</b> ; 1,94; 1,96; 2,01; <b>2,03</b> ; 2,05-2,11; 2,16; 2,21-2,27; 3,22-3,27; 3,42; 3,44; 3,48; 3,51; 3,57; 3,71; 3,73-3,77; 3,84; 3,90-3,94; 5,30-5,32	Colesterol; lipideos e lipoproteínas; <b>valina</b> ; <b>isoleucina</b> ; <b>leucina</b> ; etanol; <b>alanina</b> ; <b>glicoproteína</b> ; <b>arginina</b> ; acetoacetato; colina; $\alpha$ e $\beta$ -glucose
	<i>cpmgpr1d</i>	0,40-4,00	SIM	0,319	15	77	34,5	54,4	14,2	$4,81 \times 10^{-4}$	<b>0,81</b> ; 0,82; <b>0,83</b> -0,91; 0,96-1,00; 1,03-1,05; 1,19- <b>1,29</b> ; 1,37; 1,47-1,49; 1,92; 2,04-2,06; 2,23; 2,28; 2,36-2,38; 3,04; 3,05; 3,20; <b>3,21</b> ; <b>3,22</b> -3,28; 3,36- <b>3,59</b> ; 3,64-3,68; 3,70-3,79; 3,81-3,93	<b>Colesterol</b> ; lipideos, <b>VLDL e LDL</b> ; valina; etanol; alanina; glicoproteína; acetoacetato; piruvato; creatinina; <b>colina, <math>\alpha</math> e <math>\beta</math>-glucose</b>
	<i>cpmgpr1d</i>	6,50-9,00	ADV	0,285	20	44	43,1	21,3	15,4	$8,20 \times 10^{-4}$	6,72; 6,73; 6,89- <b>6,92</b> ; 6,93; 6,95; 6,96; 6,99; 7,00; 7,02; 7,04-7,13; 7,15-7,39; 7,41-7,44; 7,61-7,64; 7,73-7,81; 8,17-8,23; 8,33; 8,34; 8,47	<b>Tirosina</b> , histidina, fenilalanina, hipoxantina; formato; outros compostos não identificados

	A180 x C180	<i>cpmgpr1d</i>	0,40-4,00	SIM	0,148	20	95,5	44	53,6	16,7	8,06x10 <sup>-4</sup>	0,82-1,00; 1,26-1,29; 1,37; <b>1,47</b> -1,49; 2,04; 2,05; 2,23; 2,38; 3,20-3,27; 3,40- <b>3,47</b> ; 3,48; 3,50; 3,52-3,57; 3,70- <b>3,78</b> ; 3,79; 3,83; 3,84; 3,88- 3,90; 3,92	Colesterol; lipídeos, VLDL e LDL; isoleucina; <b>alanina</b> ; glicoproteína; acetoacetato; piruvato; creatinina; colina, α e <b>β-glucose</b>
--	----------------	-----------------	-----------	-----	-------	----	------	----	------	------	-----------------------	--	--

<sup>1</sup>Amostras A1 coletadas nas primeiras 24 horas após o AVEi; A1t coletadas nas primeiras 24 horas após o AVEi e após administração do trombolítico; A7 coletadas após sete dias da ocorrência do AVEi; A180 coletadas após 180 dias da ocorrência do AVEi; C1 primeira coleta dos pacientes de controle. <sup>2</sup>Modo especial de integração, utilizado com o modo retangular de construção dos *buckets*. <sup>3</sup>Modo avançado de construção dos *buckets*. <sup>4</sup>Em negrito *buckets* significantes (valor-*p*< valor α de Bonferroni corrigido).

Em nenhum caso se observou uma discriminação total entre os grupos doentes e controle, e, portanto as diferenças entre os dois grupos foram pequenas. Observa-se que embora os metabólitos estatisticamente significativos variaram entre as análises, alguns se destacaram na maioria delas. No caso das análises dos pacientes trombólise, as substâncias encontradas como significantes incluíram a colina, considerada uma vitamina essencial e sintetizada em quantidade pequena pelo organismo, necessitando ser ingerida na dieta diária. Deficiência de colina acarreta em falta de VLDL que carrega ácidos graxos do fígado, e, portanto a deficiência de colina está associada a doenças no fígado e maior incidência de câncer no fígado. Além disso, concentrações séricas fora da faixa considerada aceitável foram associadas apenas a transplante cardíaco até o momento, enquanto as duas principais formas de armazenamento de colina, fosfatidilcolina e glicerofosocolina ainda não tiveram suas concentrações séricas associadas a nenhum tipo de desordem (Wishart *et al.*, 2013). Apenas no estudo conduzido por Yang e colaboradores (2012) em que se analisou o tecido cerebral de ratos para avaliar as mudanças neuroquímicas induzidas por oclusão da artéria cerebral média notou-se diminuição nos níveis de colina, fosfatidilcolina e mio-inositol nos ratos em que houve isquemia, sugerindo que houve interrupção no metabolismo da membrana celular, uma vez que estes metabólitos são componentes importantes de fosfolípidos da membrana celular. Portanto, é possível que estes ou outros eventos desencadeados pelo AVEi estejam causando a diminuição destas substâncias, principalmente nas primeiras horas após o AVEi.

Na mesma análise o sinal em  $\delta$  3,65 foi significativo, porém não foi possível inferir a qual substância este se refere visto ser uma região de grande sobreposição de sinais. Neste deslocamento pode haver sinais referentes a isoleucina e etanol, porém como nenhum outro sinal referente a estas mesmas substâncias foi significativo, não foi possível identificar com certeza.

Além destes, notou-se que sinais da região aromática também se destacaram, cujos deslocamentos químicos foram  $\delta$  6,91 e 7,77. O primeiro inclui um sinal referente à tirosina e o segundo a histidina, porém os demais sinais referentes a cada uma das substâncias não foram significantes, o que torna o resultado questionável. Comparando com resultados da literatura, destacou-se histidina em maior concentração nos pacientes de controle, sendo que concentrações sanguíneas alteradas de histidina foram encontradas em pacientes com histidinemia, doença de Alzheimer, dengue e epilepsia (Wishart *et al.*, 2013). Já com respeito à tirosina, esta foi correlacionada com esquizofrenia, epilepsia, infarto do miocárdio, infecção viral e hawkinsinuria (Wishart *et al.*, 2013). Não se encontrou fatores que relacionem a histidina com doenças relacionadas ou fatores de risco do AVEi.

Com respeito aos metabólitos encontrados como estatisticamente significantes nas análises dos pacientes não trombólise, o sinal em  $\delta$  2,38, referente a piruvato, também foi encontrado em maior quantidade nas amostras dos pacientes que sofreram AVEi. Em um estudo conduzido por Jung e colaboradores (2011) com pacientes que sofreram AVEi causado por doença de pequenos vasos, piruvato também foi encontrado em maior quantidade no plasma de paciente que sofreram AVEi. Conforme explicado pelos autores, o piruvato está associado a metabolismo energético, sendo produzido na glicólise anaeróbica da glucose sérica, aumentando, portanto sua produção em situações em que o oxigênio disponível diminui, como após a ocorrência do AVEi. Além destes, no caso das amostras B os sinais em  $\delta$  0,96, 0,99 e 1,01 correspondem à região dos sinais de leucina e isoleucina, não sendo possível distingui-los. Na mesma região ainda há um sinal de uma das metilas da valina, porém o sinal da outra metila em  $\delta$  1,04 não foi observado como significante. Estes três aminoácidos são essenciais à vida e estão particularmente envolvidos no metabolismo de estresse, energético e muscular. Apesar das similaridades estruturais entre os três, possuem rotas metabólicas diferentes, a valina é direcionada apenas a carboidratos, a leucina a gorduras e a isoleucina a ambos. A deficiência destes também resulta em diferentes sintomas, a deficiência de valina gera déficits neurológicos enquanto deficiência de isoleucina gera tremores musculares. Doenças hepáticas causam diminuição destes aminoácidos, enquanto aminoácidos aromáticos, incluindo tirosina, triptofano e fenilalanina têm suas concentrações aumentadas. Há competição entre estes três aminoácidos e os aminoácidos aromáticos pelo cérebro, o que pode justificar a significância dos sinais em  $\delta$  7,32, 7,41 e 7,43, referentes à fenilalanina em maior quantidade nas amostras de AVEi. Valina, leucina e isoleucina são aminoácidos primariamente metabolizados pelos músculos. Em situações de estresse, como cirurgias, traumas, infecções e febre, requerem proporcionalmente mais destes aminoácidos que dos demais, especialmente leucina (Wishart *et al.*, 2013). Este último fato pode justificar a presença destes aminoácidos em maior concentração nos pacientes de controle. No estudo conduzido por Jung e colaboradores (2011) estes três aminoácidos também foram encontrados em maior intensidade nas amostras de pacientes de controle em relação aos pacientes de AVEi. Além destes, os *buckets* em  $\delta$  1,16, 1,51 e 2,03 também se apresentaram como significantes e pela localização no gráfico de *X-loading* parecem estar em maior quantidade nas amostras de controle. Dos três sinais, até o momento foi possível identificar o sinal em  $\delta$  2,03 como as metilas de glicoproteínas, ainda não correlacionado com condições relacionadas ao AVEi.

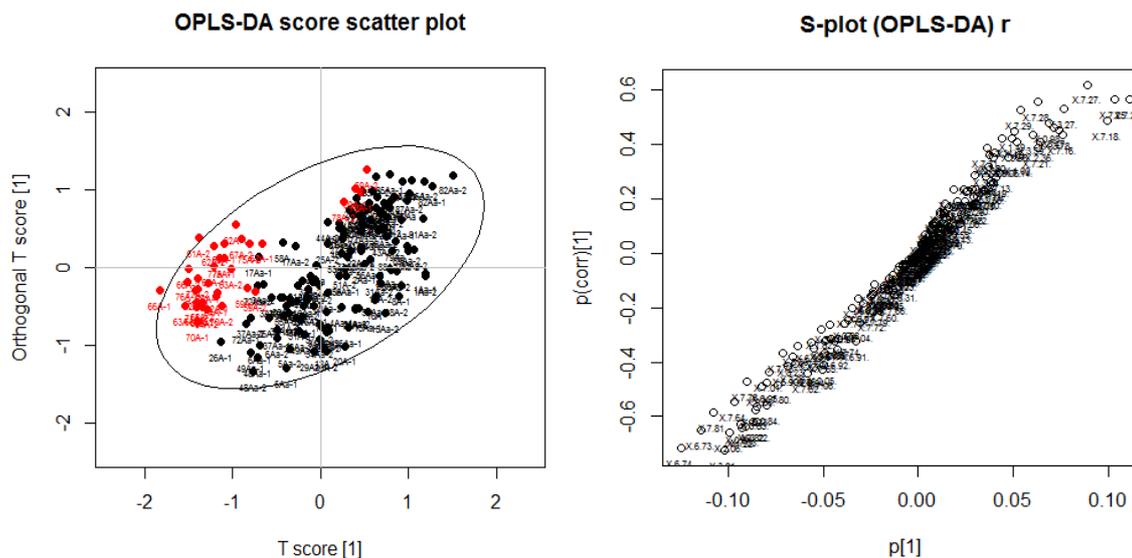
Notou-se que os sinais na região de açúcares,  $\delta$  3,50 a 3,85, provavelmente referentes à  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose foram significativos na maioria das análises em que houve discriminação, independente dos grupos considerados. Concentrações sanguíneas fora

da faixa normal de glucose estão principalmente associadas à diabetes *mellitus*, tendo sido associada também a transplante cardíaco, deficiência de hormônio do crescimento, leucemia mieloide aguda, deficiência de glucagon, deficiência de beta-metilcrotonil CoA e dislipidemia (Wishart *et al.*, 2013). Este último pode ser uma das justificativas de pacientes que tiveram AVEi apresentarem níveis de glucose mais elevados do que de controle, pois a dislipidemia é considerada um fator de risco de AVEi e pelo menos treze pacientes apresentaram este fator de risco prévio. Além disso, no mesmo estudo conduzido por Yang e colaboradores (2012) notou-se que houve elevação nos níveis de glucose no tecido cerebral. Esta elevação foi atribuída à elevação deste metabólito na extremidade da região isquêmica e na diminuição da utilização de glucose pelas células cerebrais.

Nas análises com todas as amostras, além da maioria dos metabólitos encontrados nas análises dos grupos trombólise e não-trombólise, ainda se destacaram a colesterol, alanina, acetoacetato e glutamina. Quanto ao colesterol, este deve estar correlacionado ao fato de altos níveis de colesterol ser um fator de risco do AVEi. Já o aminoácido alanina foi encontrado em maiores concentrações em tecidos cerebrais de ratos com oclusão da artéria cerebral (Chen *et al.*, 2012). O acetoacetato ainda não foi correlacionado com fatores diretamente ligados com o AVEi, porém concentrações anormais deste metabólito no sangue podem estar relacionadas a diabetes, fator de risco presente em alguns pacientes (Wishart *et al.*, 2013). Por último, a glutamina já tem sido correlacionada a ocorrência de AVEi em diversos estudos, como a diminuição deste em tecidos cerebrais de ratos com oclusão da artéria cerebral média (Yang *et al.*, 2012) e também no plasma sanguíneo de pacientes que sofreram AVEi (Jung *et al.*, 2011). No primeiro estudo foi proposto que esta diminuição nos níveis de glutamina esteja relacionada com inibição do ciclo glutamato-glutamina, enquanto no último os autores propuseram que possa estar relacionada com a regulação da expressão da proteína fibrilar glial ácida após a isquemia.

Utilizou-se o *muma* em uma tentativa de quantificar a separação e unir a parte alifática do espectro de *noesypr1d* ( $\delta$  0,4 a 4,0) com a parte aromática ( $\delta$  6,5 a 9,0) do espectro de *cpmgpr1d*, unindo assim as partes que mais mostraram discriminação (Tabela 7). Para ambos se utilizou o método avançado de *bucketing* e o escalamento em relação a intensidade total dos sinais ao se construir a tabela de dados no AMIX. Não foram considerados *buckets* com menos de 2% de variância explicada. A união dos dados dos dois conjuntos foi feita no Excel ao se construir a tabela de dados, a qual foi transformada para o formato .csv e utilizada no *muma*. Esta análise foi realizada para o conjunto incluindo todas as amostras A1 do grupo AVEi, trombólise e não-trombólise, *versus* as amostras C1 de controle. O resultado da análise por PCA foi bastante

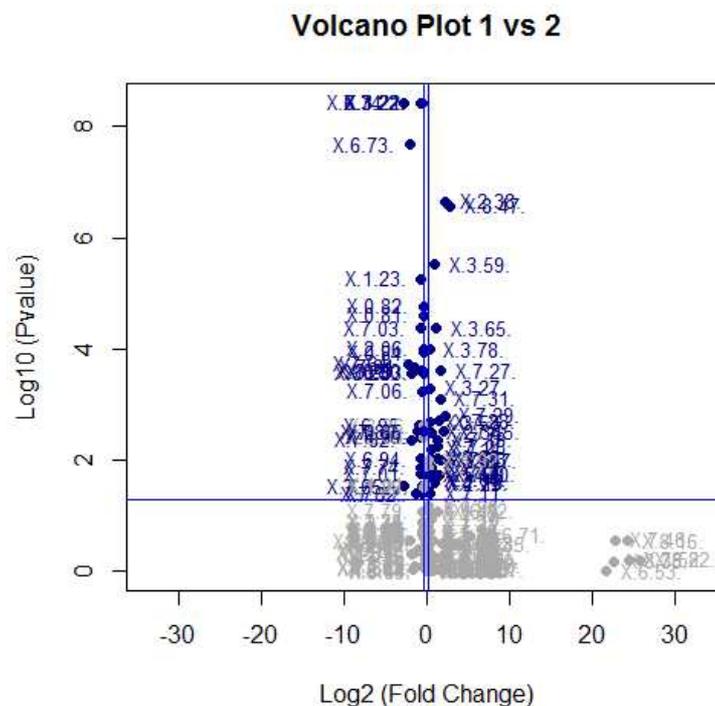
satisfatório, sendo a melhor separação obtida para PC2 versus PC5 para escalamento *range* sem normalização, que obteve valor-*p* calculado a partir de testes F de  $1,11 \times 10^{-16}$  e variância total explicada de 15,0%. Buscando otimizar ainda mais a separação, realizou-se a análise por OPLS-DA, a qual apresenta maior capacidade de separação (Trygg e Wold, 2002). O resultado é apresentado na Figura 34, na qual se observa discriminação parcial entre os grupos, superior há obtida no AMIX.



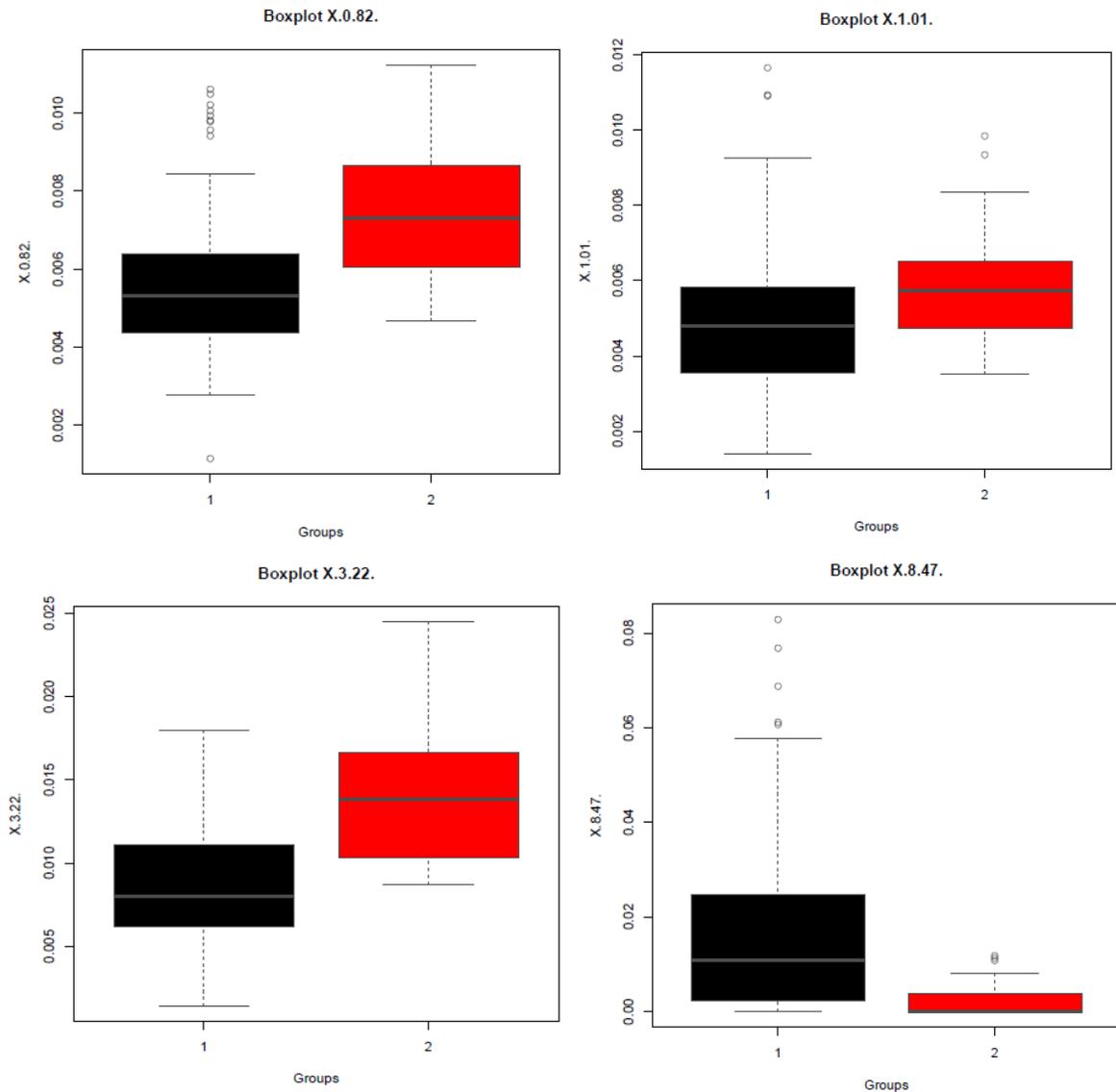
**Figura 34:** Gráficos de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (vermelho) considerando a região de 0,4 a 4,0 ppm do espectro obtido com a sequência de pulso *noesypr1d* e a parte aromática ( $\delta$  6,5 a 9,0) do espectro obtido com a sequência de pulso *cpmgrp1d*. Análises realizadas no *muma*.

