

VÂNIA APARECIDA MENDES GOULART

**METABOLÔMICA APLICADA NA PESQUISA DE
BIOMARCADORES PARA ACIDENTE VASCULAR
ENCEFÁLICO ISQUÊMICO, INFARTO DO
MIOCÁRDIO E ESQUIZOFRENIA**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Dezembro/2018

VÂNIA APARECIDA MENDES GOULART

**METABOLÔMICA APLICADA NA PESQUISA DE
BIOMARCADORES PARA ACIDENTE VASCULAR
ENCEFÁLICO ISQUÊMICO, INFARTO DO
MIOCÁRDIO E ESQUIZOFRENIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências.
Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Dezembro/2018



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
VÂNIA APARECIDA MENDES GOULART**

201/2018
entrada
2º/2014
2014770209

Às **nove horas** do dia **18 de dezembro de 2018**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**METABOLÔMICA APLICADA NA PESQUISA DE BIOMARCADORES PARA ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO, INFARTO DO MIOCÁRDIO E ESQUIZOFRENIA**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Rodrigo Ribeiro Resende**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Rodrigo Ribeiro Resende	UFMG	APROVADA
Dr. Alessandro Ferreira	Vice Presidente do Grupo Hermes Pardini	APROVADA
Dr. José Luiz da Costa	Universidade Estadual de Campinas	APROVADO
Dra. Aline Silva de Miranda	UFMG	APROVADA
Dr. Alexander Birbrair	UFMG	APROVADO

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2018.**

Dr. Rodrigo Ribeiro Resende (Orientador) _____

Dr. Alessandro Ferreira _____

Dr. José Luiz da Costa _____

Dra. Aline Silva de Miranda _____

Dr. Alexander Birbrair _____

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB/UFMG

AGRADECIMENTO

É difícil encontrar palavras que expressem a minha gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste sonho.

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo R. Resende, eu agradeço pelas inúmeras oportunidades, ensinamentos, confiança, incentivo e principalmente por não permitir que eu desistisse nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido, Márcio de Castro, eu agradeço pelo companheirismo e apoio incondicional.

A minha família, eu agradeço pelo apoio e compreensão.

Aos amigos do Laboratório de Sinalização Celular e Nanotecnologia, eu agradeço pelos ensinamentos, pelo apoio e cumplicidade.

Aos nossos colabores de pesquisa, eu agradeço pelas oportunidades e auxílio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, eu agradeço pela atenção prestada, pelas excelentes aulas e pela oportunidade de evoluir na carreira acadêmica.

“A persistência é o caminho do êxito”.

*Charles **S**pencer Chaplin*

RESUMO

A metabolômica tem se destacado por ser uma metodologia capaz de caracterizar fenótipos metabólicos, que são o resultado do que é expresso pelo genoma e acrescido pela influência ambiental. Vários estudos têm relatado a eficiência desta abordagem para a investigação de biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico de diversas doenças. Neste estudo utilizamos as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (sigla em inglês: HPLC-MS/MS) para a análise de cinco classes metabólicas (aminoácidos, aminas biogênicas, fosfatidilcolinas, esfingomielinas e hexose) no plasma/soro de pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico, infarto agudo do miocárdio com supranivelamento do segmento ST, esquizofrenia e controles. Para estas doenças ainda não existem biomarcadores bioquímicos para o diagnóstico ou prognóstico. Neste contexto, utilizamos uma abordagem metabolômica alvo e obtivemos painéis metabólicos capazes de caracterizar cada uma das doenças supracitadas em relação aos controles. De acordo com os nossos resultados, ocorrem distúrbios no metabolismo de glicerofosfolipídeos frente aos processos inflamatórios nos casos de acidente vascular encefálico isquêmico e infarto agudo do miocárdio e no caso de pacientes com esquizofrenia, as alterações nos perfis lipídicos podem estar relacionadas com o uso de antipsicóticos.

Palavras-chave: metabolômica, AVE, infarto, esquizofrenia, HPLC-MS/MS, biomarcadores.