A análise univariada resultou em um número muito maior de variáveis significantes do que o observado no AMIX, conforme se observa no gráfico Volcano (Figura 35). Estes incluíram:  $\delta$  0,81-0,85; 1,01; 1,22; 1,23; 1,28; 1,29; 1,47; 1,92; 2,05; 2,06; 2,14; 2,23; 2,36-2,38; 3,06; 3,21; 3,22; 3,26; 3,27; 3,36; 3,58; 3,59; 3,64; 3,65; 3,77; 3,78; 6,73; 6,74; 6,90; 6,91; 6,94; 6,95; 7,01; 7,03; 7,06; 7,11; 7,13; 7,16; 7,18; 7,23; 7,25; 7,27-7,29; 7,31; 7,38; 7,40; 7,45; 7,62; 7,64; 7,65; 7,74; 7,76; 7,77; 7,80-7,82; 8,23; 8,33; 8,47. Referem-se aos compostos: colesterol, isoleucina, lipídeos e lipoproteínas, alanina, acetato, glicoproteína, piruvato, glutamina, colina,  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose, fenilalanina, tirosina, histidina, formato e outros compostos não identificados. Outra grande ajuda são os *Boxplots*, que mostram a média e desvio padrão das integrais das variáveis em cada grupo, o que permite perceber quais metabólitos estão em maior intensidade em cada grupo. Isto é de especial ajuda nos casos em que a discriminação observada é apenas parcial, e, portanto, apenas a análise dos gráficos de *loadings* não é suficiente para definir os metabólitos que sofreram as maiores alterações nos grupos analisados. Por

exemplo, a Figura 36 mostra os gráficos de *Boxplot* para algumas variáveis apresentadas como significantes. As variáveis  $\delta$  0,82, 1,01 e 3,22 referentes à colesterol, isoleucina e colina, respectivamente, estão em maior quantidade nas amostras de controle enquanto a variável  $\delta$  8,47 referente ao formato está presente em maior concentração nas amostras de AVEi. A maior variação foi para a colina, com uma diferença entre as médias de aproximadamente 0,05, enquanto as demais apresentaram diferenças entre as médias dos dois grupos de no máximo 0,02. Estas observações confirmaram as observações já feitas a respeito de colina e isoleucina sofrerem diminuição da concentração sérica após o AVEi. No entanto, quanto ao colesterol era esperado estar em maior quantidade nas amostras de AVEi, já que altos níveis de colesterol são um fator de risco do AVEi. Porém, há relatos na literatura que também reportam a diminuição nos níveis de colesterol após o AVEi (Laborde *et al.*, 2011), estando até mesmo associado com bom prognóstico. Também se observou o aumento nos níveis de formato após o AVEi. Embora este não tenha sido considerado como significantes nas análises no AMIX, Jung e colaboradores (2011) observaram diminuição similar ao se analisar amostras de plasma de pacientes que sofreram AVEi. Este aumento foi atribuído à deficiência de ácido fólico e hiperhomocisteinemia, a qual tem sido relacionada a AVE, doenças cardiovasculares e demências (Jung *et al.*, 2011, Wishart *et al.*, 2013). Elevados níveis de formato podem acelerar o metabolismo de acidose após o AVE (Jung *et al.*, 2011).



de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas.



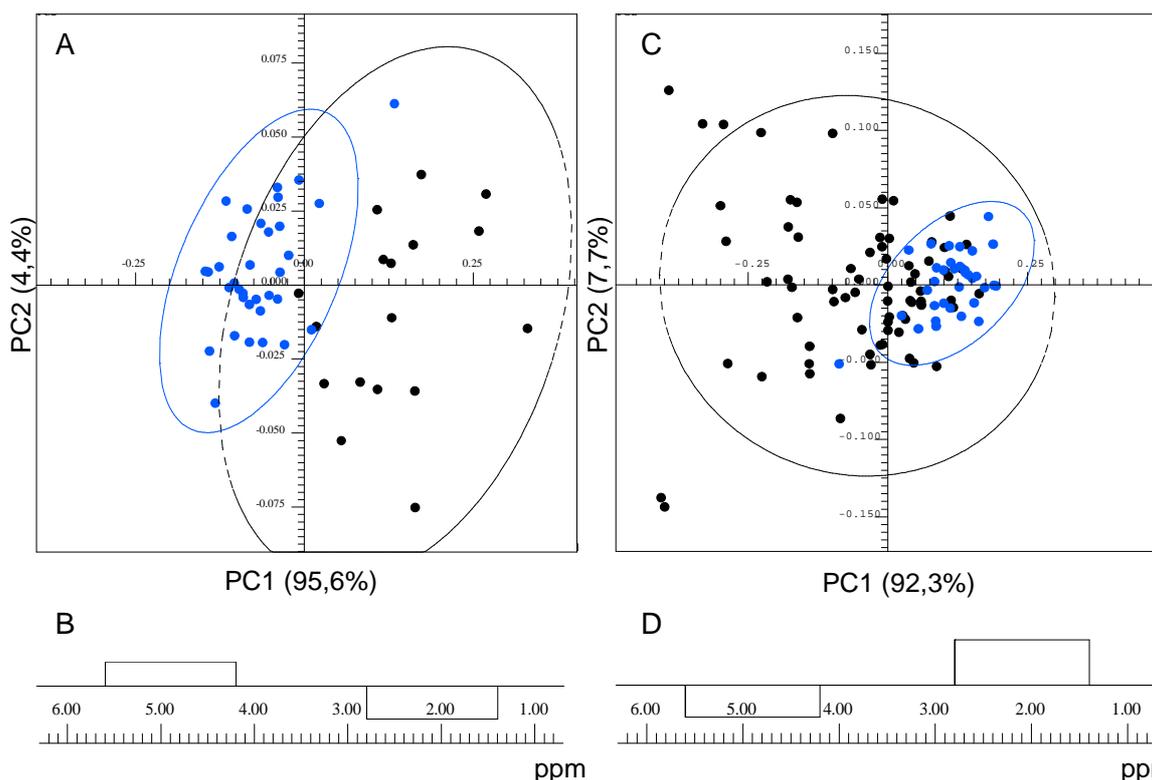
**Figura 36:** *Boxplots* dos *buckets* centrados em 0,82, 1,01, 3,22 e 8,47 (de baixo para cima) das análises entre amostras A1 de pacientes que sofreram AVEi (preto) e amostras C1 de controle (vermelho). O *boxplot* representa o valor médio (linha cinza dentro da caixa), o desvio padrão (limites da caixa), a faixa de valores (linha pontilhada) e as amostras anômalas (círculos acima e abaixo da caixa).

Embora o número de amostras de controle tenha sido muito menor que o ideal devido a problemas ocorridos nas coletas, ainda assim pode-se observar um potencial de se utilizar a técnica de RMN de  $^1\text{H}$  no diagnóstico do AVEi já nas primeiras horas. Ainda que a discriminação obtida não tenha sido tão satisfatória quanto a apresentada por Jung

e colaboradores (2011), a maior parte dos metabólitos encontrados como possíveis biomarcadores foi condizente entre os dois trabalhos. Também se apresentou mais uma alternativa para a análise quimiométrica que é a união de parte de diferentes espectros. Isto permite analisar em conjunto as regiões com maior número de informações obtidas em espectros do mesmo núcleo adquiridos com diferentes sequências de pulso.

#### 4.1.6.6.2 Análise dos espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

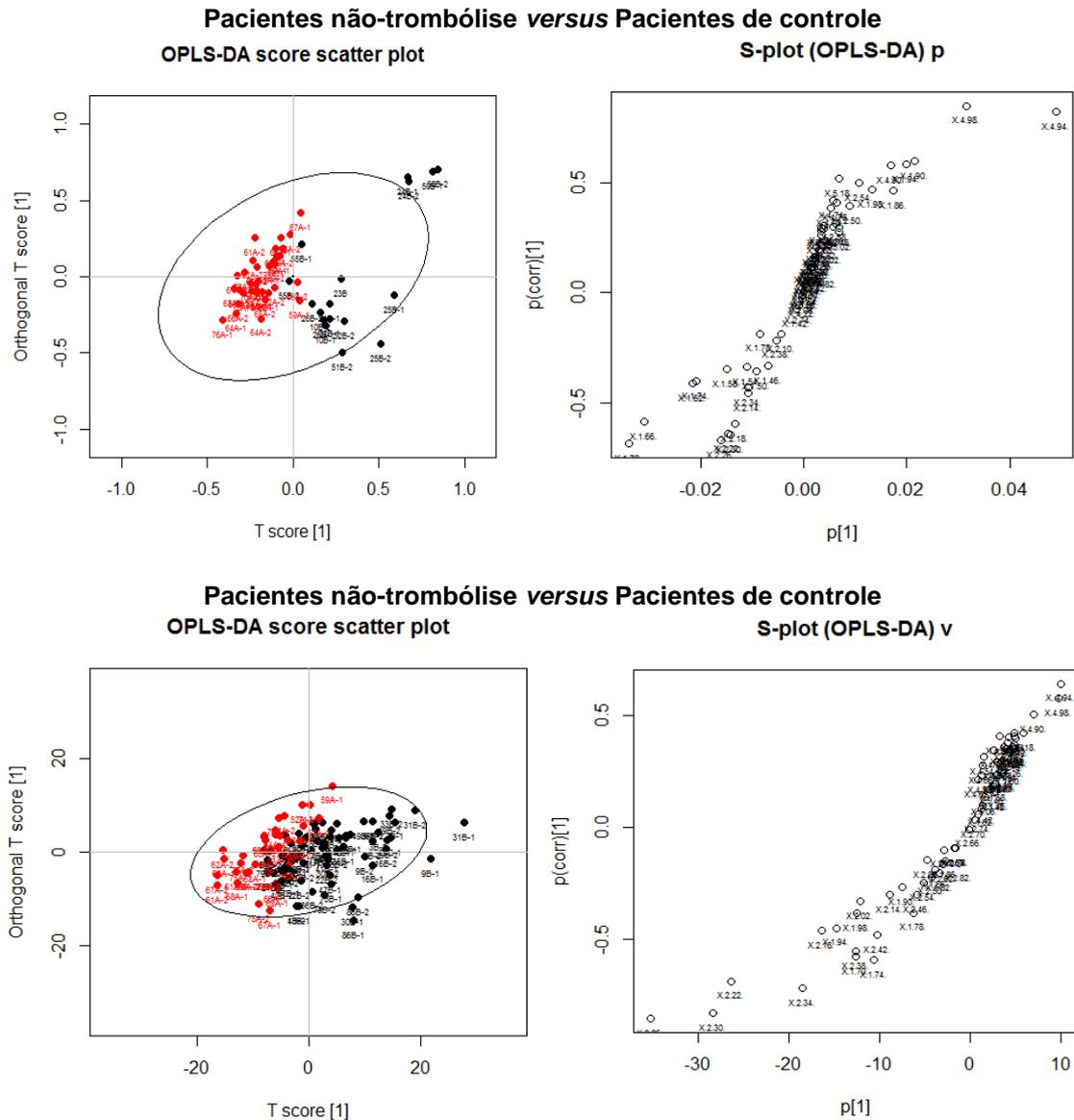
Na análise dos pacientes não-trombólise as análises quimiométricas dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  mostraram discriminação para as amostras A7 dos pacientes não-trombólise comparados aos pacientes C1 controle ao se considerar a região de  $\delta$  0,00-7,00 com *buckets* de 1,40 ppm, o que permite comparar a integração as duas regiões de sinais  $\delta$  1,40-2,80 e  $\delta$  4,20-5,60. As demais regiões do espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  que contém apenas ruído foram eliminadas por se considerar um valor mínimo de variância explicada dos *buckets* ao se realizar a PCA, no caso de 38%. Neste caso o resultado foi mais bem visualizado através dos gráficos obtidos por PCA e é apresentado na Figura 37A, sendo que o gráfico de escores mostra discriminação em PC1, com a maior parte das amostras de AVEi em escores positivos de PC1 e as amostras de controle em escores negativos de PC1. Comparando com o gráfico de *loadings* de PC1 (Figura 37B) percebe-se que as amostras de AVEi apresentaram os sinais em  $\delta$  4,2-5,6 referentes a  $\text{P}_i$  em maior intensidade, ao passo que as amostras de controle apresentaram o conjunto de sinais em  $\delta$  1,4-2,8 em maior intensidade, referentes a PCol e a sobreposição dos fosfolípidos PE e SM. A análise estatística de significância resultou em um valor- $\alpha$  de Bonferroni corrigido de 0,025, e ambos *buckets* foram considerados significantes ( $\delta$  4.90, valor- $p = 8.15 \times 10^{-16}$ ;  $\delta$  2.10, valor- $p = 9.55 \times 10^{-8}$ ).



**Figura 37:** Gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 referentes aos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  das amostras A7 de pacientes que sofreram AVEi **(A)** não-trombólise e **(C)** trombólise (preto) e amostras C1 de controle (azul). **(B e D)** Gráficos de *loadings* de PC1 respectivos. Elipses mostram níveis de confiança de 95%. Análises realizadas no AMIX.

Análises similares foram realizadas com os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  dos pacientes trombólise, porém a discriminação entre os grupos doente e controle não foi tão clara como para as análises dos pacientes não-trombólise (Figura 37C). Portanto, se utilizou o *muma* para uma melhor avaliação das discriminações observadas. Para isto a matriz de dados foi construída no AMIX considerando as regiões  $\delta$  1,4-2,8 e  $\delta$  4,2-5,6, divididas em *buckets* de 0,04 ppm. As análises no *muma* foram realizadas com normalização e sem imputação.

Com respeito às análises das amostras dos pacientes não-trombólise e controle, a melhor separação foi obtida para PC2 *versus* PC3 com escalamento pareto, a qual apresentou valor-*p* calculado a partir de testes F de  $1,55 \times 10^{-13}$  e variância total explicada de 33,0%. Por sua vez, a análise com as amostras dos pacientes trombólise e controle obteve a melhor separação para PC1 *versus* PC2 para escalamento *vaste*, com valor-*p* calculado a partir de testes F de  $1,99 \times 10^{-9}$  e variância total explicada de 41,2%. Foram também realizadas análises por OPLS-DA e o resultado é apresentado na Figura 38. Conforme se observa, a discriminação entre pacientes não-trombólise e controle continuou a ser superior à discriminação entre pacientes trombólise e controle.

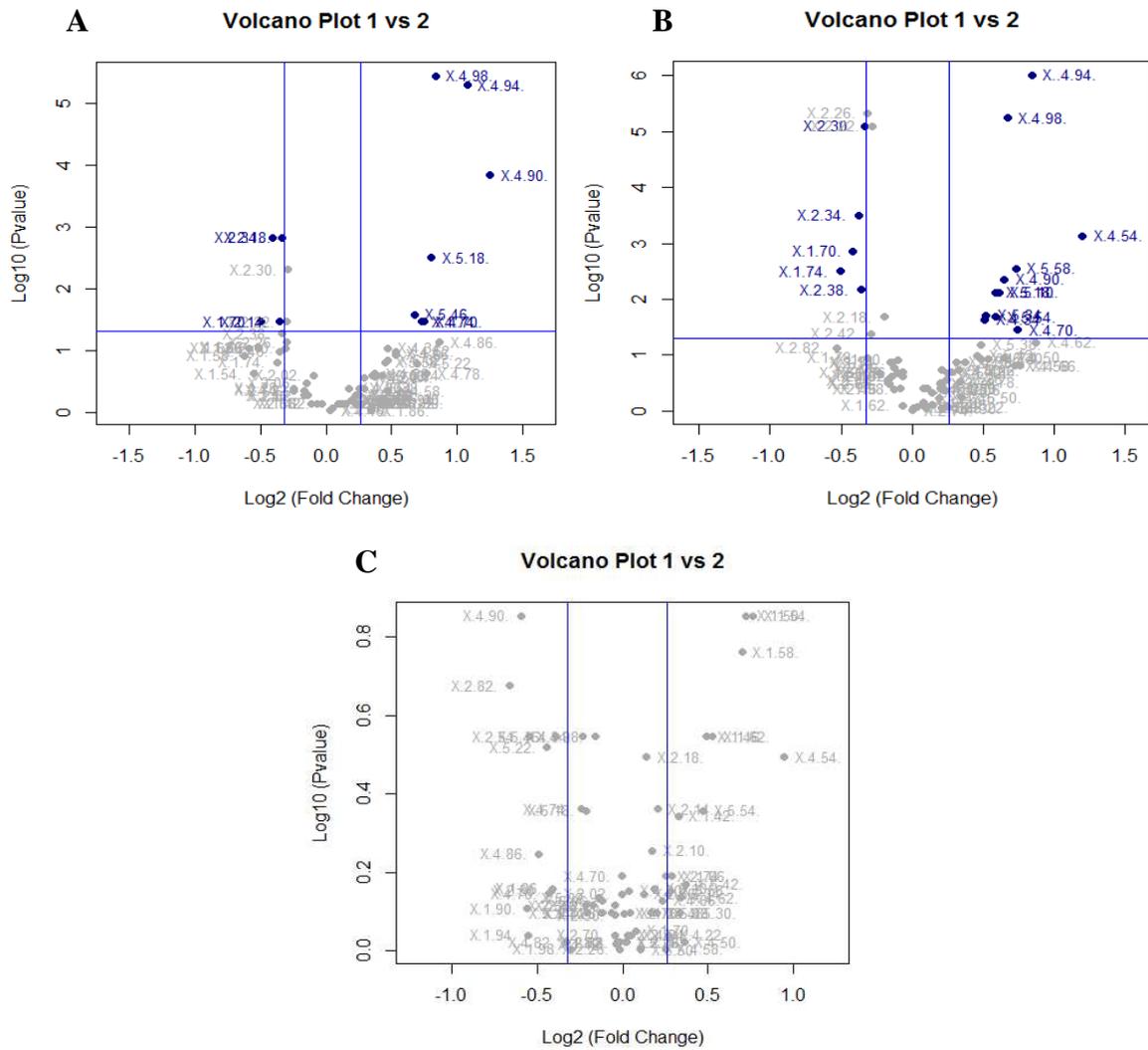


**Figura 38:** Gráfico de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  das amostras A7 de pacientes que sofreram AVEi (não-trombólise) (preto) e amostras C1 de controle (vermelho) (acima) e as amostras A7 de pacientes que sofreram AVEi (trombólise) (preto) e amostras C1 de controle (vermelho) (abaixo). Análises realizadas no *muma*.

Adicionalmente foram realizadas análises univariadas para melhor visualização das alterações nas variáveis entre os dois grupos considerados. Os gráficos Volcano resultantes (Figura 39) mostraram que tanto no caso dos pacientes não-trombólise como trombólise os *buckets* em  $\delta$  4,94 e 4,98 são altamente significantes, seguidos dos *buckets* em  $\delta$  1,70 e 2,34. Analisando os *Boxplots* (Figura 40) confirma-se que os *buckets* em  $\delta$  4,94 e 4,98, atribuídos a  $\text{P}_i$ , estão em maior intensidade nas amostras dos pacientes que sofreram AVEi do que nos pacientes controle. No entanto, esta diferença é

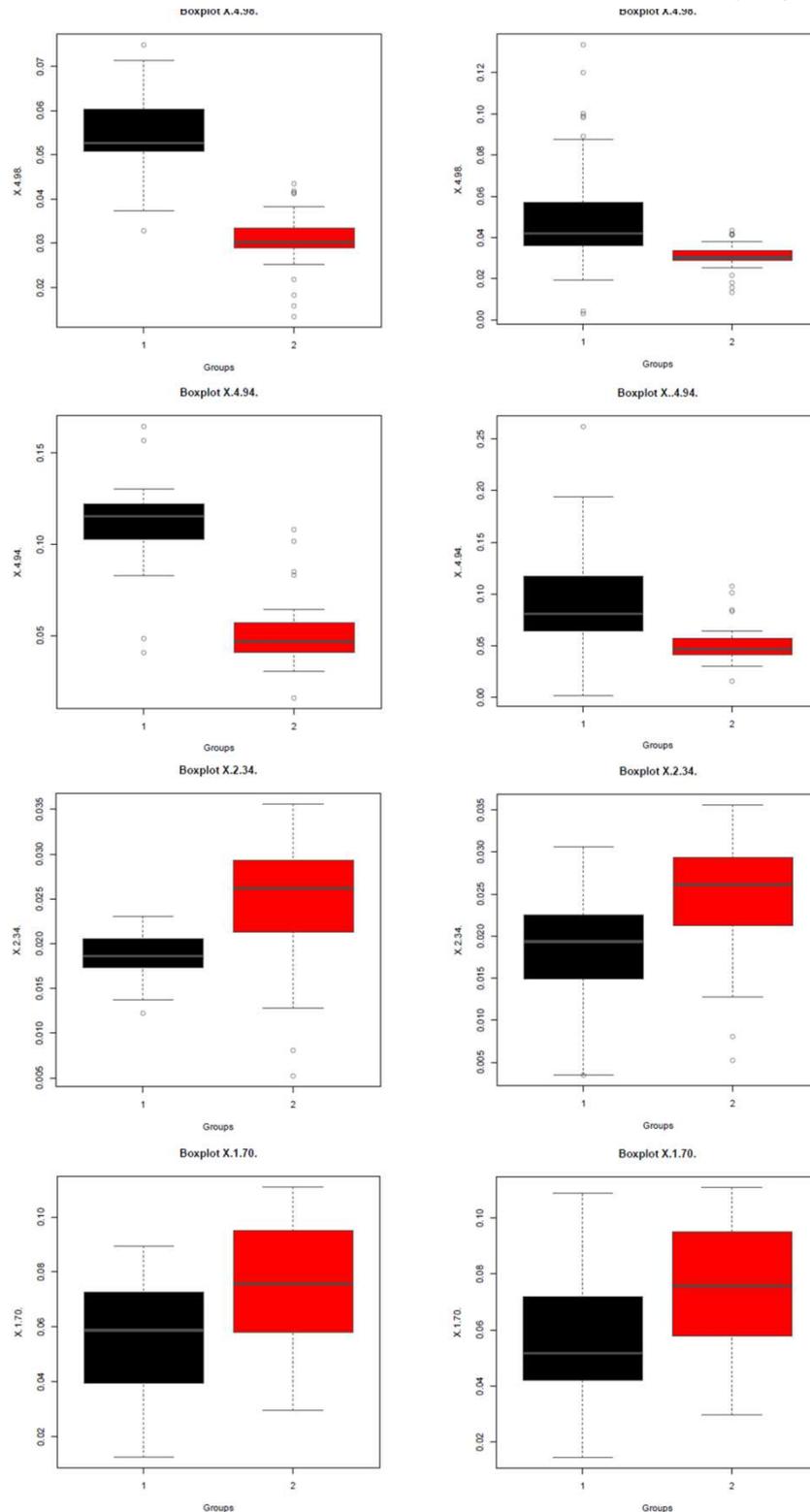
de cerca de 0,05 entre as médias dos valores entre pacientes não-trombólise e controle e menor que 0,02 entre pacientes trombólise e controle. Os *buckets* centrados em  $\delta$  2,34, correspondente a PE e SM, e em  $\delta$  1,70, referente a PCol, apresentaram maiores intensidades no grupo controle em ambos casos. O *bucket* em  $\delta$  2,34 apresentou diferença entre as médias um pouco maior de 0,005 entre os grupos e o *bucket* em  $\delta$  1,70 de cerca de 0,02 para ambos os grupos. Percebe-se assim que o metabólito responsável pela maior discriminação do grupo não-trombólise em relação ao grupo trombólise é  $P_i$ .

Portanto, compararam-se os grupos trombólise e não-trombólise, porém não se observou discriminação satisfatória nas análises por PCA, tanto no AMIX como no *muma*. Coerentemente, o gráfico Volcano correspondente (Figura 39C) não apresentou variáveis significantes. Portanto, a diferença observada entre pacientes que sofreram AVEi, independentemente do tratamento recebido, e controle é maior do que entre os pacientes trombólise e não-trombólise.



**Figura 39:** Gráficos Volcano das comparações entre os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  das amostras de soro sanguíneo dos pacientes (A) não-trombólise e controle, (B) trombólise e controle, (C) não-trombólise e trombólise. Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor- $p$  máximo de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas.

Pacientes não-trombólise (Grupo 1) versus Pacientes de controle (Grupo 2),  
 Pacientes trombólise (Grupo 1) versus Pacientes de controle (Grupo 2)



**Figura 40:** *Boxplots* dos *buckets* centrados em 1,70, 2,34, 4,94 e 4,98 (de baixo para cima) das análises entre pacientes não-trombólise versus controle (coluna da esquerda) e entre pacientes trombólise versus controle (coluna da direita). O *boxplot* representa o

valor médio (linha cinza dentro da caixa), o desvio padrão (limites da caixa), a faixa de valores (linha pontilhada) e as amostras anômalas (círculos acima e abaixo da caixa).

Com respeito aos metabólitos encontrados nas análises dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , um estudo do metabolismo energético cerebral por meio de RMN de  $^{31}\text{P}$  *in vivo* em gatos com oclusão da artéria cerebral média revelou aumento nos níveis de  $\text{P}_i$  em especial no caso de AVE agudo, tanto durante a ocorrência do AVEi como nos períodos de recuperação. Este foi acompanhado pela diminuição nos níveis de ATP, sendo que a degradação de ATP gera ADP, AMP e fosfatos inorgânicos livres (Komatsumoto e *col.*, 1987). Estudo similar do metabolismo energético e o pH do cérebro ao ocorrer isquemia cerebral focal em humanos também mostrou aumento significativo de  $\text{P}_i$  e redução de ATP na presença de acidose cerebral (Levine e *col.*, 1992). A degradação de ATP celular é um fenômeno comum causado por estresse ou por fatores endógenos como através de enzimas hidrolíticas, resultando em aumento dos níveis de  $\text{P}_i$  no soro sanguíneo, conforme observados em ratos após exposição ao frio (Haque e Shima, 2006). Estas observações podem justificar o fato dos fosfatos inorgânicos ( $\text{P}_i$ ) terem sido encontrados em maior intensidade nas amostras de sete dias de AVEi de pacientes não-trombólise em relação as amostras de controle.

Por sua vez, os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  das amostras de controle apresentaram o conjunto de sinais correspondentes a PCol e a sobreposição de PE e SM em maior intensidade em relação às amostras de AVEi. Isto concorda com dados da literatura que as células cerebrais perdem PCol e SM além de outros fosfolípídeos em decorrência da isquemia (Rao e *col.*, 2002; Chen e *col.*, 2012), e também com o resultado obtido a partir das análises dos respectivos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em que se encontraram maiores concentrações de colina, que inclui PCol, nas amostras de pacientes de controle.

Esta foi a única análise quimiométrica dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  dentre as realizadas em que se observou discriminação.

#### 4.1.6.6.3 Principais metabólitos encontrados

Os metabólitos que apresentaram maiores variações nas concentrações nas amostras A1, A1t e A7 em relação às amostras C1 estão apresentados na Tabela 8 juntamente da variação encontrada. Nota-se que alguns metabólitos estão relacionados a mecanismos desencadeados pelo estresse, podendo, portanto estar apresentando variações devido ao estresse decorrente da ocorrência do AVEi e talvez não diretamente à doença.

**Tabela 8:** Principais metabólitos que sofreram alterações em suas concentrações após o AVEi.

<b>Metabólito</b>	<b>Varição<sup>1</sup></b>	<b>Possíveis vias metabólicas afetadas</b>
Colesterol	↓	Relatos na literatura também reportam a diminuição nos níveis de colesterol após o AVEi (Laborde <i>et al.</i> , 2011), estando até mesmo associado com bom prognóstico.
Leucina	↓	Metabolismo de estresse, energético e muscular. Em situações de estresse requerem proporcionalmente mais leucina (Wishart <i>et al.</i> , 2013; Jung <i>et al.</i> , 2011).
Isoleucina	↓	Metabolismo de estresse, energético e muscular. Em situações de estresse requerem proporcionalmente mais isoleucina (Wishart <i>et al.</i> , 2013; Jung <i>et al.</i> , 2011).
Alanina	↑	Encontrado em maiores concentrações em tecidos cerebrais de ratos com oclusão da artéria cerebral (Chen <i>et al.</i> , 2012). Não se encontrou se encontrou quais possíveis vias metabólicas estão sendo afetadas pelo AVEi.
Acetoacetato	↑	Ainda não correlacionado com fatores diretamente ligados com o AVEi, porém concentrações anormais deste metabólito no sangue podem estar relacionadas a diabetes, fator de risco presente em alguns pacientes (Wishart <i>et al.</i> , 2013).
Piruvato	↑	Metabolismo energético, sendo produzido na glicólise anaeróbica da glucose sérica, aumentando, portanto sua produção em situações em que o oxigênio disponível diminui (Jung <i>et al.</i> , 2011).
Glutamina	↑	Relacionado com a inibição do ciclo glutamato-glutamina (Yang <i>et al.</i> , 2012) e com a regulação da expressão da proteína fibrilar glial ácida após a isquemia (Jung <i>et al.</i> , 2011).
Glucose	↑	Pode estar relacionada à elevação deste metabólito na extremidade da região isquêmica e na diminuição da utilização de glucose pelas células cerebrais

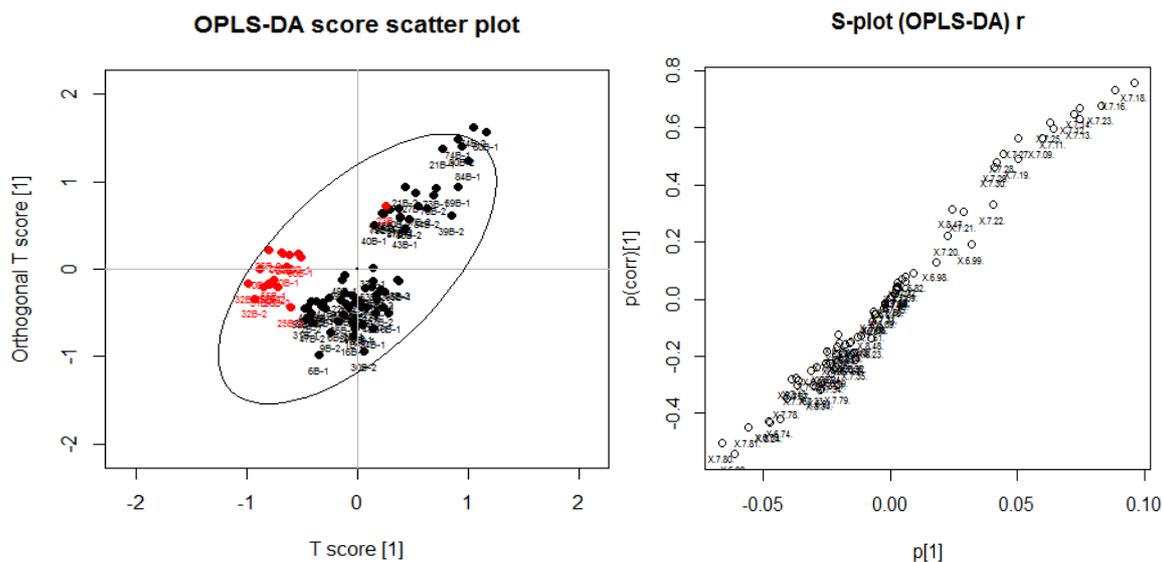
		(Yang <i>et al.</i> , 2012) ou à dislipidemia (Wishart <i>et al.</i> , 2013).
Colina e derivados	↓	Células cerebrais perdem fosfolípidos em decorrência da isquemia (Rao <i>e col.</i> , 2002; Chen <i>e col.</i> , 2012).
Fosfatidiletanolamina	↓	Células cerebrais perdem fosfolípidos em decorrência da isquemia (Rao <i>e col.</i> , 2002; Chen <i>e col.</i> , 2012).
Esfingomiélin	↓	Células cerebrais perdem fosfolípidos em decorrência da isquemia (Rao <i>e col.</i> , 2002; Chen <i>e col.</i> , 2012).
Fosfatos inorgânicos	↑	Resultante da degradação de ATP celular, fenômeno causado por estresse ou por fatores endógenos como através de enzimas hidrolíticas (Komatsumoto <i>e col.</i> , 1987; Levine <i>e col.</i> , 1992; Haque e Shima, 2006).
Fenilalanina	↑	Compete com valina, leucina e isoleucina no metabolismo cerebral (Wishart <i>et al.</i> , 2013).
Tirosina	↓	Não se encontrou relação com o AVEi ou fatores de risco.
Histidina	↓	Não se encontrou relação com o AVEi ou fatores de risco.
Hipoxantina	↑	Não se encontrou relação com o AVEi ou fatores de risco.
Formato	↑	Relacionado à deficiência de ácido fólico e hiperhomocisteinemia, a qual tem sido relacionada a AVE, doenças cardiovasculares e demências (Jung <i>et al.</i> , 2011, Wishart <i>et al.</i> , 2013). Elevados níveis de formato podem acelerar o metabolismo de acidose após o AVE (Jung <i>et al.</i> , 2011).

<sup>1</sup>Aumento (↑) ou (↓) diminuição nas concentrações do metabólito nas amostras de pacientes que sofreram AVEi em relação aos pacientes de controle.

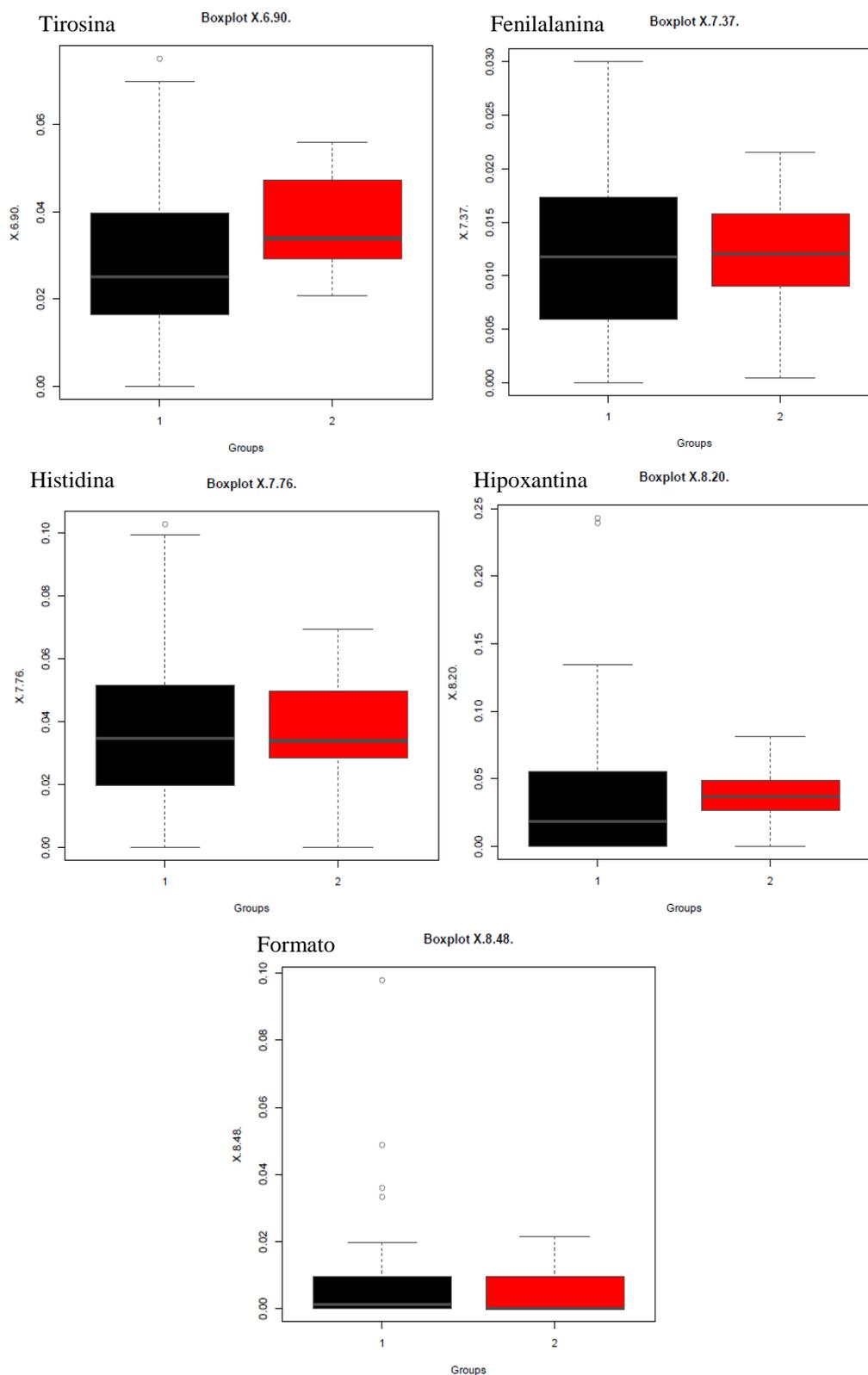
#### 4.1.6.7 Discriminação entre amostras de pacientes que receberam ou não tratamento trombolítico

Visto a necessidade de se determinar rapidamente quais pacientes devem receber o tratamento trombolítico bem como para tentar perceber alguma diferença na composição química do soro de pacientes tratados ou não com trombolítico, realizaram-se análises com as amostras de soro dos dois grupos após a ocorrência do AVEi. Estas análises se iniciaram pelas amostras A1 e C1. No entanto, não se observou discriminação significativa para nenhuma das análises realizadas, tanto para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  como para  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , e, portanto, não se pode indicar nenhum metabólito como indicativo da necessidade do trombolítico. Nas análises para os demais períodos observou-se pequena discriminação parcial para alguns conjuntos de dados das amostras A7, A30 e A90. Porém a análise estatística de significância destas análises mostrou nenhum ou poucos *buckets* significantes. Portanto, estes conjuntos de dados foram submetidos a análise no *muma* após o modo de escalamento ser alterado para soma das intensidades totais e consideradas as variáveis com no mínimo 5% da variância explicada.,

O conjunto de dados considerando a região aromática ( $\delta$  6,5-9,0) no caso dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com sequência de pulso *cpmgpr1d*, das amostras A7 obteve-se a melhor discriminação para PC2 *versus* PC7 com escalamento *vaste*, sendo que os resultados com e sem normalização foram muito semelhantes. Obtendo-se valor-*p* calculado a partir de testes F de  $6,39 \times 10^{-10}$  e variância total explicada de 6,7%. Embora a variância explicada seja pequena, o gráfico de OPLS-DA apresentou discriminação parcial (Figura 41). Após análise univariada, apenas uma variável mostrou ser significativa em  $\delta$  8,24, sinal não atribuído. Os *buckets* considerados na análise foram:  $\delta$  6,73; 6,74; 6,82; 6,83; 6,89-6,91; 6,93-6,96; 6,98-7,01; 7,03-7,07; 7,09; 7,11-7,14; 7,16; 7,18-7,23; 7,25; 3,27-7,31; 7,33-7,37; 7,39-7,41; 7,43; 7,45-7,47; 7,49-7,51; 7,61-7,63; 7,65; 7,68; 7,69; 7,71-7,81; 8,17-8,21; 8,23; 8,24; 8,32; 8,34; 8,47; 8,48. Além de diversos sinais não atribuídos, estes incluíram tirosina, histidina, fenilalanina, hipoxantina e formato. A Figura 42 mostra como estas substâncias variaram entre os grupos. Percebe-se que enquanto a tirosina e hipoxantina apresentaram intensidades um pouco maiores para o grupo não-trombolise, as demais foram similares em ambos os grupos.