ABSTRACT

Metabolomics has been outstanding because it is a methodology able to characterize metabolic phenotypes, which are the result of what is expressed by the genome and increased by the environmental influence. Several studies have reported on the effectiveness of this approach for biomarkers research for the diagnosis and prognosis of various diseases. In this study we used high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS / MS) for the analysis of five metabolic classes (amino acids, biogenic amines, phosphatidylcholines, sphingomyelins and hexose) in plasma / serum of patients with ischemic stroke, acute myocardial infarction with ST segment elevation, schizophrenia and controls. For these diseases there are still no biochemical biomarkers for diagnosis or prognosis. In this context, we used a target metabolomic approach and obtained metabolic panels capable of characterizing each of the above mentioned diseases in relation to the controls. According to our results, disorders occur in the glycerophospholipid metabolism due to inflammatory processes in cases of ischemic stroke and acute myocardial infarction, and in the case of patients with schizophrenia, changes in lipid profiles may be related to the use of antipsychotics.

Keywords: metabolomics, stroke, infarction, schizophrenia, HPLC-MS / MS, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fluxograma de análises em metabolômica: abordagens não alvo e alvo. .15
- Figura 2. Esquema de um sistema de HPLC acoplado a um espectrômetro de massas..... 18
- Figura 3. Representação esquemática do funcionamento de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo. Espectrômetros de massas com este tipo de analisador permitem análises em tandem (MS/MS)20
- Figura 4. Gráficos dos resultados da Análise de Componentes Principais (PCA). Plotagem dos escores discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com AVEI hiperagudo e controles (A), AVEI subagudo e controles (B) e AVEI crônico e controles (C). Os parâmetros dos modelos foram: (A) 6 PCs, $R^2 = 0,741$ e $Q^2 = 0,505$; (B) 7 PCs, $R^2 = 0,784$ e $Q^2 = 0,538$ e (C) 6 PCs, $R^2 = 0,736$ e $Q^2 = 0,491$39
- Figura 5. Gráficos dos resultados de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). Plotagem dos escores discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com AVEI hiperagudo e controles (A), AVEI subagudo e controles (B) e AVEI crônico e controles (C). Os parâmetros dos modelos foram: (A) 2 variáveis latentes, $R^2Y = 0,778$ e $Q^2Y = 0,586$; (B) 7 variáveis latentes, $R^2Y = 0,919$ e $Q^2Y = 0,828$ e (C) 2 variáveis latentes, $R^2Y = 0,799$ e $Q^2Y = 0,696$41
- Figura 6. Precisão preditiva dos modelos PLS-DA. AUROC (área sobre a curva ROC) construídos a partir de perfis metabólicos de pacientes com AVEI hiperagudo *versus* controles (A); AVEI subagudo *versus* controles (B) e AVEI crônico *versus* controles (C). Linha vermelha: AVEI. Linha azul: controles. TPR: taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade). FPR: taxa de falsos positivos (especificidade).42
- Figura 7. Plotagem do teste de permutação dos modelos PLS-DA, construídos com base no perfil metabólico de pacientes com AVEI e grupo controle. A validação dos modelos foi realizada com 200 permutações..... 43
- Figura 8. Gráficos das análises por OPLS-DA. Plotagem dos escores discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com AVEI hiperagudo e controles (A), AVEI subagudo e controles (B) e AVEI crônico e controles (C). Os parâmetros dos modelos foram: (A) 2 PCs, $R^2Y = 0,778$ e $Q^2 = 0,571$; (B) 2 PCs, $R^2Y = 0,87$ e $Q^2 = 0,813$ e (C) 2 PCs, $R^2Y = 0,799$ e $Q^2 = 0,687$ 45