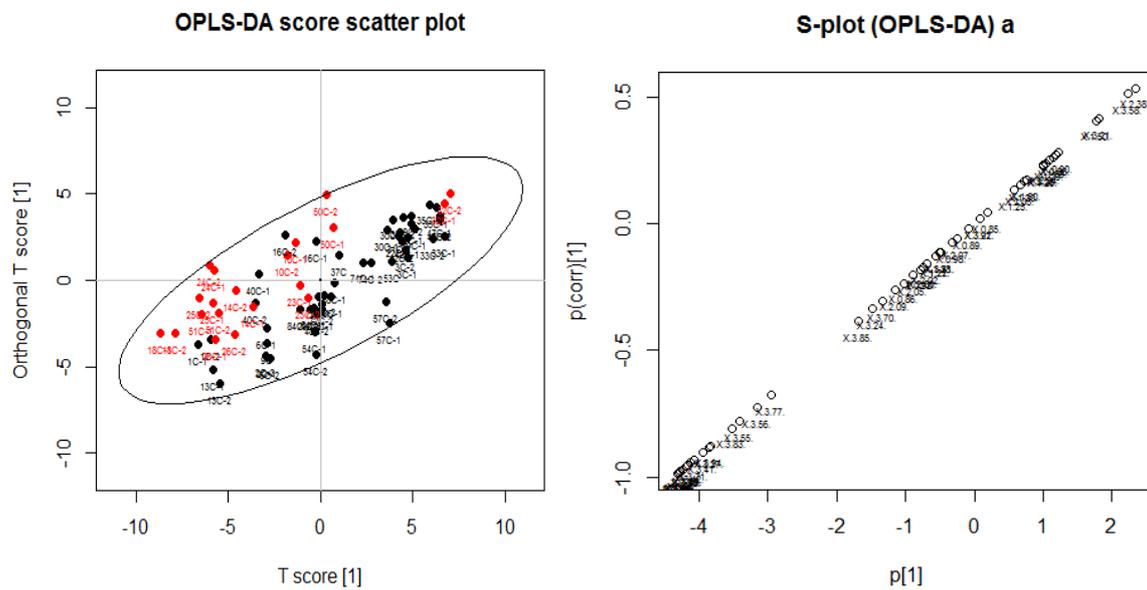


**Figura 41:** Gráficos de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A7 de pacientes que sofreram AVEi trombólise (preto) e não-trombólise (vermelho). Análises realizadas no *muma*.

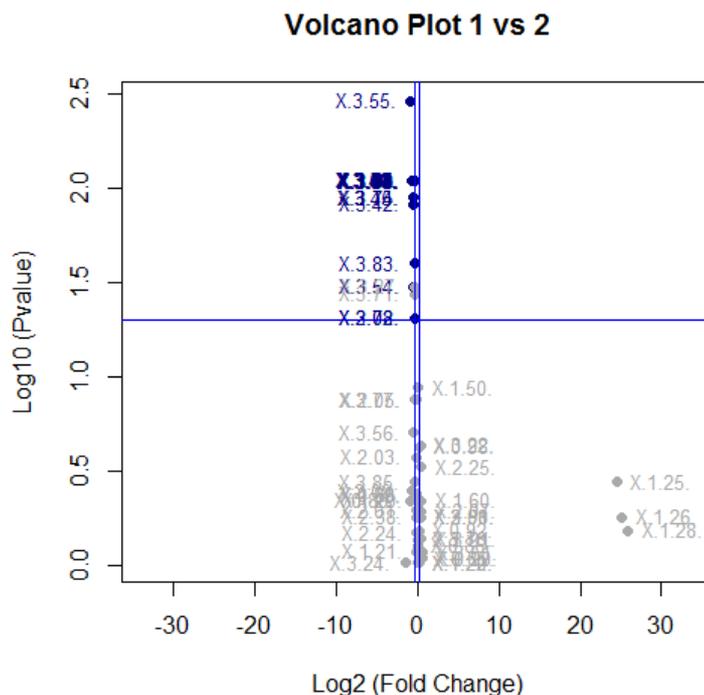


**Figura 42:** *Boxplots dos buckets* centrados em  $\delta$  6,90, 7,37, 7,76, 8,20 e 8,48 das análises entre pacientes não-trombólise (vermelho) *versus* pacientes trombólise (preto). O *boxplot* representa o valor médio (linha cinza dentro da caixa), o desvio padrão (limites da caixa), a faixa de valores (linha pontilhada) e as amostras anômalas (círculos acima e abaixo da caixa).

Para as amostras A30 e A90, utilizou-se a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* da região alifática  $\delta$  0,4-4,0. As separações obtidas foram inferiores às da análise anterior, conforme se observa no gráfico de OPLS-DA (Figuras 43 e 44). No caso das amostras A30 (Figura 43), o melhor resultado foi para PC1 versus PC4 com escalamento auto e sem normalização. Obteve-se discriminação parcial com valor-*p* calculado a partir de testes F de  $9,08 \times 10^{-5}$  e variância total explicada de 46,0%. No entanto, conforme observado no gráfico Volcano (Figura 44), diversos *buckets* foram significantes:  $\delta$  2,02; 3,25; 3,27; 3,41; 3,42; 3,44; 3,45; 3,47; 3,48; 3,50; 3,53-3,55; 3,71; 3,73; 3,74; 3,76; 3,78; 3,79; 3,83; 3,84; 3,89; 3,93; 3,94, referentes a glicoproteína e  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose.



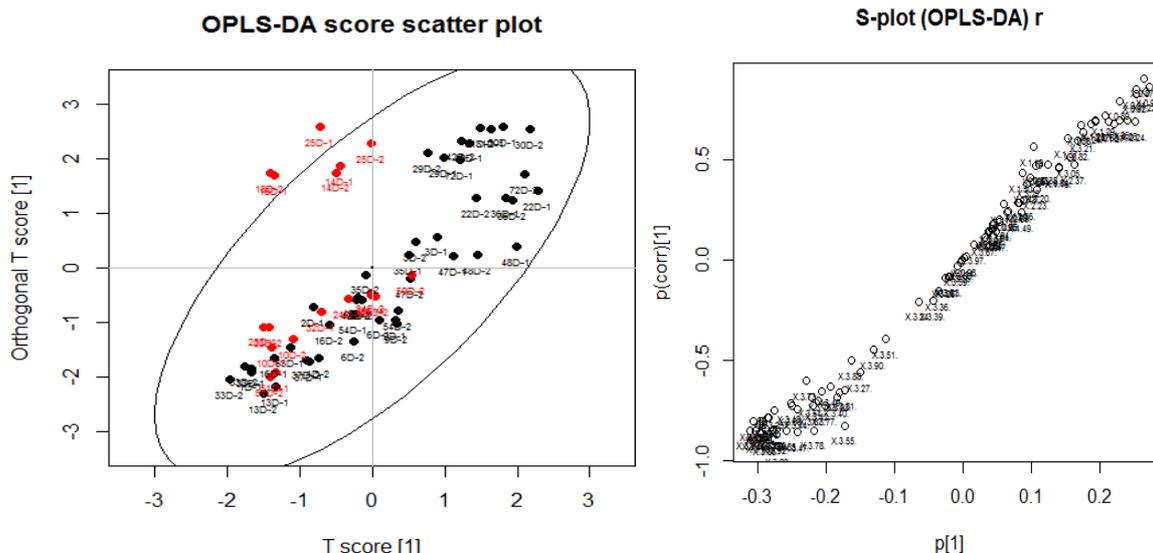
**Figura 43:** Gráficos de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A30 de pacientes que sofreram AVEi trombólise (preto) e não-trombólise (vermelho). Análises realizadas no *muma*.



**Figura 44:** Gráfico Volcano das comparações entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A30 de soro sanguíneo dos pacientes não-trombólise e trombólise. Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas.

Quanto à análise das amostras A90, o melhor resultado foi para PC2 *versus* PC5 com escalamento *range* e com normalização. Obteve-se valor- $p$  calculado a partir de testes F de  $6,96 \times 10^{-4}$  e variância total explicada de 19,5%. No entanto, observando o gráfico de OPLS-DA (Figura 45) percebe-se grande sobreposição entre os grupos. Ainda assim os *buckets* em  $\delta$  0,87; 1,22; 3,05; 3,78; e 3,82 foram significantes.

Portanto, a melhor discriminação foi para as amostras de sete dias após o AVEi, amostras A7, sendo que apenas neste período é possível notar discriminação significativa nas análises no *muma*. Considerando que o trombolítico é administrado nas primeiras horas após o AVEi, seu efeito não foi notado nas primeiras 24 horas, mas após sete dias percebe-se um potencial efeito do trombolítico, deixando de ser notado nos períodos a frente. Embora as diferenças entre as intensidades dos sinais tenha sido pequena entre os grupos, estas observações podem auxiliar na compreensão dos efeitos do tratamento.



**Figura 45:** Gráficos de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras A90 de pacientes que sofreram AVEi trombólise (preto) e não-trombólise (vermelho). Análises realizadas no *muma*.

#### 4.1.6.8 Discriminação entre amostras de pacientes de acordo com a etiologia da doença

O AVEi é normalmente dividido nas seguintes etiologias: cardioembólica, aterosclerótica, pequenos vasos e causas criptogênicas (ou desconhecidas). Porém, apenas cerca de 30% dos pacientes com AVEi tem a etiologia identificada. Assim, biomarcadores podem melhorar a capacidade de identificar a etiologia nos casos criptogênicos, e com isso permitir que o tratamento adequado seja iniciado o quanto antes. Neste respeito, foram realizadas análises de acordo com a etiologia considerando apenas os pacientes trombólise e incluindo os não-trombólise. Não foram feitas análises apenas com as amostras de pacientes não-trombólise devido ao pequeno número de amostras com etiologia identificada neste grupo, sendo cinco no grupo aterosclerose, dois no embólico, um nas outras etiologias e dois com etiologia indefinida.

As análises quimiométricas com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ou  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  das amostras A1 não mostraram discriminação entre os grupos aterosclerótico, embólico, outros e indefinido em nenhum caso, seja com todas as amostras ou apenas as amostras de trombólise. Variaram-se os parâmetros utilizados, porém sem sucesso. Uma discriminação parcial foi observada quando considerado a região aromática dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com sequência de pulso *cpmgpr1d* utilizando o método avançado para construção dos *buckets* apenas para os grupos embólico e aterosclerótico. Porém após análise estatística de significância, excluindo os *buckets* com variância menor que 35%, nenhum *bucket* apresentou valor-*p* menor que valor- $\alpha$  de Bonferroni corrigido de  $P < 7,94 \times 10^{-4}$ .

A dificuldade em discriminar os pacientes segundo a etiologia por meio dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  aumentou com o aumento do número de pacientes. Isto indica que a variância entre pacientes foi maior do que as diferenças decorrentes de cada etiologia, não sendo possível identificar metabólitos que identifiquem com certeza uma etiologia ou outra.

#### **4.1.6.9 Discriminação entre amostras de pacientes de acordo com o prognóstico**

O prognóstico após o AVEi varia grandemente, sendo dependente de fatores relacionados a cada paciente, tais como, severidade do AVEi e idade, além de potenciais complicações relacionadas ao AVEi, como aumento da pressão intracranial e infecções, estas muitas vezes evitáveis se previstas previamente (Meisel *et al.*, 2012). Biomarcadores que predigam o prognóstico podem ser úteis para monitorar a resposta a terapias ou direcionar qual a melhor terapia para subgrupos específicos (Jickling *et al.*, 2011).

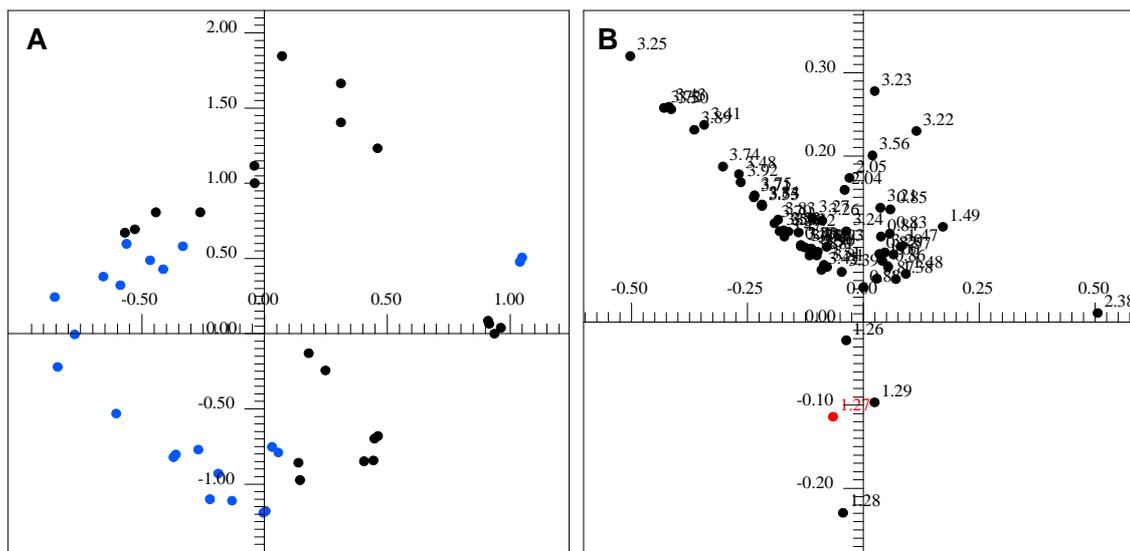
Este estudo do prognóstico é especialmente importante para os pacientes trombolise porque enquanto 50% dos pacientes que recebem tratamento trombolítico conseguem a recanalização completa ou parcial da artéria cerebral média, um terço destes pacientes também apresenta agravamento neurológico. Além disso, existe o risco do paciente desenvolver AVEi sintomático, o que faz com que muitos médicos relutem em aplicar o tratamento. Como nem todas as formas de AVEi são sintomáticas ou danosas, um biomarcador que seja capaz de prever um prognóstico ruim após a administração do trombolítico otimizaria a seleção de pacientes que devem recebê-lo, melhoraria a seleção dos pacientes, a estratificação e a captação e gestão de tratamento (Hasan *et al.*, 2012). Até o momento, pela metanálise conduzida por Hasan e colaboradores (2012) apenas a glucose foi repetidamente associada com prognóstico ruim após o AVEi e após o tratamento trombolítico. Além disso, glutamato foi encontrado como sendo um indicador de prognóstico progressivo, D-dímero como previsor de morte ainda no hospital e altas concentrações de fibrinogênio mostraram estar associadas a prognóstico ruim após três meses da ocorrência do AVEi (Hasan e *col.*, 2012). Glutamato é considerado um potencial biomarcador de AVEi, visto ser o neurotransmissor mais abundante no cérebro, e é provável que altas concentrações do mesmo indiquem a extensão do dano neurológico e, portanto possa ser usado para prever novos AVEi (Hasan *et al.*, 2012), o que não ocorreu com nenhum dos pacientes deste estudo no período em que foram acompanhados.

O prognóstico dos pacientes foi dividido em precoce, intermediário e tardio, classificados em bom e ruim conforme pontuação na escala Rankin, conforme mostra o Gráfico 7. Foram consideradas as amostras A para tentar prever o prognóstico já nas

primeiras horas utilizando os dados de prognóstico precoce. Similarmente, foram utilizadas as amostras A90, que equivalem ao período de três meses após o AVEi juntamente com os dados de prognóstico intermediário e as amostras E, coletadas após seis meses após o AVEi, juntamente com os dados de prognóstico tardio. As análises foram realizadas com as amostras de pacientes trombólise e não-trombólise separadamente, tendo em vista resultados prévios, em que houve uma clara discriminação entre as amostras de pacientes de trombólise e não-trombólise quando se considerou apenas os pacientes com prognóstico precoce ruim.

Iniciando as análises pelo prognóstico precoce, não se observou discriminação entre as amostras A1 dos pacientes trombólise com prognóstico bom e ruim, independente do espectro ou parâmetros utilizados. A análise equivalente com as amostras dos pacientes não-trombólise mostrou discriminação parcial entre prognóstico precoce bom e ruim com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Porém, provavelmente devido ao pequeno número de amostras (três pacientes para prognóstico bom e nove no ruim), obteve-se gráficos de *X-loadings* inconclusivos, valores negativos de variância explicada em Y, *buckets* referentes a ruídos com alta variância e valores de RMSECV incoerentes, por exemplo, RMSECV igual a zero. Portanto, o resultado não se mostrou confiável. Como o número de amostras A90 e A180 referentes aos pacientes não-trombólise eram ainda menores que de amostras A (Figura 2), não se fez as análises para prognóstico intermediário e tardio, respectivamente.

Quanto às análises referentes ao prognóstico intermediário, as amostras A90 dos pacientes trombólise foram analisadas e foi observada a discriminação parcial entre as amostras com prognóstico bom e ruim, sendo que as amostras do paciente 72, de prognóstico ruim, ficaram agrupadas com as de bom prognóstico (Figura 46A). Este resultado foi obtido considerando a região alifática ( $\delta$  0,4-4,0) dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d*, e método especial de integração. Foi obtido valor de RMSECV de 0,044, variância explicada em X de 97,5% e em Y de 89,5%. Com os dados fornecidos pelo gráfico de *X-loadings* (Figura 46B), apenas um *bucket* em  $\delta$  1,27, o qual faz parte de uma região referentes a lipídeos, especialmente LDL e VLDL, mostrou ser estatisticamente significativa (valor- $p = 5,60 \times 10^{-4}$ ), sendo o valor- $\alpha$  de Bonferroni corrigido foi de  $p < 7,94 \times 10^{-4}$ , determinado após omitir *buckets* com menos de 20% de variância. No estudo de Jung e colaboradores (2011), sinais de lipídeos foram encontrados em maior concentração em pacientes saudáveis, sendo aqui encontrado em maior intensidade nos pacientes com prognóstico intermediário ruim.