- Figura 9. *Heatmap* representando o conjunto de metabólitos mais importantes para caracterizar o AVEI. A escala de cores representa a variação da concentração dos metabólitos entre as três fases do AVEI e indivíduos controle. Para o agrupamento hierárquico foi utilizado o algoritmo de Ward, com o dendrograma sendo dimensionado para representar a distância entre cada ramificação através da medida de distância euclidiana51
- Figura 10. Diagrama de *Venn*. Metabólitos comuns às três fases do AVEI e específicos para cada fase.....52
- Figura 11. Vias metabólicas associadas ao AVEI. Com base no conjunto de dados metabolômicos, cada círculo representa uma via metabólica diferente; o tamanho do círculo e a tonalidade da cor são baseados no impacto da via e no valor de p (sendo o vermelho o mais significativo), respectivamente53
- Figura 12. Gráficos dos resultados da Análise de Componentes Principais (PCA). Plotagem dos escores de PCA discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com IAMCSST e controles. Os parâmetros dos modelos foram: 4 PCs, $R^2 = 0,679$ e $Q^2 = 0,47$ 61
- Figura 13. Gráficos dos resultados da análise por PLS-DA e validação do modelo. Plotagem dos escores de PCA discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com IAMCSST *versus* controles (A). Os parâmetros do modelo foram: 3 variáveis latentes, $R^2 = 0,93$ e $Q^2 = 0,811$. Teste de permutação do modelo PLS-DA (B). Validação do modelo com o número de permutações igual a 200.....61
- Figura 14. Gráfico dos resultados obtidos por OPLS-DA. Plotagem dos escores discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com IAMCSST *versus* controles. Os parâmetros do modelo foram: 2 PCs, $R^2 = 0,93$ e $Q^2 = 0,771$ 62
- Figura 15. *Heatmap* do conjunto de dados metabolômicos. As escalas de cores representam a variação da concentração dos metabólitos. Em A estão representadas amostras individuais (eixo horizontal) e metabólitos (eixo vertical); e são separados usando o agrupamento hierárquico (algoritmo de Ward), com o dendrograma sendo dimensionado para representar a distância entre cada ramificação (medida de distância: euclidiana). Em B, o contraste nas médias de concentrações de metabólitos entre o grupo de pacientes com IAMCSST e indivíduos controles.....66
- Figura 16. Vias metabólicas associadas ao IAMCSST. Na visão do metaboloma, cada círculo representa uma via metabólica diferente; o tamanho do círculo e a tonalidade da cor são baseados no impacto da via e no valor p (sendo o vermelho o mais significativo), respectivamente67

- Figura 17. Gráficos das análises por PCA, PLS-DA e validação do modelo. (A) Plotagem dos escores de PCA, (B) plotagem dos escores de PLS-DA, (C) Resultados de validação do modelo PLS-DA por AUROC e (D) Teste de permutação do modelo PLS-DA com interceptos $R^2 = (0.0, 0.698)$ e $Q^2 = (0.0, -0.142)$ 76
- Figura 18. Gráfico dos resultados da análise por OPLS-DA. Plotagem dos escores demonstrando a discriminação entre pacientes com esquizofrenia e controles. Os parâmetros dos modelos foram: 2 PCs; $R^2 = 0,987$; $Q^2 = 0,966$ 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradientes de concentração da fase móvel em HPLC	28
Tabela 2. Taxa de fluxo da solução carreadora nas análises de FIA-MS.....	29
Tabela 3. Dados demográficos e clínicos de pacientes com AVEI e controles	37
Tabela 4. Principais metabólitos para a discriminação entre AVEI hiperagudo e controles.....	46
Tabela 5. Principais metabólitos para a discriminação entre AVEI subagudo e controles.....	48
Tabela 6. Principais metabólitos para a discriminação entre AVEI crônico e controles	49
Tabela 7. Dados clínicos e demográficos de pacientes com IAMCSST e controles .	60
Tabela 8. Principais metabólitos para a discriminação entre IAMCSST e controles .	63
Tabela 9. Características clínicas e demográficas de controles e pacientes com esquizofrenia	75
Tabela 10. Principais metabólitos capazes de diferenciar esquizofrenia e controles	77

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	13
1.1 Definições em metabolômica	13
1.2 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)	17
1.3 Espectrometria de massas por injeção em fluxo (FIA-MS).....	20
1.4 Análises estatísticas em metabolômica.....	21
1.5 Motivação para o desenvolvimento do presente estudo.....	25
1.6 Objetivos Gerais.....	26
1.7 Objetivos Específicos	26
1.8 Preparo de amostras	27
1.9 Condições de análise por HPLC-MS/MS e FIA-MS.....	28
1.10 Tratamentos estatísticos de dados.....	30
CAPÍTULO 2 - METABOLÔMICA APLICADA NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO	32
2.1 Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI)	32
2.2 Recrutamento de pacientes e questões éticas	36
2.3 Resultados	38
2.4 Discussão.....	53
CAPÍTULO 3 - METABOLÔMICA APLICADA NA ANÁLISE DE PACIENTES COM INFARTO DO MIOCÁRDIO	57
3.1 Infarto do miocárdio com supranivelamento do segmento ST.....	57
3.2 Recrutamento de pacientes e questões éticas	59
3.3 Resultados	60
3.4 Discussão.....	67
CAPÍTULO 4 - METABOLÔMICA APLICADA NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES COM ESQUIZOFRENIA	73
4.1 Esquizofrenia.....	73
4.2 Recrutamento de pacientes e questões éticas	74

4.3 Resultados	76
4.4 Discussão.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
REFERÊNCIAS.....	84

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Neste capítulo será apresentada uma breve descrição sobre metabolômica, sobre as plataformas analíticas e métodos estatísticos que são relevantes para o entendimento da metodologia aplicada neste trabalho. Também será apresentada a motivação do trabalho, os objetivos gerais e específicos, bem como, a metodologia analítica que foi utilizada para analisar as amostras de pacientes com Acidente Vascular Isquêmico, Infarto do Miocárdio, Esquizofrenia e indivíduos controles.

1.1 Definições em metabolômica

O termo “Metabolômica” (em inglês: “*metabolome*”) foi introduzido na literatura científica em 1998 pelo pesquisador Oliver e colaboradores [1, 2]. Nesta ocasião, eles investigavam a alteração nas concentrações relativas de metabólitos como resultado da deleção ou super expressão de genes em leveduras [1]. Desde então, novos conceitos e aplicações da metabolômica surgiram e as técnicas de análise evoluíram paralelamente aos avanços em química analítica e análise estatística de dados multivariados [3].

Atualmente, os termos “metabonômica” (em inglês: *metabonomic*) e “metabolômica” têm sido utilizados indistintamente, no entanto, *a priori*, eles possuíam significados diferentes. A distinção é principalmente filosófica, e não técnica. Metabonômica visa medir a resposta metabólica dinâmica global de sistemas vivos a partir de estímulos biológicos ou manipulação genética [4]. O foco está na compreensão da mudança sistêmica ao longo do tempo em sistemas

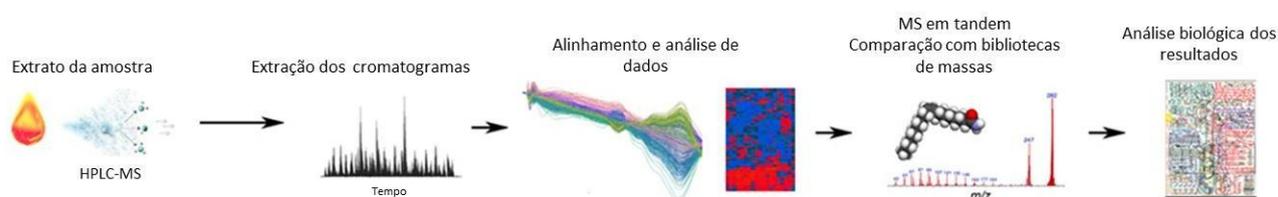
multicelulares complexos. Metabolômica busca uma descrição analítica de amostras biológicas complexas, e tem como objetivo caracterizar e quantificar todas as moléculas com baixo peso molecular, geralmente <1000Da, em tal amostra. Na prática, os procedimentos analíticos e de modelagem são os mesmos [5]. Deste modo, o termo “metaboloma” é utilizado para definir o fenótipo metabólico, e é considerado como o produto final a partir do genoma somado as influências ambientais, consistindo no conjunto de todas as moléculas de baixo peso molecular (metabólitos) em uma célula, tecido ou organismo, necessários para o crescimento, manutenção ou em um estado fisiológico ou patológico específico [6].