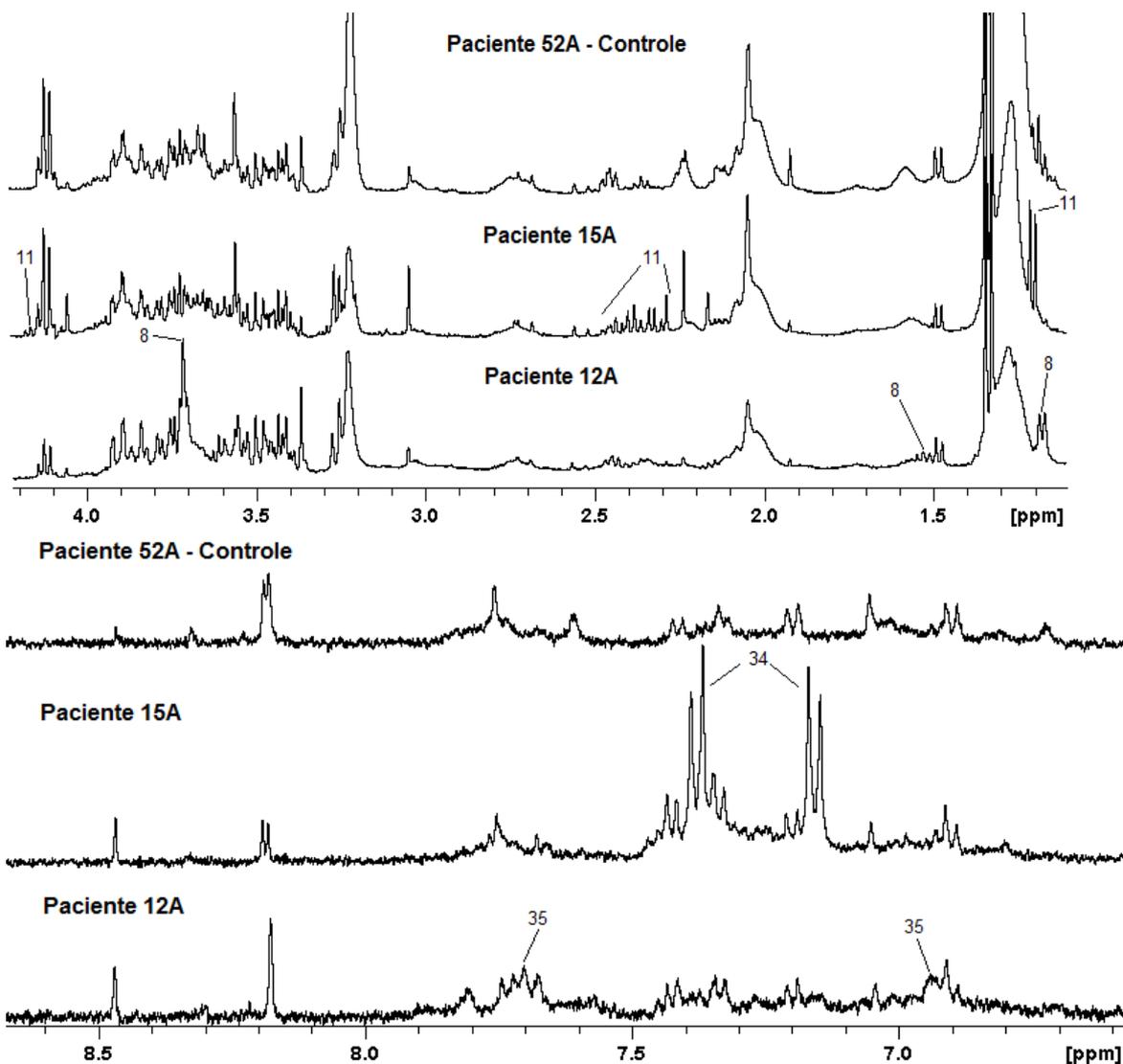
**Figura 46:** (A) Gráfico de escores de PC1 (66,9%) versus PC2 (14,6%) discriminado os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* considerando a região de  $\delta$  0,4-4,0 das amostras A90 de pacientes trombólise com prognóstico intermediário bom (preto) e ruim (azul). (B) Gráfico de *X-loadings*. *Buckets* considerados como significantes (valor- $p$  < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor- $p$ : azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto.

As amostras A180 foram consideradas nas análises com os dados de prognóstico tardio, e observou-se discriminação entre as amostras com prognóstico bom e ruim para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com sequência de pulso *cpmgpr1d*, considerando a região aromática ( $\delta$  6,5-9,0) e o modo especial de integração. Porém após análise estatística de significância nenhum *bucket* mostrou-se significativo, determinados após omitir *buckets* que continham menos de 72% de variância, e *buckets* em regiões excluídas, com valor- $p$  abaixo do valor- $\alpha$  de Bonferroni corrigido foi de  $p < 2,82 \times 10^{-4}$ .

As análises dos três períodos dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* da região de  $\delta$  0,4-4,0 foram submetidas a análise no *muma*. No entanto, não se observou discriminação satisfatória em nenhum dos casos. Portanto, não foi possível obter marcadores referentes ao prognóstico.

Com respeito aos pacientes que sofreram óbito, destaca-se que, em uma análise visual, dois pacientes que sofreram óbito em menos de uma semana após o AVEi apresentaram perfis espectrais bem diferentes dos demais, até mesmo sendo observados sinais que não foram encontrados em nenhum outro paciente, como mostra a Figura 47. Dentre os sinais destacados, apenas os sinais referentes ao 3-hidroxiacetato, presente no paciente 15 amostra A1, foi identificado. Este metabólito é um corpo cetônico, cujas concentrações sanguíneas permitem monitorar a cetoacidose diabética

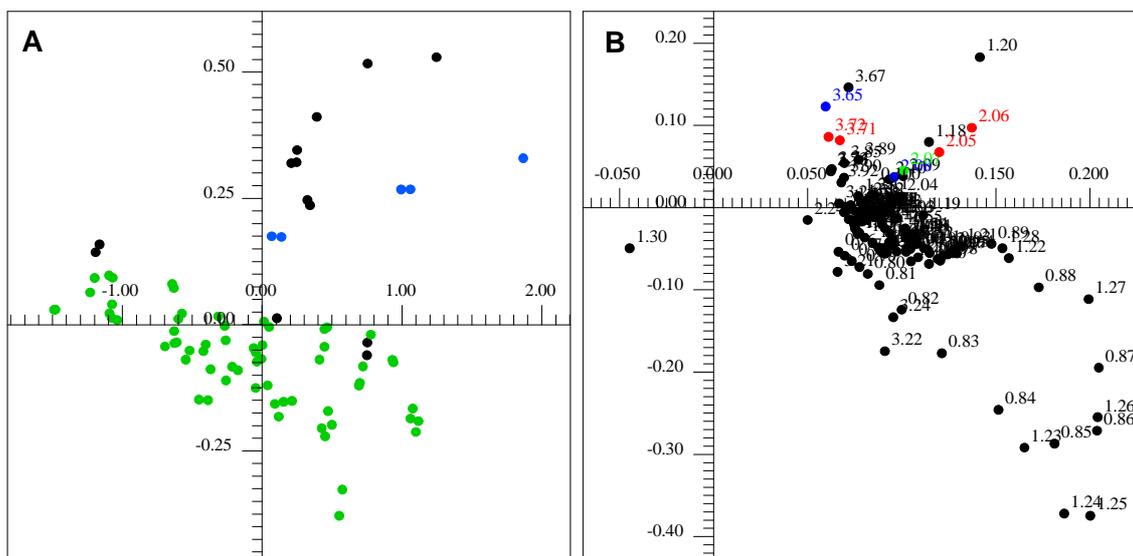
em pacientes com diabetes *mellitus*, além de já ter sido correlacionado a obesidade em mulheres (Wishart e col., 2013).



**Figura 47:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra C1 do pacientes 52 (controle) e das amostras A1 dos pacientes 15 e 12 que sofreram óbito em menos de uma semana após o AVEi. Espectros adquiridos com sequência de pulso *cpmgpr1d* com atribuições segundo numeração seguida pela Tabela 3. Acima região de 1,1 a 4,2 ppm e abaixo de 6,6 a 8,6 ppm.

Portanto, para avaliar possíveis diferenças nas amostras dos pacientes que sofreram óbito tanto de pacientes trombólise como de não-trombólise, realizaram-se análises quimiométricas entre as últimas amostras dos pacientes que sofreram óbito e as amostras C1 e C90 os pacientes de controle. Foram incluídos estes dois períodos para corresponder ao período abrangido pelas amostras de óbito, sendo este de até três meses após o AVEi. Observou-se discriminação parcial, conforme apresentado na Figura

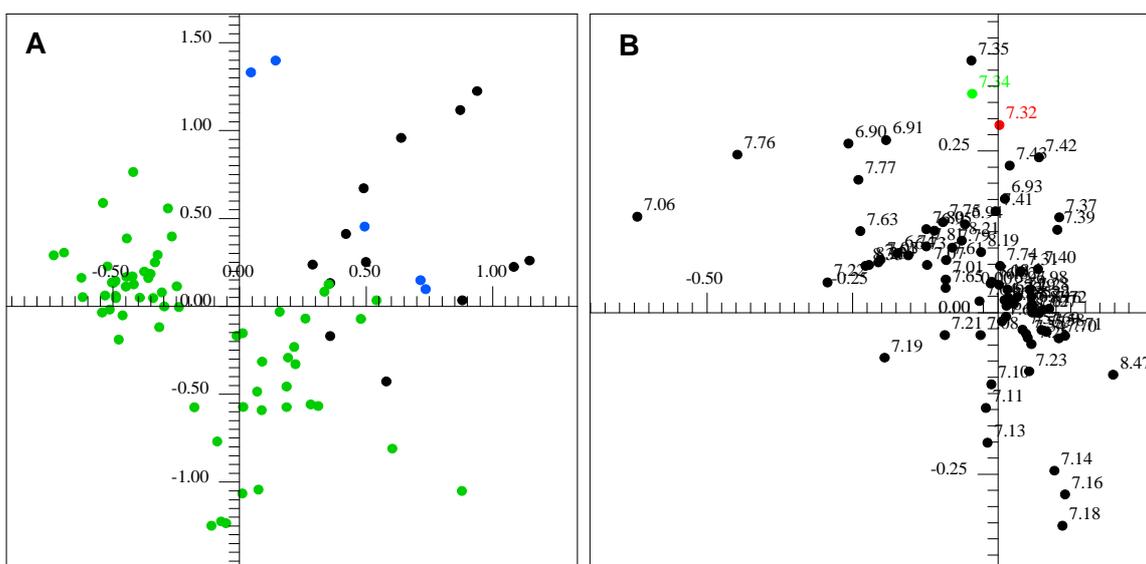
48 para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* e modo de integração pela soma das intensidades absolutas. O valor de RMSECV foi de 0,328, com variância explicada em X de 97,2% e em Y de 65,5%. As amostras dos pacientes 5A, 36D e 43B ficaram próximas às amostras de controle. Ainda assim, nota-se uma discriminação em PC2, sendo que as amostras de óbito encontram-se especialmente em escores positivos de PC2. Os *buckets* estatisticamente significantes foram  $\delta$  2,05 (vermelho, valor- $p = 6,75 \times 10^{-5}$ ), 2,06 (vermelho, valor- $p = 8,26 \times 10^{-5}$ ), 2,07 (verde, valor- $p = 3,19 \times 10^{-4}$ ) e  $\delta$  2,08 (azul, valor- $p = 4,34 \times 10^{-4}$ ) e 3,65 (azul, valor- $p = 2,84 \times 10^{-4}$ ), 3,71 (vermelho, valor- $p = 3,14 \times 10^{-5}$ ) e 3,72 (vermelho, valor- $p = 3,33 \times 10^{-6}$ ), os quais se encontram em maiores intensidades nas amostras de óbito (Figura 48B). O valor- $\alpha$  de Bonferroni corrigido foi de  $p < 2,82 \times 10^{-4}$  determinado após omitir *buckets* que continham menos de 30% de variância e comparando as amostras de controle com as demais. Analisando os espectros, os sinais em  $\delta$  2,05-2,08 englobam sinais de lipídeos de glicoproteínas, enquanto os sinais em  $\delta$  3,65, 3,71 e 3,72, referem-se a região de sobreposição de sinais de etanol, e especialmente de açúcares como  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose, sendo que estes podem fazer parte da própria glicoproteína. Todos os sinais estão em maior intensidade nas amostras dos pacientes que sofreram óbito. Não se encontrou uma explicação para correlacionar glicoproteínas com a ocorrência do AVEi. Pela análise do gráfico de *X-loadings* (Figura 48B) nota-se que sinais em  $\delta$  0,82-0,88, 1,23-1,26 e 3,22, referentes a colesterol, lipídeos e colina, embora não significantes, estão em maior intensidade nas amostras de controle.



**Figura 48:** (A) Gráfico de escores de PC1 (91,2%) versus PC2 (3,0%) discriminado os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* considerando a região de  $\delta$  0,4-9,0 das amostras de pacientes trombólise (preto) e não-trombólise (azul) que sofreram óbito e dos pacientes de controle (verde). (B) Gráfico de *X-loadings*. *Buckets* considerados como significantes (valor- $p <$  valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são

coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto.

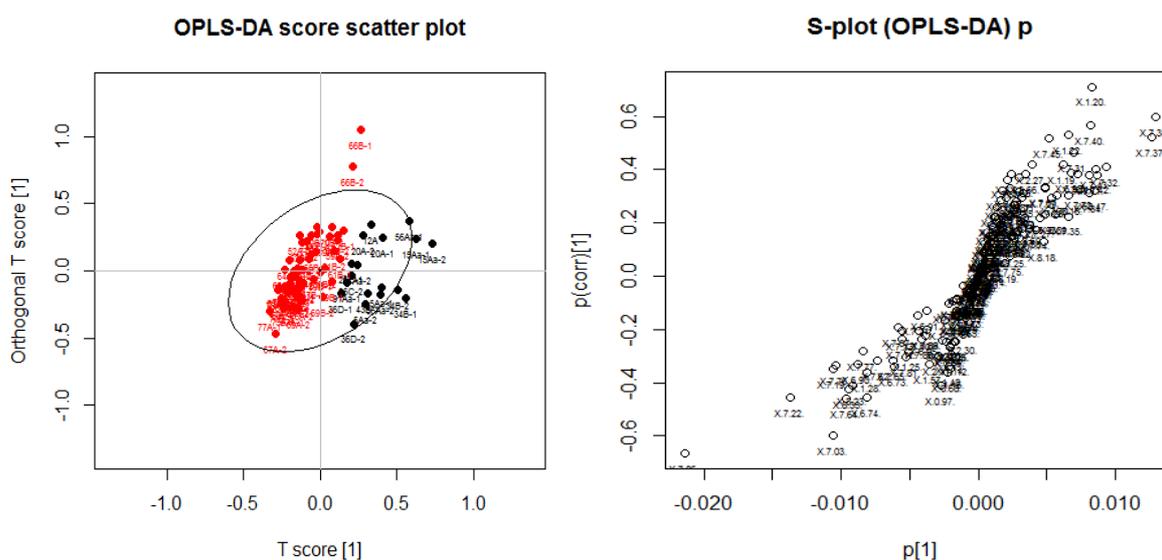
A mesma análise considerando a região aromática ( $\delta$  6,5-9,0) dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com sequência de pulso *cpmgpr1d* e o método avançado de construção de *buckets*, também apresentou discriminação parcial (Figura 49A), embora não tão significativa quanto a anterior. O valor de RMSECV foi de 0,322, com variância explicada em X de 54,7% e em Y de 58,3%. Conforme o gráfico de *X-loadings* (Figura 49B), os *buckets* significantes foram  $\delta$  7,32 (vermelho, valor-*p* =  $1,33 \times 10^{-5}$ ) e 7,34 (verde, valor-*p* =  $4,17 \times 10^{-4}$ ), em maior intensidade nas amostras dos pacientes que sofreram óbito, e referem-se à fenilalanina. O valor- $\alpha$  de Bonferroni corrigido foi de valor-*p* <  $6,58 \times 10^{-4}$  determinado após omitir *buckets* que continham menos de 15% de variância. A fenilalanina também sofreu alterações significativas ao se comparar os pacientes de AVEi não-trombólise com os pacientes de controle.



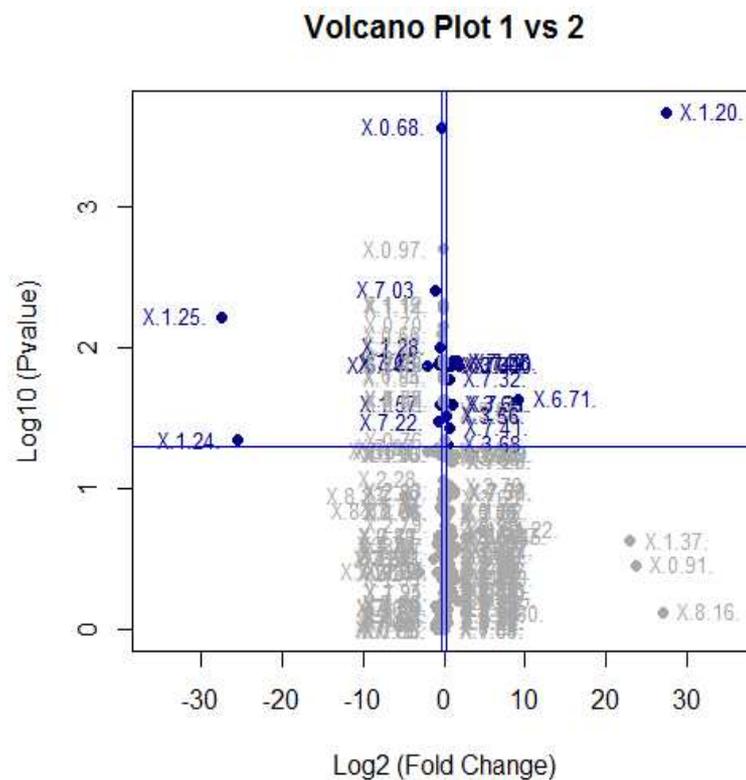
**Figura 49:** (A) Gráfico de escores de PC1 (22,8%) versus PC2 (15,6%) discriminado os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d* considerando a região de  $\delta$  6,5-9,0 das amostras de pacientes trombólise (preto) e não-trombólise (azul) que sofreram óbito e dos pacientes de controle (verde). (B) Gráfico de *X-loadings*. *Buckets* considerados como significantes (valor-*p* < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor-*p*: azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto.

As análises no *muma* resultaram em ótimo valor de separação entre as amostras dos pacientes que sofreram óbito, desta vez sem separar trombólise e não-trombólise, e os pacientes de controle. A análise foi realizada unindo os dados de *buckets* da parte

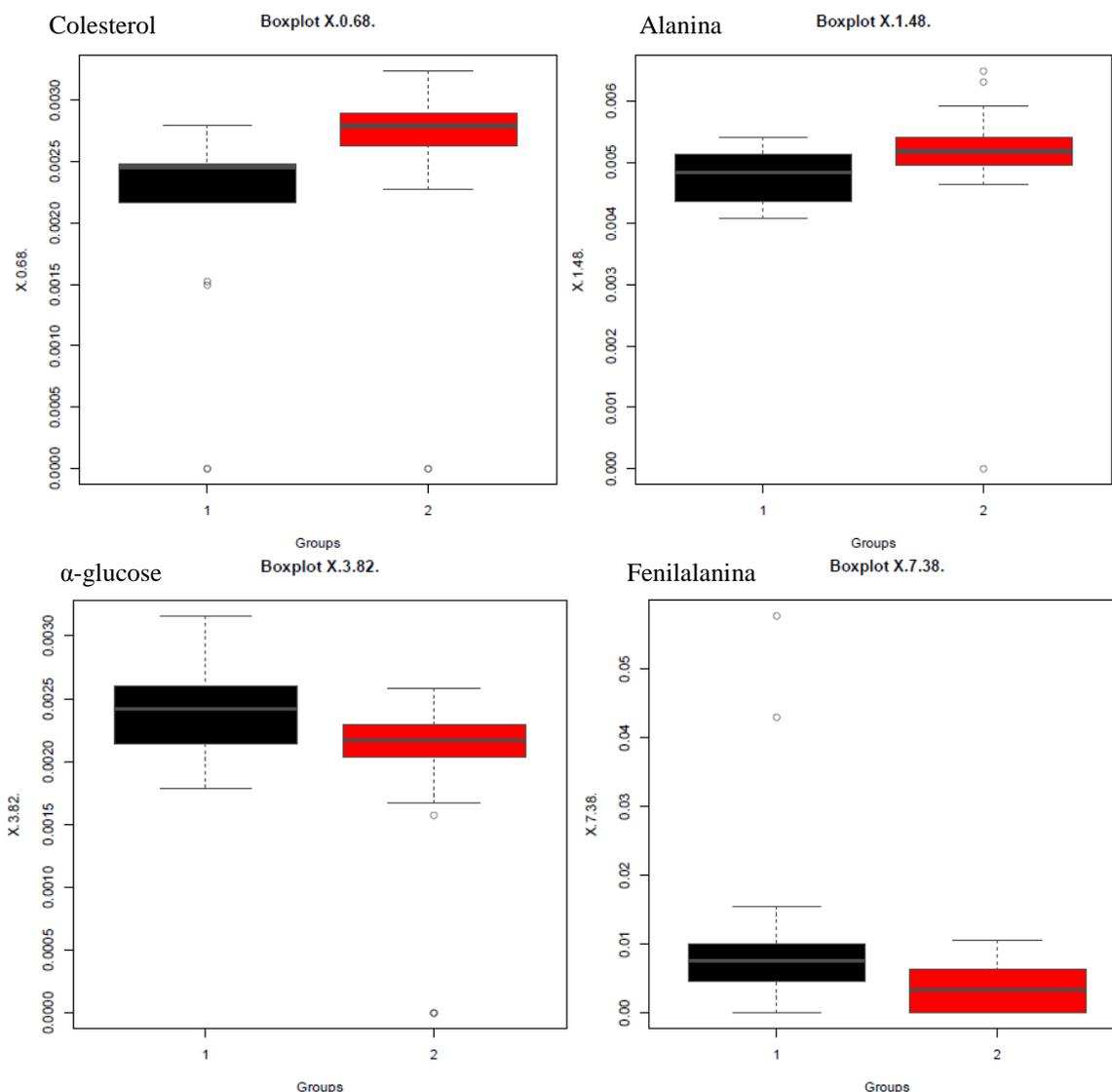
alifática ( $\delta$  0,4-4,0) os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* com a parte aromática ( $\delta$  6,5-9,0) dos espectros adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d*, utilizando modo avançado de *bucketing*, escalamento em relação a intensidade total dos sinais e considerando variáveis com no mínimo 5% da variância explicada. Obteve-se valor-*p* calculado a partir de testes F de  $7,10 \times 10^{-15}$  e variância total explicada de 13,3% para PC3 versus PC6 com escalamento pareto. A análise por OPLSDA é apresentada na Figura 50, mostrando a discriminação entre grupo controle e pacientes que sofreram óbito. Diversos *buckets* foram significantes, conforme mostra o gráfico Volcano (Figura 51). Estes incluíram:  $\delta$  0,63; 0,66; 0,68; 0,70; 0,75; 0,76; 0,95-0,97; 1,12; 1,14; 1,15; 1,20; 1,24; 1,25; 1,28; 1,48; 1,53; 1,54; 1,57; 2,02; 3,23; 3,56; 3,58; 3,66; 3,68; 3,69; 3,82; 6,71; 6,74; 7,03; 7,06; 7,22; 7,31; 7,32; 7,38; 7,40-7,43; 7,57. Estes se referem a colesterol, lipídeos e lipoproteína, alanina, glicoproteína,  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose, fenilalanina e outros compostos não identificados. A variação de alguns destes buckets entre os grupos é mostrada pelos *Boxplots* na Figura 2 Percebe-se que as variações foram pequenas, sendo que colesterol e alanina estão em maior quantidade nos pacientes controle e  $\alpha$ -glucose e fenilalanina em maior quantidade nas amostras dos pacientes que sofreram óbito. Dentre estes, a glucose já foi repetidamente associada com prognóstico ruim após o AVEi e após o tratamento trombolítico (Hasan *et al.*, 2012). Embora não se encontrou correlações metabólicas que justifiquem as alterações de cada um destes metabólitos, estes podem ser indicativos para estudos futuros em busca de encontrar marcadores que indiquem o potencial de óbito após o AVEi.