Outras abordagens surgiram no campo da metabolômica dando origem a duas estratégias principais: metabolômica alvo (em inglês: *targeted metabolomic*) e metabolômica não alvo (em inglês: *untargeted metabolomic*) (**Figura 1**). Estudos metabolômicos alvo concentram-se na identificação precisa e na quantificação de um conjunto definido de metabólitos em amostras biológicas [7]. Normalmente, esse conjunto de metabólitos é predeterminado de acordo com questão científica a ser respondida e pelas características da plataforma analítica a ser utilizada. Os conjuntos de dados resultantes, geralmente cromatogramas e espectros de massas, são analisados a fim de identificar e quantificar os metabólitos na amostra. A identificação é realizada com o auxílio de bibliotecas metabólicas disponíveis no equipamento ou através de bibliotecas disponibilizadas em servidores via internet [8]. Tais bibliotecas contêm valores de massa/carga já estabelecidos para centenas de metabólitos, além de outras informações como, por exemplo, tempo de retenção do metabólito e fórmula química. Esses dados são utilizados para a comparação com os resultados na amostra e nos de padrões de referência. Após a identificação, os dados geralmente são convertidos em valores de concentração dos metabólitos na amostra e em seguida são submetidos a análises estatísticas univariadas e multivariadas[9]. Considerando que grande parte dos estudos metabolômicos tem como objetivo investigar diferenças metabólicas entre grupos, por exemplo, casos e controles, as ferramentas estatísticas são necessárias para avaliar tais diferenças e para a caracterização de fenótipos metabólicos. Análises de correlações são normalmente aplicadas para o entendimento das diferenças do metabolismo subjacente entre os grupos [10, 11].

Os métodos metabolômicos não alvo são de âmbito global e têm o objetivo de medir simultaneamente o maior número possível de metabólitos a partir de amostras

biológicas [10]. Na estratégia não alvo será medida qualquer molécula que ionize dentro de uma faixa específica de valores de massa. Os experimentos alvo fornecem melhor quantificação, geralmente por meio do uso de padrões internos e condições específicas do equipamento utilizado, enquanto os experimentos não alvos fornecem uma cobertura mais ampla. As análises metabolômicas não alvo podem levar à identificação de novo metabólito(s), e estes podem ser estruturalmente caracterizados em etapas subsequentes, como por exemplo, através de fragmentação de massas [12].

Metabolômica Não Alvo



Metabolômica Alvo

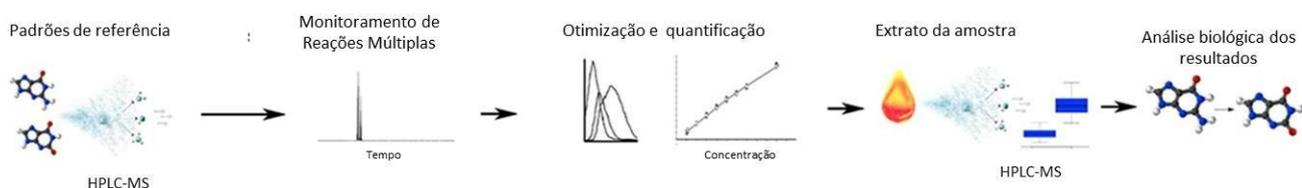


Figura 1. Fluxograma de análises em metabolômica: abordagens não alvo e alvo.

Existem ainda três outras estratégias como sendo ramificações das duas principais supracitadas. A denominação “perfil metabólico” refere-se à estratégia de desenvolvimento de métodos analíticos quantitativos para metabólitos em uma via ou para uma classe de compostos específicos. Esta abordagem produz informação independente que pode ser interpretada em termos de vias bioquímicas conhecidas e/ou de interações fisiológicas [13]. Ainda se tem o *fingerprinting* (tradução: impressão digital metabólica) e o *footprinting* (ainda não há tradução para o português) metabólico. Nas investigações metabolômicas de *fingerprinting*, a intenção não é identificar cada composto da amostra, mas comparar padrões ou “impressões digitais” de metabólitos que mudam em resposta a algum estímulo, tais como doenças, exposição a toxinas ou fármacos, por exemplo [14]. A comparação

de *fingerprints*, que frequentemente são conjuntos de espectros de massa ou picos cromatográficos, é realizada utilizando ferramentas estatísticas, tais como análise hierárquica de clusters ou análise de componentes principais. Se estes tipos de análise resultar na segregação da amostra em agrupamentos metabólicos únicos, esforços adicionais podem ser feitos para elucidar a discriminação de tais metabólitos [13]. O *footprinting* metabólico não se baseia na medição de metabólitos intracelulares, mas sim na monitoração daqueles que são secretados ou deixam de ser absorvidos por uma célula ou tecido [15].