**Figura 50:** Gráficos de escores e *S-plot* das análises por OPLS-DA referentes aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de pacientes que sofreram AVEi com óbito (preto) e pacientes de controle (vermelho). Análises realizadas no *muma*.



**Figura 51:** Gráfico Volcano das comparações entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de pacientes que sofreram AVEi com óbito (preto) e pacientes de controle (vermelho). Variáveis são coloridas de acordo com um limite duplo, incluindo o valor máximo de  $p$  de 0,05 e limite positivo e negativo de valores de 1,2 e 0,8, respectivamente. Variáveis significantes são coloridas em azul e as não significantes em cinzas.



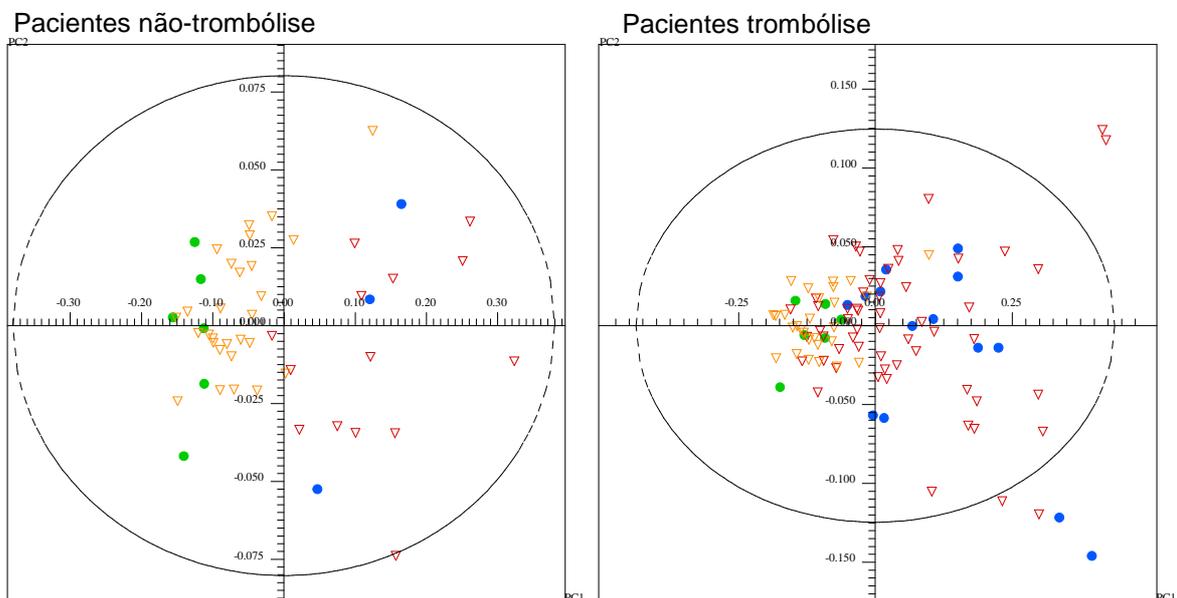
**Figura 52:** Boxplots dos *buckets* centrados em  $\delta$  0,68, 1,48, 3,82 e 7,38 das análises entre pacientes que sofreram AVEi com óbito (preto) e pacientes de controle (vermelho). O *boxplot* representa o valor médio (linha cinza dentro da caixa), o desvio padrão (limites da caixa), a faixa de valores (linha pontilhada) e as amostras anômalas (círculos acima e abaixo da caixa).

#### 4.2 Modelos de classificação das amostras de soro

Os conjuntos de dados formados a partir dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  das amostras A7 de pacientes que sofreram AVEi e amostras A de pacientes de controle foram utilizados para construir modelos de classificação pelo método SIMCA para se avaliar a capacidade de se prever novas amostras. Estes conjuntos foram escolhidos por terem sido os únicos a apresentarem discriminação nas análises por PCA (Seção 4.1.6.6.2), a partir da qual os modelos são desenvolvidos. As análises foram realizadas no AMIX já que o *muma* não possui ferramentas de classificação. Os conjuntos de

amostras de pacientes trombólise e não-trombólise foram considerados separadamente. Cada modelo foi construído com 80% das amostras e as demais 20% foram utilizadas para previsão. A partir dos resultados calcularam-se os valores de sensibilidade, ou seja, a porcentagem de quantas amostras do grupo doente foram previstas como doentes; e de especificidade, que representa a porcentagem de amostras controle que foram previstas como tal. O método SIMCA classifica as amostras em um de quatro grupos: zero, um, dois e três, sendo no modelo, fora da elipsoide de confiança, significativamente fora do espaço do modelo e totalmente fora do modelo, respectivamente.

O modelo de classificação considerando as amostras de pacientes não-trombólise e controle resultou em sensibilidade e especificidade de 100%, visto todas as amostras terem recebido classificação zero. Conforme mostra a Figura 53 todas as amostras foram corretamente classificadas em seus respectivos grupos. Por outro lado, o modelo formado pelas amostras trombólise e controle apresentou sensibilidade de 85,7% e especificidade de 100%, visto que um par de duplicatas das amostras de pacientes trombólise foi classificado como um, fora da elipsoide de confiança, o que é claramente visto na Figura 53. Portanto, embora o número de amostras tenha sido pequeno, os valores de sensibilidade e especificidade obtidos foram muito satisfatórios, revelando grande potencial da técnica em prever a ocorrência do AVEi.



**Figura 53:** Gráficos de PC1 *versus* PC2 obtidos da classificação pelo método SIMCA a partir das análises por PCA de espectros de pacientes que sofreram AVEi (triângulos vermelhos) e pacientes de controle (triângulos laranjas). Amostras utilizadas para classificação são representadas como círculos azuis no caso das amostras de pacientes que sofreram AVEi e como círculos verdes para amostras de controle. Elipsoides com nível de confiança de 95% geradas pelo AMIX.

Os demais conjuntos não foram utilizados para construção de modelos de classificação ou predição devido a baixa discriminação apresentada nas análises por PCA e/ou ao pequeno número de amostras envolvida.

### **4.3 Análise das amostras de plasma sanguíneo**

#### **4.3.1 Estabelecimento do método de preparo das amostras de plasma sanguíneo**

Amostras de plasma foram coletadas dos pacientes paralelamente às amostras de soro, com a diferença que o plasma é armazenado em tubo contendo anticoagulante EDTA após a coleta e centrifugados, enquanto o soro é armazenado em tubos estéreis sem anticoagulante e centrifugados, conforme explicado na seção 1.3.

As amostras foram preparadas similarmente às de soro para poder comparar os resultados obtidos, tendo-se usado alíquotas de plasma sanguíneo de 400  $\mu\text{L}$  e o volume completado para 600  $\mu\text{L}$  pela adição de uma solução de  $\text{D}_2\text{O}$  contendo TMSP- $d_4$  0,5% m/v, seguidos de centrifugação e transferência de alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  diretamente para tubos de RMN de 5 mm sendo cada amostra analisada em duplicata.

O único fator testado foi o tempo de centrifugação. Para tanto se realizaram centrifugações por diferentes tempos e observou-se se ocorreu formação de depósito. Iniciou-se com centrifugação por dez minutos a 2000 x g e foi observou formação de precipitado em uma das seis amostras utilizadas para teste. Repetiu-se o procedimento por 15 e 20 minutos, e em nenhum dos casos ocorreu aumento ou aparecimento de depósito. Fixou-se então o tempo de centrifugação como 10 minutos.

#### **4.3.2 Aquisição dos espectros de RMN das amostras de plasma sanguíneo**

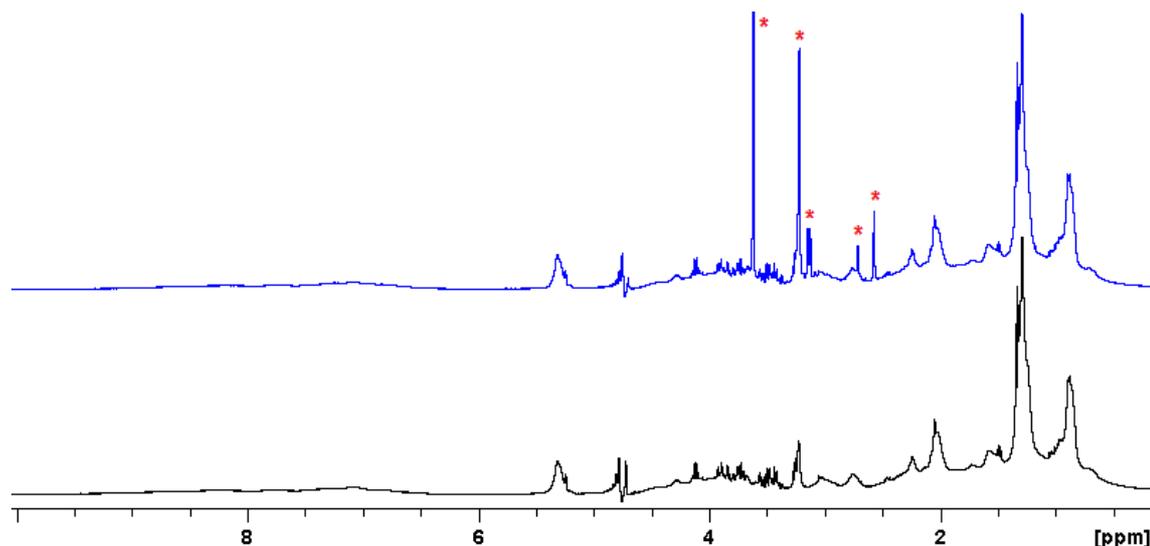
##### **4.3.2.1 Determinação das sequências de pulso e procedimentos utilizados para aquisição dos espectros de RMN**

As mesmas sequências de pulso utilizadas para análise das amostras de soro foram também utilizadas para as análises de amostras de plasma, com parâmetros idênticos. Foram estas: *noesypr1d* e *cpmgpr1d* utilizados para aquisição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e *zppg30* para a aquisição do espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ .

Além disso, a mesma temperatura utilizada para as análises das amostras de soro, de 303 K, foi utilizada para as análises das amostras de plasma. Fez-se o ajuste do *shimming* utilizando como a ferramenta do programa TOPSPIN chamada TOPSHIM, como no caso de amostras de soro. Antes da aquisição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , foi procedido o ajuste manual da frequência do sinal da água para melhor saturação do mesmo, conforme descrito na seção 4.1.3.3.

### 4.3.3 Atribuição dos sinais dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ das amostras de plasma sanguíneo

Com respeito aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de plasma, foram comparados os espectros das amostras de soro e plasma de um mesmo paciente. Notou-se que os espectros são muito similares, com exceção dos sinais correspondentes ao EDTA marcados com asterisco, conforme mostra a Figura 54.



**Figura 54:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *noesypr1d* de amostras A de plasma (acima) e soro (abaixo) do paciente 14. Os sinais assinalados com asterisco correspondem à EDTA livre ou complexado.

Como esperado o uso de EDTA como anticoagulante gera sinais intensos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , provindos tanto do EDTA na sua forma livre como complexado a cálcio e magnésio presentes no plasma (Barton e *col.*, 2010). A atribuição destes sinais foi feita por comparação com dados da literatura (Barton *et al.*, 2010) e é mostrada na Tabela 9. Os sinais correspondentes ao EDTA, por sua vez, se sobrepõem a sinais de metabólitos endógenos. Porém, uma análise dos sinais de metabólitos que são sobrepostos foi feita por Barton e colaboradores (2010) mostrando que a maioria dos metabólitos possuem sinais em regiões livres de sobreposição dos sinais referentes ao EDTA. A Tabela 9 mostra a lista dos sinais correspondentes às formas livre e complexada do EDTA e dos sinais que são sobrepostos por estes conforme publicado por Barton e colaboradores (2010).

Com respeito aos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  não se observou diferenças entre os espectros das amostras de plasma e soro de cada paciente.

**Tabela 9:** Atribuição dos sinais de EDTA livre e complexado com cálcio e com magnésio e a lista dos metabólitos que possuem sinais sobrepostos pelos sinais de EDTA conforme publicado por Barton e colaboradores (2010).

Composto de EDTA	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Possíveis metabólitos com sinais nesta região	Possíveis sinais adicionais sem sobreposição de sinais de EDTA (ppm)
H-EDTA <sup>3-</sup>	~3,60 (s)	$\beta$ -Aminobutirato	1,33/2,50
		Valina	0,99/1,04/2,28
		Sarcosina	2,70
		Acetilcarnitina	---
		4-Hidroxibutirato	2,20
		Treonina	1,32
		<i>Mio</i> -Inositol	3,28
		Glicerol	3,87
H-EDTA <sup>3-</sup>	~3,20 (s)	Glicerofosforilcolina	3,95/4,30
		Carnitina	---
		Colina	3,50/4,05
		Anserina	7,10
		Tirosina	3,94/6,87
		Arginina	1,73/1,92/1,68
		$\alpha$ -Glucose	5,23
		Histidina	3,98/7,02/7,73
Ca-EDTA <sup>2-</sup>	3,06-3,17 (q)	$\beta$ -Alanina	2,50-2,60
		Creatina	3,93
		Creatinina	4,05
		Tirosina	3,94/6,87
		Ortinina	---
		Cisteína	3,90
		$\beta$ -Aminoisobutirato	1,20/2,60-2,70
		Fenilalanina	3,97/7,33/7,38/7,43
		Histidina	3,98/7,02/7,73
		Etanolamina	3,80
		Citrulina	1,57/1,86/3,70
		<i>N</i> - $\alpha$ -Acetilhistidina	7,08/7,83
		3-Metilhistidina	7,01/7,61/7,77
<i>cis</i> -Aconitato	---		
Mg-EDTA <sup>2-</sup>	2,70	Lipídeos	1,32/1,69/1,97
		Dimetilamina	---
		<i>N</i> -Acetilaspartato	2,20
		Malato	4,20
		Aspartato	2,81
		Acetilcarnitina	---
		Metionina	2,13
		Metilamina	---
		$\alpha$ -Ketoisocaproato	---
$\beta$ -Aminoisobutirato	1,33		
Ca-EDTA <sup>2-</sup>	2,55	---	---

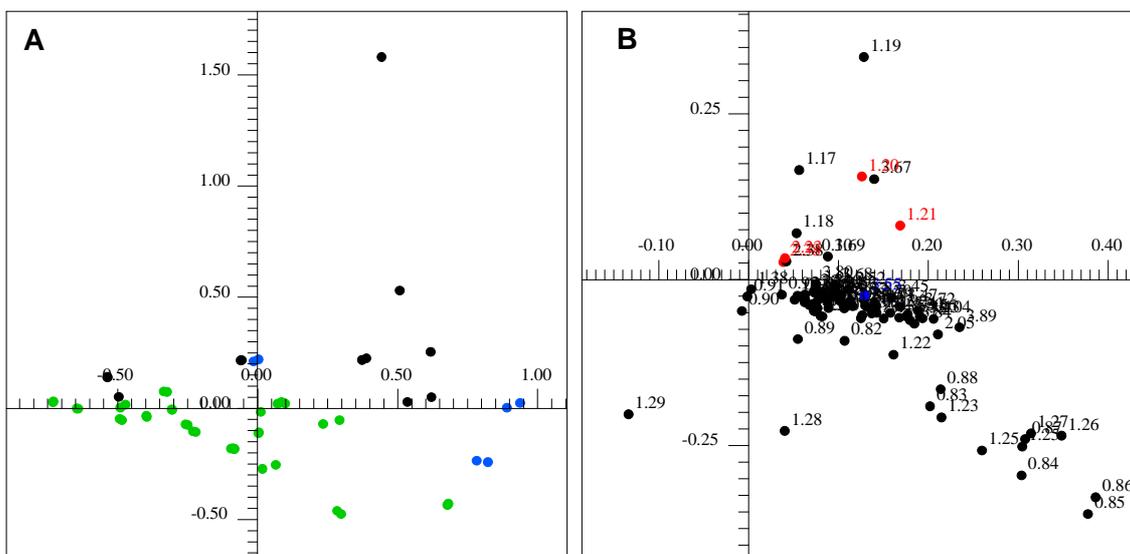
#### 4.3.4 Análises quimiométricas dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ das amostras de plasma sanguíneo

As análises das amostras de plasma se iniciaram por todas amostras dos pacientes de controle e A1, incluindo A1t, dos pacientes de AVEi. As análises quimiométricas seguiram procedimentos similares às análises de soro, com diferença que foi necessário excluir as regiões dos sinais de EDTA, porque embora a quantidade de EDTA adicionada tenha sido igual para todas as amostras, as intensidades destes sinais variaram entre os espectros de diferentes pacientes. Isto se deu porque o EDTA forma complexos com íons de cálcio e magnésio, cujas concentrações plasmáticas variaram entre os pacientes. Além disto, pequenas variações nos deslocamentos químicos dos sinais gerados pelo EDTA ocorreram entre os espectros.

Foram comparados os mesmos grupos das análises de soro. Não se observou discriminação para a grande maioria das análises realizadas. Mesmo nos casos em que pareceu haver discriminação parcial, especialmente no caso das análises da região aromática dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d*, a análise estatística de significância revelou que na realidade esta se devia a ruídos espectrais ou não havia real diferença entre os sinais das amostras dos grupos comparados.