Existem várias plataformas analíticas que podem ser utilizadas para análises metabolômicas [16], tais como ressonância magnética nuclear (RMN) [17], espectroscopia de infravermelho por transformação de Fourier (FT-IR) [18] e espectrometria de massas (MS) acoplada a técnicas de separação, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC) ou eletroforese capilar (CE) [19]. Em vista da diversidade físico-química de pequenas moléculas biológicas, permanece o desafio de desenvolver um ou mais protocolos para determinar todo o metaboloma, de modo que são necessárias as combinações de diferentes técnicas analíticas quando se pretende analisar o metaboloma completo [20]. Desta forma, a escolha da técnica analítica está diretamente relacionada com as propriedades físicas e químicas dos metabólitos a serem analisados, por exemplo, tamanho, volatilidade, presença de grupos ionizáveis, compostos ácidos ou básicos, e etc. [21]. Dependendo da questão biológica, são necessárias diferentes demandas de desempenho analítico, por exemplo, limites de detecção, precisão, exatidão, quantificação, dentre outros parâmetros [3, 22].

Com relação a análise de dados, ao projetar experimentos em metabolômica, a escolha do método de análise estatística multivariada deve ser conduzida de acordo com o tipo dos dados (espectros de massas, concentrações e etc.) e pelos objetivos experimentais. Para estudos exploratórios em que as diferenças metabolômicas entre os grupos experimentais podem ser desconhecidas ou imprevisíveis, a aplicação inicial da Análise de Componentes Principais (PCA) fornece uma primeira visão informativa da estrutura do conjunto de dados e das relações entre os grupos [23]. Mesmo quando a estrutura do conjunto de dados pode ser previsível, o uso inicial de métodos não tendenciosos, como o PCA, fornece confirmação adicional antes da análise por métodos supervisionados. Idealmente, os resultados das análises de PCA seriam usados para formular uma

conclusão biológica inicial, que pode então ser verificada e testada com mais detalhes pelos métodos de Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) ou Análise Discriminante de Projeção Ortogonal para Estruturas Latentes (OPLS-DA). A principal razão para isso é devido ao fato de que a separação é observada apenas entre os grupos nos escores do PCA quando a variação intragrupo é significativamente menor do que a variação entre os grupos, enquanto a separação nos escores PLS-DA ou OPLS-DA pode ser simplesmente fortuita. Portanto, a classificação de PLS-DA guiada por escores de PCA bem separados tem maior probabilidade de produzir resultados biologicamente relevantes [24, 25].

1.2 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)

As plataformas analíticas hífenadas, definidas como o acoplamento de duas técnicas analíticas complementares, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) e suas derivações são amplamente utilizadas em estudos metabolômicos [20, 26]. A cromatografia líquida (LC) é uma técnica de separação versátil que permite a análise de metabólitos de baixo peso molecular e com uma ampla gama de polaridade [27]. Vários nomes têm sido utilizados para denominar esta técnica: alta velocidade, alta pressão, alto desempenho, alta resolução e alta eficiência. As denominações mais empregadas são cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em português, ou sua sigla em inglês: HPLC (*High performance liquid chromatography*) [28].

Cromatografia é um método de separação que depende fundamentalmente da diferença de interação/distribuição dos analitos (moléculas de interesse) entre uma fase que permanece móvel (FM) e outra fase que permanece estacionária (FE), ambas em contato contíguo [29]. A HPLC é uma técnica avançada de cromatografia líquida em coluna. Em HPLC, o solvente flui através de uma coluna sob altas pressões (até 400 atm) para que a amostra possa ser separada em diferentes constituintes com a ajuda da diferença nas afinidades relativas. Os principais

componentes da cromatografia líquida são: a bomba, que movimenta a fase móvel e a amostra através da coluna; uma coluna, que contém a fase estacionária, sendo um revestimento interno da coluna formado por partículas de sílica e/ou outros suportes que podem ser porosas, esféricas e com diâmetros diversos; e um detector que mostra os tempos de retenção das moléculas, sendo que o tempo de retenção varia de acordo com as interações da amostra com as fases estacionária e móvel (**Figura 2**)[30, 31].