O único caso em que houve discriminação foi ao comparar as amostras A1 de pacientes que sofreram óbito, tanto os que receberam trombolítico como os que não receberam, com amostras C1 de pacientes de controle ao se considerar a região alifática dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgpr1d*. Conforme mostra a Figura 55, a discriminação ocorreu principalmente em PC2. Os sinais estatisticamente significantes foram:  $\delta$  1,20 (vermelho, valor- $p = 6,03 \times 10^{-5}$ ), 1,21 (vermelho, valor- $p = 6,59 \times 10^{-5}$ ), 2,23 (vermelho, valor- $p = 5,35 \times 10^{-6}$ ), 2,38 (vermelho, valor- $p = 1,25 \times 10^{-4}$ ) e 3,55 (azul, valor- $p = 4,76 \times 10^{-4}$ ). O valor- $\alpha$  de Bonferroni corrigido foi de valor- $p < 5,68 \times 10^{-4}$  determinado após omitir *buckets* que continham menos de 15% de variância. Com exceção do último sinal, os demais estão em maior intensidade nas amostras dos pacientes que sofreram óbito. Em  $\delta$  1,20 e 1,21 estão sinais referentes ao 3-hidroxiacetato e também ao etanol, sendo que estes foram encontrados em amostras de alguns pacientes, o primeiro podendo estar correlacionado à diabetes *mellitus*, além de ser usado como fonte energética cerebral quando níveis de glicose sanguínea são muito baixos (Wishart *et al.*, 2013). Já o sinal em  $\delta$  2,23 refere-se ao simpleto do acetoacetato, o sinal em  $\delta$  2,38 ao piruvato e em  $\delta$  3,55 pode ser referente a açúcares, embora tenha sido o único a se destacar e, por ser uma região de grande sobreposição, é difícil afirmar com certeza. Nota-se que os sinais aqui tidos como significantes foram diferentes aos encontrados na análise de soro (Seção 4.1.6.9), porém sinais que se destacaram na

análise de soro tiveram de ser excluídos das análises das amostras de plasma visto estarem sobrepostos por sinais de EDTA.



**Figura 55:** (A) Gráfico de escores de PC1 (72,7%) versus PC2 (9,77%) discriminado os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a sequência de pulso *cpmgrp1d* considerando a região de  $\delta$  0,4-4,0 das amostras de pacientes trombólise (preto) e não-trombólise (azul) que sofreram óbito e dos pacientes de controle (verde). (B) Gráfico de *X-loadings*. *Buckets* considerados como significantes (valor- $p$  < valor  $\alpha$  de Bonferroni corrigido) são coloridos em ordem decrescente de valor- $p$ : azul, verde, amarelo e vermelho. *Buckets* não significantes são apresentados em preto.

Considerando todos os resultados das análises das amostras de plasma percebe-se que foram menos satisfatórios do que os obtidos com as amostras de soro, muito provavelmente devido ao fato de ser necessário a exclusão de regiões em que há sobreposição dos sinais de EDTA e que poderiam fornecer informações importantes. Portanto, as amostras de plasma dos demais períodos não foram analisadas.

#### 4.4 Limitações da técnica

A técnica de RMN aliada a análises quimiométricas, embora apresente grande potencial na investigação de biomarcadores de patologias, apresenta algumas limitações. A maior delas, a baixa sensibilidade, é intrínseca à técnica de RMN. O ideal para análises de soro e plasma sanguíneo, nas quais a maioria dos metabólitos se encontra em baixas concentrações, seria utilizar o maior campo magnético possível juntamente de sondas criogênicas ou microsondas criogênicas, potencializando assim a sensibilidade. No entanto, como o melhor equipamento disponível no início deste trabalho era o espectrômetro de RMN de 400 MHz equipado com uma sonda de observação direta de 5 mm, este foi utilizado. Ainda assim, percebe-se discriminação entre os grupos em

diversas das análises realizadas, o que indica que a utilização de alternativas que aumentam a sensibilidade da técnica dará resultados ainda melhores.

Uma limitação em relação aos procedimentos de coleta das amostras é o fato de não haver como controlar a alimentação antes da coleta, pois a primeira coleta foi realizada nas primeiras 24 horas da ocorrência do AVEi. Também, há grande variação entre os hábitos diários de cada paciente que influenciam a composição sérica e plasmática. Portanto, deve-se coletar um número muito grande de amostras para minimizar estes efeitos. Porém, houve dificuldades na coleta, incluindo pacientes que não aceitaram participar da pesquisa, encontrar pacientes que se encaixem nos requisitos estabelecidos e dar continuidade nas coletas ao longo do tempo, visto que muitos não retornam ou desistem. Houve dificuldade especialmente no caso de pacientes de controle, pois além da dificuldade de encontrar pacientes que preenchessem os requisitos, houve dificuldade de encontrar pessoas dispostas a fornecer as amostras e especialmente em dar continuidade nas coletas. Fez-se o máximo possível para conseguir o maior número de amostras dentro do tempo disponível e dos requisitos necessários.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises das amostras de soro e plasma por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  aliadas a análises quimiométricas foram realizadas após se estabelecer o método de preparo das amostras e os parâmetros utilizados para obtenção dos espectros. Isto foi essencial a fim de padronizar os procedimentos e assim poder obter espectros comparáveis entre si.

As amostras de soro sanguíneo mostraram-se bastante sensíveis a mudanças de temperatura e pouco estáveis quanto maior a temperatura em que foram expostas. Portanto, deve-se manter o máximo cuidado em mantê-las a temperatura muito baixa, como  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ , e pelo menor tempo possível a fim de evitar a degradação, o que levaria a resultados espúrios.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  apresentaram o perfil característico de amostras de soro ou plasma, apresentando sinais de colesterol, lipídeos e lipoproteínas, aminoácidos, glicoproteínas, ácidos orgânicos, açúcares, além de outros metabólitos como colina e derivados e creatinina. A diferença entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de soro e plasma foi a presença de sinais de EDTA e complexos formados por este. No entanto, estes sinais se sobrepõem a sinais das amostras e, provavelmente devido a isto, os resultados das análises quimiométricas foram menos satisfatórios do que para as análises com os espectros obtidos com as amostras de soro. Já os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  apresentaram basicamente sinais de fosfatos inorgânicos e fosfolipídios. A maioria dos metabólitos identificados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  mostrou-se significantes nas diferentes análises realizadas. Correlações de cada um destes com possíveis mecanismos do AVEi foram encontrados na literatura, devendo ser unidos à informações clínicas em estudos mais abrangentes para poderem ser confirmados.

As análises quimiométricas, realizadas em dois programas computacionais diferentes cujos resultados fornecidos se complementaram, permitiram perceber discriminação entre grupos doente e controle principalmente para os períodos iniciais após o AVEi. Os principais metabólitos que sofreram alterações foram colesterol, leucina, isoleucina, alanina, acetoacetato, piruvato, glutamina, colina e derivados, fosfolipídeos, fosfatos inorgânicos, glucose, tirosina, histidina, fenilalanina, hipoxantina e formato. Isto demonstrou o potencial da técnica em diagnosticar a doença nas primeiras horas ou dias, o que é muito importante visto permitir um melhor tratamento e prevenção de novos AVEi. Modelos de classificação desenvolvidos a partir das análises dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  mostraram sensibilidade e especificidade muito boas, indicando haver perspectiva para se utilizar abordagens metabonômicas baseadas em análises por RMN no diagnóstico do AVEi.

Relataram-se alterações entre amostras de soro sanguíneo com o decorrer do tempo, fato que deve ser levado em consideração em estudos que acompanham grupos por longos períodos.

Resultados obtidos para os dois grupos doentes, pacientes que receberam ou não tratamento trombolítico, indicaram diferentes mecanismos metabólicos após a administração do medicamento, inclusive mostrando um efeito benéfico do mesmo. Os resultados obtidos podem ser de ajuda na compreensão dos efeitos deste tratamento.

Quanto ao prognóstico, embora a técnica não tenha sido capaz de distinguir pacientes com prognóstico bom e ruim, foi possível perceber alterações específicas dos pacientes que sofreram óbito. Estudos específicos dos metabólitos encontrados podem ser futuramente utilizados na predição de óbitos após o AVEi.

Portanto, a abordagem metabonômica baseada em dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  mostrou ter grande potencial no diagnóstico do AVEi e em auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos desencadeados pela doença e pelo tratamento trombolítico. Estudos futuros mais abrangentes, incluindo uma maior amostragem, análises em equipamentos com maior sensibilidade, juntamente da correlação com dados clínicos podem fornecer um número ainda maior de informações mais precisas a respeito do AVEi. A técnica também possui potencial em ser estendida para outras patologias, assim como já tem acontecido em países desenvolvidos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIRA, K.; IMACHI M; HASHIMOTO, T. Investigations into Biochemical Changes of Genetic Hypertensive Rats Using  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabonomics. *Hipertens. Res.*, v. 28, p. 425–430, 2005.
- AKIRA, K.; MASU, S.; IMACHI M; *et al.*  $^1\text{H}$  NMR-based metabonomic analysis of urine from young spontaneously hypertensive rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 46, p. 550–556, 2008.
- AKIRA, K.; MITOME, H.; IMACHI M; *et al.* LC-NMR identification of a novel taurine-related metabolite observed in  $^1\text{H}$  NMR-based metabonomics of genetically hypertensive rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 51, p. 1091–1096, 2010.
- ALLARD, L.; BURKHARD, P. R.; LESCUYER P.; *et al.* PARK7 and nucleoside diphosphate kinase A as plasma biomarkers for the early diagnosis of stroke. *Clin. Chem.*, v. 51, p. 2043-2051, 2005
- ALMEIDA, E. O.; FALEIROS, B. E.; MARTINS, C.; *et al.* Características clínico-demográficas dos acidentes vasculares encefálicos de pacientes atendidos no Hospital Público Regional de Betim, MG. *Rev. Med. Minas Gerais*, v. 21, p. 384-389, 2011.
- ALVES, A. C.; RANTALAINEN, M.; HOLMES, E.; *et al.* Analytic properties of statistical total correlation spectroscopy based information recovery in  $^1\text{H}$  NMR metabolic data sets. *Anal. Chem.*, v. 81, p. 2075-2084, 2009.
- ANDERSON, P E.; REO, N. V.; DELRASO; N. J.; *et al.* Gaussian binning: a new kernel-based method for processing NMR spectroscopic data for metabolomics. *Metabolomics*, v. 4, p. 261-272, 2008.
- ANDO, I.; HIROSE, T.; NEMOTO, T. *et al.* Quantification of molecules in  $^1\text{H}$ -NMR metabolomics with formate as a concentration standard. *J. Toxicol. Sci.*, v. 35, p. 253-256, 2010.
- AZMI, J.; GRIFFIN, J. L.; SHORE, *et al.* Chemometric analysis of biofluids following toxicant induced hepatotoxicity: A metabonomic approach to distinguish the effects of 1-naphthylisothiocyanate from its products. *Xenobiotica*, v. 35, p. 839-852, 2005.

- BAIRD, A. E. Blood genomics in human stroke. *Stroke*, v. 38, p. 694-698, 2007.
- BARISON, A. **Emprego da RMN HR-MAS e análises quimiométricas no reconhecimento e avaliação de soja (*Glycine max*) geneticamente modificada.** São Carlos, 2007. 268f. Tese, Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2005.
- BARTON, R. H.; WATERMAN, D. BONNER, F. W.; *et al.* The influence of EDTA and citrate anticoagulant addition to human plasma on information recovery from NMR-based metabolic profiling studies. *Mol. BioSyst.*, v. 6, p. 215-224, 2010.
- BECKWITH-HALL, B. M.; BRINDLE, J. T.; BARTON, R. H.; *et al.* Application of orthogonal signal correction to minimize the effects of physical and biological variation in high resolution  $^1\text{H}$  NMR spectra of biofluids. *Analyst*, v. 127, p. 1283-1288, 2002.
- BEEBE, K.; PELL, R.; SEAHOLTS, N. B. *Chemometric: A practical guide.* New York: John Wiley & Sons, 1998.
- BERTINI, I.; CACCIATORE, S.; JENSEN, B. V.; *et al.* Metabolomic NMR fingerprinting to identify and predict survival of patient with metastatic colorectal cancer. *Cancer Res.*, v. 72, p. 356-364, 2012.
- BINGOL, K.; BRÜSCHWEILER, R. Multidimensional approaches to NMR-based metabolomics. *Anal. Chem.*, v. 86, p. 47-57, 2014.
- BLAISE, B. J.; NAVRATIL, V.; EMSLEY, L.; TOULHOAT, P. Orthogonal filtered recoupled-STOCSY to extract metabolic networks associated with minor perturbations from NMR spectroscopy. *J. Proteome Res.*, v. 10, p. 4342-4348, 2011.
- BRINDLE, J. T.; ANTTI, H.; HOLMES, E.; *et al.* Rapid and non invasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using  $^1\text{H}$  NMR based “metabonomics”. *Nat. Med.*, v. 8, p.1439-1445, 2002.
- CANEDA, M. A. G.; FERNANDES, J. G.; ALMEIDA, A. G.; *et al.* Confiabilidade de escalas de comprometimento neurológico em pacientes com acidente vascular cerebral. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 64, p. 690-697, 2006.

- CARVALHO, J. J. F.; ALVES, M. B.; VIANA, G. A. A.; *et al.* Stroke epidemiology, patterns of management, and outcomes in Fortaleza, Brazil: A hospital-based multicenter prospective study. *Stroke*, v. 42, p. 3341-3346, 2011.
- CASTELLANOS, M.; SOBRINO, T.; PEDRAZA, S.; *et al.* High plasma glutamate concentrations are associated with infarct growth in acute ischemic stroke. *Neurology*, v. 71, p. 1862-1868, 2008.
- CASTILLO, J.; DÁVALOS, A.; NOYA, M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet*, v. 349, p. 79-83, 1997.
- CHAVES, M. L. F. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. *Rev. Bras. Hipertens.*, v. 4, p. 372-382, 2000.
- CHEN, H. J.; SHEN, Y. C.; LIN, C. Y.; *et al.* Metabolomics study of Buyang Huanwu Tang Decoction in ischemic stroke mice by <sup>1</sup>H NMR. *Metabolomics*, v. 8, p. 974-984, 2012.
- CHERNYSHEY, O. Y.; GARAMI, Z.; CALLEJA, S.; *et al.* Yield and accuracy of urgent combined carotid and transcranial ultrasound testing in acute cerebral ischemia. *Stroke*, v. 36, p. 32-37, 2005.
- CHOI, J. K.; DEDEOGLU, A.; JENKINS, B. G. Application of MRS to mouse models of neurodegenerative illness. *NMR Biomed.*, v. 20, p. 216–237, 2007.
- CHOZE, R.; ALCANTARA, G. B.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M.; LIÃO, L. M. Distinction between a transgenic and a conventional common bean genotype by 1H HR-MAS NMR. *Food Chem.*, v. 141, p. 2841-2847, 2013.
- CLARIDGE, T. D.W. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. 2<sup>a</sup> Ed., Oxford: Elsevier Science Ltda, 2009.
- CLAUDINO, W. M.; GOLÇALVES, P. H.; DI LEO, A.; *et al.* Metabolomics in cancer: A bench-to-bedside intersection. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v. 84, p. 1-7, 2012.
- CUPERLOVIĆ-CULF, M.; BELACEL, N.; CULF, A. S.; *et al.* NMR metabolic analysis of samples using fuzzy K-means clustering. *Magn. Reson. Chem.*, v. 47, p. S96-S104, 2009.

- DAMBINOVA, S.A.; KHOUNTEEV, G.A.; IZYKENOVA, G.A.; *et al.* Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. *Clin. Chem.*, v. 49, p. 1752–1762, 2003.
- DAMBINOVA, S. A.; BETTERMANN, K.; GLYNN, T.; *et al.* Diagnostic potential of the NMDA receptor peptide assay for acute ischemic stroke. *PLoS One*, v. 7, p. e42362, 2012.
- DIXON, S.; HEINRICH, N.; HOLMBOE, M.; *et al.* Use of cluster separation indices and the influence of outliers: application of two new separation indices, the modified silhouette index and the overlap coefficient to simulated data and mouse urine metabolomic profiles. *J. Chemometr.*, v. 23, p. 19-31, 2009.
- DUARTE, I. F.; GIL, A. M. Metabolic signatures of cancer unveiled by NMR spectroscopy of human biofluids. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.*, v. 62, p. 51-74, 2012.
- DUARTE, I. F.; DIAZ, S. O.; GIL, A. M. NMR metabolomics of human blood and urine research. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. No prelo.
- DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, v. 24, p. 285-294, 2005.
- FAN, T. W. M.; LANE, A. N. Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, v. 52, p. 69-117, 2008.
- FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Quím. Nova*, v. 22, p. 724-731, 1999.
- FEUERSTEIN, G. Z.; CHAVEZ, J. Translational medicine for stroke drug discovery. *Stroke*, v. 40, p. S121–125, 2009.
- FOERCH, C.; MONTANER, J.; FURIE, K. L.; *et al.* Invited article: searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology*, v. 73, p. 393-399, 2009.
- FOERCH, C.; OTTO, B.; SINGER, O. C.; *et al.* Serum S100B predicts a malignant course of infarction in patients with acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, v. 35, p. 2160–2164, 2004.

- IORIO, E.; MEZZANZANICA, D.; ALBERTI, P.; *et al.* Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res.*, v. 65, p. 9369-9376, 2005.
- JICKLING, G. C.; SHARP, F. R. Blood biomarkers of ischemic stroke. *Neurotherapeutics*, v. 8, p. 349-360, 2011.
- JUNG, J. Y.; LEE, H. S.; KANG, D. G.; *et al.* <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics study cerebral infarction. *Stroke*, v. 42, p. 1282–1286, 2011.
- JUNG, J. Y.; KIM, S. H.; LEE, H. S.; *et al.* Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated with asthma pathogenesis. *Clin. Exp. Allergy*, v. 43, p. 425–433, 2013.
- GARRITANO, C. R.; LUZ, P. M.; PIRES, M. L. E.; *et al.* Análise da tendência da mortalidade por acidente vascular cerebral no Brasil no século XXI. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 98 p. 519-527, 2012.
- GARTLAND, K. P. R.; BEDDEL, C. R.; LINDON, J. C.; *et al.* A pattern recognition approach to the comparison of PMR and clinical chemical data for classification of nephrotoxicity. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 8, p. 963-968, 1990.
- GARTLAND, K. P. R.; BEDDEL, C. R.; LINDON, J. C.; *et al.* Application of pattern recognition methods to the analysis and classification of toxicological data derived from proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. *Mol. Pharmacol.*, v. 39, p. 629-642, 1991.
- GASPAROVIC, C.; ROSENBERG, G. A.; WALLACE, J. A.; *et al.* Magnetic resonance lipid signals in rat brain after experimental stroke correlate with neutral lipid accumulation. *Neurosci. Lett.*, v. 301, p. 87-90, 2001.
- GAUDE, E.; CHIGNOLA, F.; SPILIOTOPOULOS, D.; *et al.* *muma*, An R package for Metabolomics Univariate and Multivariate Statistical Analysis. *Curr. Metabolomics*, v. 1, 180-189, 2013.
- GINSBURG, G. S.; DONAHUE, M. P.; MEWBY, L. K. Prospect for personalized cardiovascular medicine: The impact of genomics. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 46, p. 1615-1627, 2005.

- GRANDIZOLI, C. W. P. S.; CARRENHO, L. Z. B.; FRANCISCO, T. M. G.; *et al.* Ehrlich and Sarcoma 180 tumour characterization and early detection by  $^1\text{H}$  NMR-based metabonomics of mice serum. *J. Braz. Chem. Soc.* 2013. No prelo.
- GRIFFIN, J. L. Understanding mouse models of disease through metabolomics. *Curr Opin Chem Biol*, v. 10, p. 309-315, 2006.
- GOODPASTER, A. M.; ROMICK-ROSENDALE, L. E.; KENNEDY, M. A. Statistical significance analysis of nuclear magnetic resonance-based metabonomics data. *Anal. Biochem.*, v. 401, p. 134-143, 2010.
- GOODPASTER, A. M.; KENNEDY, M. A. Quantification and statistical significance analysis of group separation in NMR-based metabonomics studies. *Chemometric Intell Lab.*, v. 109, p. 162-170, 2011.
- HAQUE, S.; SHIMA, Z. F. Serum inorganic phosphate and alkaline phosphatase. *J. Teachers Assoc.*, v. 19, p. 13-17, 2006.
- HASAN, N.; MCCOLGAN, P.; BENTLEY, P.; *et al.* Towards the identification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review. *Br. J. Pharmacol.*, v. 74, p. 230-240, 2012.
- HEYNDRICKX, G. R.; BAIG, H.; NELLENS, P.; *et al.* Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusions. *Am. J. Physiol.*, v. 234, p. H653-9, 1978.
- HILL, M. D.; JACKOWISKI, G.; BAYER, N.; *et al.* Biochemical markers in acute ischemic stroke. *CMAJ*, v. 162, p. 1139-1140, 2000.
- HOLMES, C. E.; NICHOLL, A. W.; LINDON, J. C.; *et al.* Chemometric methods for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 13, p. 471-478, 2000.
- HOLMES, E.; NICHOLLS, A. W.; LINDON J. C.; *et al.* Development of a model for classification of toxin-induced lesions using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition. *NMR Biochem.*, v. 11, p. 235-244, 1998.

- IDLE, J. R.; GONZALEZ, F. J. Metabolomics. *Cell Metab.*, v. 6, p.348-351, 2007.
- KANG, B. T.; JANG, D. P.; LEE, J. H.; *et al.* Detection of cerebral metabolites in a canine model of ischemic stroke using  $^1\text{H}$  magnetic resonance spectroscopy. *Rev. Vet. Sci.*, v. 87, p. 300-306, 2009.
- KIRSCHENLOHR, H. L.; GRIFFIN J. L.; CLARKE S. C. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary disease. *Nat. Med.*, v. 12, p. 705-710, 2006.
- KOMATSUMOTO, S.; NIOKA, S.; GREENBERG, J. H.; *et al.* Cerebral energy metabolism measured in vivo by  $^{31}\text{P}$ -NMR in middle cerebral artery occlusion in the cat relation to severity of stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 7, p. 557-562, 1987.
- KULISZKIEWICZ-JANUS, M.; BACZYŃSKI, S. Application of  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy to monitor chemotherapy-associated changes of serum phospholipids with malignant lymphomas. *Magn. Reson. Med.*, v. 35, p. 449-456, 1996.
- LABORDE, C. M.; MOURINO-ALVAREZ, L.; AKERSTROM, F.; *et al.* Potential blood biomarkers for stroke. *Expert Rev. Proteomics*, v. 9, p. 437-449, 2012.
- LASKOWITZ, D. T.; KASNER, S. E.; SAVER, J.; *et al.* Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the Biomarker Rapid Assessment in Isquemic Injury (BRAIN) study. *Stroke*, v. 40, p. 77-85, 2009.
- LEVINE, S. R.; HELPERN, J. A.; WELCH, K. M.; *et al.* Human focal cerebral ischemia: evaluation of brain pH and energy metabolism with P-31 NMR spectroscopy. *Radiology*, v. 185 (2), p. 537-544, 1992.
- LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, v. 39, p. 1-40, 2001.
- LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; *et al.* Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxic. App. Pharmac.*, v. 187, p. 137-146, 2003.

- LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. *Sao Paulo Med. J.*, v. 123, p. 3-4, 2005.
- LUNDSTEDT, T.; HEDENSTRÖM, M.; SOERIA-ATMADJA, U.; *et al.* Dynamic modelling of time series data in nutritional metabonomics — A powerful complement to randomized clinical trials in functional food studies. *Chemometr. Intell. Lab.*, v. 104, p. 112-120, 2010.
- MA, Y.; ZHANG, P. YANG, Y.; *et al.* Metabolomics in the fields of oncology: a review of recent research. *Mol. Biol. Rep.*, v. 39, p. 7505-7511, 2012.
- MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P.; CAPITANI, D. Applications of NMR metabolomics to the study of foodstuffs: truffle, kiwifruit, lettuce, and sea bass. *Electrophoresis*, v. 33, p. 2290-2313, 2012.
- MAHER, A. D.; ZIRAH, S. F. M.; HOLMES, E.; *et al.* Experimental and analytical variation in human urine in  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy – based metabolic phenotyping studies. *Anal. Chem.*, v. 79, p. 5204-5211, 2007.
- MAKINEN, V. P.; SOININEN, P.; FORSBLOM, C.; *et al.*  $^1\text{H}$  NMR metabonomics approach to the disease continuum of diabetic complications and premature death. *Mol. Syst. Biol.*, v. 4, p. 167-179, 2008.
- MARTIN, J. C.; CANLET, C.; DELPLANQUE, B.; *et al.*  $^1\text{H}$  NMR metabonomics can differentiate the early atherogenic effect of dairy products on hyperlipidemic hamsters. *Atherosclerosis*, v. 206, p. 127-133, 2009.
- MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, P.; TSIVGOULIS, G.; LAO, A.; *et al.* Ultrasound in acute ischemic stroke. *Neurologia*, v. 24, p. 59-68, 2009.
- MAURI-CAPDEVILA, G.; JOVÉ, M.; SUÁREZ-LUIS, I.; *et al.* La metabolómica em et ictus isquêmico, nuevos biomarcadores diagnósticos y pronósticos. *Rev. Neurol.*, v. 57, p. 29-36, 2013.
- MCCONNELL, J. P.; JAFFLE, A. S. Variability of lipoprotein-associated phospholipase A2 measurements. *Clin. Chem.* v. 54, p. 932-933, 2008.

- MENESES, P.; GLONEK, T. High resolution  $^{31}\text{P}$  NMR of extracted phospholipids. *J.Lipid Res.*, v. 29, p. 679-689, 1988.
- MEISEL, A.; MEISEL, C.; HARMS, H.; *et al.* Predicting post-stroke infections and outcome with blood-based immune and stress markers. *Cerebrovasc. Dis.*, v. 33, p. 580-588, 2012.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde Brasil 2007. Uma análise da situação de saúde. Brasília, 2007. Disponível em <<http://www.cebes.org.br/anexos/Perfil%20da%20mortalidade%20no%20Brasil%202007%20-%20MS.pdf>>. Acesso em 06/03/2014.
- MIRZAEI, M.; TRUSWELL, A. S.; ARNETT, K.; *et al.* Cerebrovascular disease in 48 countries: secular trends in mortality 1950-2005. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, v. 83, p. 138-145, 2012.
- MOLDES, O.; SOBRINO, T.; MILLÁN, M.; *et al.* High serum levels of endothelin-1 predict severe cerebral edema in patients with acute ischemic stroke treated with t-PA. *Stroke*, v. 39, p. 2006-2010, 2008.
- MONTANER, J.; MENDIOROZ, M.; DELGADO, P.; *et al.* Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: The S100B/RAGE pathway. *J. Prot.*, v. 75, p. 4758-4765, 2012.
- MOORE, D. F.; LI, H.; JEFFRIES, N.; *et al.* Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: a pilot investigation. *Circulation*, v. 111. p. 212-221, 2005.
- MORONEY, J. T.; BAGIELLA, E.; PAIK, M. C.; *et al.* Risk factors for early recurrence after ischemic stroke: the role of stroke syndrome and subtype. *Stroke*, v. 29, p. 2118-2124, 1998.
- MOUNTFORD, C. E.; SOMORJAI, R.; MALYCHA, P. Diagnosis and prognosis of breast cancer by magnetic resonance spectroscopy of fine needle aspirates analysed using a statistical classification strategy. *Br. J. Surg.*, v. 88, p. 1234-1240, 2001.

- NEIDIG, K. P. Statistics. In: \_\_\_\_ **Manual AMIX-Viewer & AMIX Software Manual**. Rheinstetten, Germany: Bruker Biospin GmbH, 2009, p. 215-300.
- NICHOLSON, J. K.; BUCKINGHAM, M. J.; SADLER, P. J. High resolution  $^1\text{H}$  NMR studies of vertebrate blood and plasma. *Biochem. J.*, v. 211, p. 605-615, 1983.
- NICHOLSON, J. K.; TIMBRELL, J. A.; SADLER, P. J. Proton NMR spectra of urine as indicators of renal damage. *Mol. Pharm.*, v. 27, p. 644-651, 1985.
- NICHOLSON, J. K.; FOXALL, P. J. D. 750 MHz  $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal. Chem.*, v. 67, p. 793-811, 1995.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, C. E. Metabonomics: understanding the metabolic response of living systems to pathological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, v. 29, p. 1181-1189, 1999.
- NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; LINDON, J. C. Metabonomics and metabolomics techniques and their applications in mammalian systems. In: LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. (Ed.(s)). *The handbook of metabonomics and metabolomics*. Oxford: Elsevier Science Ltda, 2007. p.1-33.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON J. C. Metabonomics. *Nature*, v. 455, p. 1054-1056, 2008.
- ODUNSI, K.; WOLLMAN, R. M.; AMBROSONE, C. B.; *et al.* Detection of epithelial ovarian cancer using H-1-NMR-based metabonomics. *Int. J. Cancer*, v. 113, p. 782-788, 2005.
- OLIVER, S. G.; WINSON M. K.; KELL, D. B.; *et al.* Systematic functional analysis of yeast genome. *Trends Biotechnol.*, v.16, p. 373-378, 1998.
- PASCUAL, J. M.; CARCELLER, F.; RODA, J. M.; *et al.* Glutamate, glutamine and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, v. 29, p. 1048-1057, 1998.
- PSYCHOGIOS, N.; HAU, D. D.; PENG, J.; *et al.* The human serum metabolome. *PLoS One*, v. 6, p. e16957, 2011.

- PLISCHKE, A.; CHOI, Y. H.; BRAKEFIELD, P. M.; *et al.* Metabolomic plasticity in GM and non-GM potato leaves in response to aphid herbivory and virus infection. *J. Agric. Food Chem.*, v. 60, p. 1788-1493, 2012.
- POWERS, R. NMR metabolomics and drug discovery. *Magn. Reson. Chem.*, v.47, p. S2-S11, 2009.
- PURROY, F.; MONTANER, J.; MOLINA, C. A.; *et al.* Patterns and predictors of early risk of recurrence after transient ischemic attack with respect to etiologic subtypes. *Stroke*, v. 38, p. 3225-3229, 2007.
- RABENSTEIN, D. L.; MILLIS, K. K.; STRAUSS, E. J. Proton NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal. Chem.*, v. 60, p. 1380-1390, 1988.
- RAFFIN, C. N.; GAGLIARDI, R. J.; MASSARO, A. R.; *et al.* Primeiro consenso brasileiro para trombólise no acidente vascular cerebral isquêmico agudo. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 60, p. 675-680, 2002.
- RAFFIN, C. N.; FERNANDES, J. G.; EVARISTO, E. F.; *et al.* Revascularização clínica e intervencionista no acidente vascular cerebral isquêmico agudo. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 64, p. 342-348, 2006.
- RAO, A.; HATCJER, J. F.; DEMPSEY, R. J. Citicolina: Neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. *J. Neurochem.*, v. 80, p. 12-32, 2002.
- RECHE, R. V.; FRANCO, D. W Distinction between cachaças distilled in pot stills and in columns using chemometrics. *Quím. Nova*, v. 32, p. 332-336, 2009.
- ROOMICK-ROSENDALE, L. E.; BRUNNER, H. I.; BENNETT, M. R.; *et al.* Identification of urinary metabolites that distinguish membranous lupus nephritis from proliferative lupus nephritis and focal segmental glomerulosclerosis. *Arthritis Res Ther.*, 2011, v. 13, p. R199, 2011.
- SAENGER, A. K.; CHRISTENSON, R. H. Stroke biomarkers: Progress and challenges for diagnosis, prognosis, differentiation, and treatment. *Clin. Chem.*, v. 56, p. 21-33, 2010.

- SALEK, R. M.; MAGUIRE, M. L.; BENTLEY, E.; *et al.* A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol. Gen.*, v. 29, p. 99-108, 2007.
- SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in plant metabolomics: Techniques, problems and prospects. *Phytochem. Anal.*, v. 21, p. 14-21, 2010.
- SERENA, J.; BLANCO, M.; CASTELLANOS, M.; *et al.* The prediction of malignant cerebral infarction by molecular brain barrier disruption markers. *Stroke*, v. 36, p. 1921–1926, 2005.
- SHEED, J. R.; EBELING, P. R.; GOOLEY, P. R.; MCCONVILLE, M. J. A. A sample preparation protocol for  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance studies of water-soluble metabolites in blood and urine. *Anal. Biochem.*, v. 398, p 263-265, 2010.
- SINCLAIR, A. J.; VIANT, M. R.; BALL, A. K.; *et al.* NMR-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid and serum in neurological diseases – a diagnostic tool? *NMR Biomed.*, v. 23, p. 123-132, 2010.
- SMOLINSKA, A.; BLANCJET, L.; BUYDENS, L.M.; WIJMENGA, S. S. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: from data acquisition to biomarker discovery: a review. *Anal. Chim. Acta*, v. 750, p. 82-97, 2012.
- SHYUR, L. F.; YANG, N. S. Metabolomics for phytomedicine research and drug development. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v. 12, p. 66-71, 2008.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7ª Ed., Rio de Janeiro,RJ:LTC, 2006.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DOENCAS CEREBROVASCULARES. Primeiro consenso brasileiro para trombólise no acidente vascular cerebral isquêmico agudo. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* v. 60, p. 675-680, 2002.
- SOLANKY, K. S.; BAILEY, N. J. C.; BECKWITH-HALL, B. M.; *et al.* Application of biofluids  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance-based metabonomic techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile. *Anal. Biochem.*, v. 323, p. 197-204, 2003.

- SOPER, R.; HIMMELREICH, U.; PAINTER, D.; *et al.* Pathology of hepatocellular carcinoma and its precursors using proton magnetic resonance spectroscopy and statistical classification strategy. *Pathol.*, v. 34, p. 417-422, 2002.
- STEDMAN. Dicionário médico. 27<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2003. p.1522-1523.
- SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, v. 62, p. 817-836, 2003.
- SULLENTROP, F.; MOKA, D.; NEUBAUER, S.; *et al.* <sup>31</sup>P NMR spectroscopy of blood plasma: determination and quantification of phospholipid classes in patients with renal cell carcinoma. *NMR Biomed.*, v. 15, p. 60–68, 2002.
- TAFFI, R.; NANETTI, L.; MAZZANTI, L. *et al.* Plasma levels of nitric oxide and stroke outcome. *J. Neurol.*, v. 255, p. 94-98, 2008.
- TANG, Y.; XU, H.; DU, X.; *et al.* Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 26, p. 1089-1102, 2006.
- TEAHAN, O.; GAMBLE, S.; HOLMES, E.; *et al.* Impact of analytical bias in metabonomics studies of human blood serum and plasma. *Anal. Chem.*, v. 78, p. 4301-4318, 2006.
- TRYGG, J.; WOLD, S. Orthogonal projection to latent structures (O-PLS). *J. Chemometr.*, v. 16, p. 119-128, 2002.
- TRYGG, J.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics techniques for metabonomics. In: LINDON, J. C; NICHOLSON, J. K; HOLMES, E. (Ed.(s)). *The handbook of metabonomics and metabolomics*. Oxford: Elsevier Science Ltda, 2007. p.171-199.
- TSIVGOULIS, G.; SHARMA, V. K.; LAO, A. Y. *et al.* Validation of transcranial Doppler with computed tomography angiography in acute cerebral ischemia. *Stroke*, v. 38, p. 1245-1249, 2007.

- TUKIAINEN, T.; TYNKKYNEN, T.; MÄKINEN, V. P.; *et al.* A multi-metabolite analysis of serum by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy: early systemic signs of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 375, p. 356-361, 2008.
- VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, v. 324, p. 1029-1033, 2009.
- VEENSTRA, T. D. Metabolomics: the final frontier? *Genome medicine*, v. 4, p. 40-42, 2012.
- WANG, P. R.; WANG, J. S.; YANG, M. H.; KONG, L. Y. Neuroprotective effects of Huang-Lian-Jie-Du-Decoction on ischemic stroke rats revealed by  $^1\text{H}$  NMR metabolomics approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 88, p. 106-116, 2014.
- WATANABE, M.; SHERIFF, S.; LEWIS, K. B.; *et al.* Metabolic profiling comparison of human pancreatic ductal epithelial cells and three pancreatic cancer cell lines using NMR based metabolomics. *J. Mol. Biomark. Diagn.*, v. S3, p. 2, 2012.
- WATERS, N. J.; HOLMES, E.; WILLIAMS, A.; *et al.* NMR and pattern recognition studies on the time related metabolic effects of alfa-naphthylisothiocyanate on liver, urine and plasma in the rat: An integrative metabolomic approach. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 14, p. 1401-1412, 2001.
- WEI, S.; ZHANG, J.; LIU, L.; *et al.* Ratio Analysis NMR Spectroscopy (RANSY) for Selective Metabolite Identification in Complex Samples. *Anal. Chem.*, v. 83, p. 7616-7623, 2011.
- WERTH, M. T.; HALOUSKA, S.; SHORTRIGDE, M. D.; *et al.* Analysis of metabolomic PCA data using tree diagrams. *Anal. Biochem.*, v. 399, p.58-63, 2010.
- WILSON, D. M.; BURLINGAME, A. L. Deuterium and carbon-13 tracer studies of ethanol metabolism in the rat by  $^2\text{H}, ^1\text{H}$ -decoupled  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, v. 56, p. 828-835, 1973.
- WISHART, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends Food Sci. Tech.*, v.19, p. 482-493, 2008.

- WISHART, D. S.; JEWISON, T. GUO, A. C.; *et al.* HMDB 3.0 – The human metabolome database in 2013. *Nucleic. Acids Res.*, v. 41(D1), p. D801-807, 2013.
- WHITELEY, W.; TSENG, M. C.; SANDERCOCK, P. Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke. *Stroke*, v. 39, p. 2902-2909, 2008.
- WHITELEY, W.; CHONG, W. L.; SENGUPTA, A; *et al.* Blood markers for the prognosis of ischemic stroke. *Stroke*, v. 40, p. e380-e389, 2009.
- WHITELEY, W.; WARDLAW, J.; DENNIS, A; *et al.* The use of blood biomarkers to predict poor outcome after acute transient ischemic attack or ischemic stroke. *Stroke*, v. 43, p. 86-91, 2012.
- WORLEY, B.; HALOUSKA, S.; POWERS R. Utilities for quantifying separation in PCA/PLS-DA scores plots. *Anal. Biochem.*, v. 433, p. 102-104, 2013.
- XU, H.; TANG, Y.; LIU, D. Z.; *et al.* Gene expression in peripheral blood differs after cardioembolic compared with large-vessel atherosclerotic stroke: biomarkers for the etiology of ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 28, p. 1320-1328, 2008.
- YANG, M.; WANG, S.; HAO, F.; *et al.* NMR analysis of the rat neurochemical changes induced by middle cerebral artery occlusion. *Talanta*, v. 88, p. 136-144, 2012.
- YU, E. H.; LUNGU, C.; KANNER R. M.; *et al.* The use of diagnostic tests in patients with acute ischemic stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, v. 18, p. 178-184, 2009.
- ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; *et al.* Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, v. 137, p. 293-300, 2012a.
- ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; *et al.* Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J. Proteomics*, v. 75, p. 1079-1088, 2012b.
- ZHOU, A.; NI, J.; XU, Z; *et al.* Application of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy-based metabolomics to sera of tuberculosis patients. *J. Proteome Res.*, v. 12, p. 4642-4649, 2013.