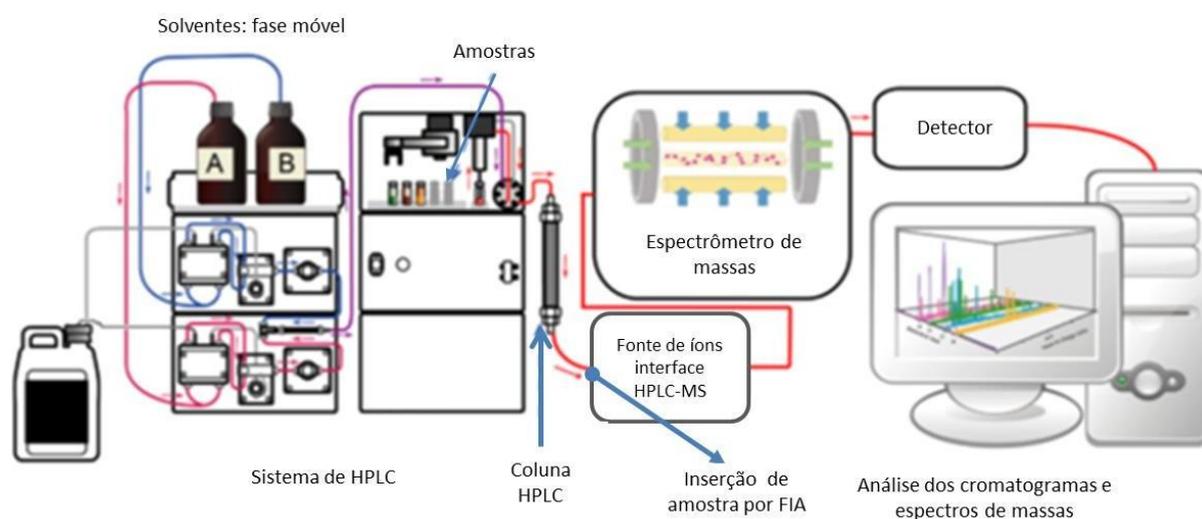


Figura 2. Esquema de um sistema de HPLC acoplado a um espectrômetro de massas.

O acoplamento da HPLC com a espectrometria de massas resultou em uma avançada tecnologia para a separação, identificação e quantificação de pequenas moléculas com altos níveis de sensibilidade (**Figura 2**)[26]. A interface entre um cromatógrafo líquido com um espectrômetro de massas é feita através de uma fonte de ionização. Nesta fonte, é onde ocorre a conversão dos metabólitos que eluem da coluna, ainda dissolvidos na fase móvel, para íons em estado gasoso. A ionização por *electrospray* (ESI) é uma das mais empregadas em HPLC-MS. Numa interface de *electrospray*, o eluato da coluna flui através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem [32]. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*spray*) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂) na região do *spray*. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é

reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada “explosão Coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização [33-36].

As técnicas de ionização usadas em HPLC-MS são geralmente designadas como ionização *soft* (suaves) que exibem principalmente as espécies de íons moleculares com apenas alguns íons fragmentados. Assim, a informação obtida a partir de uma única execução de HPLC-MS, sobre a estrutura do composto, é bastante resumida. No entanto, este problema foi resolvido pela introdução da espectrometria de massas em tandem (MS/MS), que fornece fragmentos através de dissociação induzida por colisão dos íons moleculares produzidos [32].

Em um típico sistema tandem de quadrupolo, há três quadrupolos montados de maneira linear, frequentemente chamados de “triplo quadrupolo” (**Figura 3**). O íon do analito de interesse (geralmente chamado de íon precursor) é selecionado por sua massa pelo primeiro quadrupolo (Q1) e deixado colidir com um gás de colisão (geralmente argônio) em uma segunda célula de colisão quadrupolar (Q2). Os íons precursores são ativados por colisão e sofrem nova fragmentação. Este processo é conhecido como dissociação induzida por colisão (CID). Os íons filhos resultantes da CID estão relacionados com a estrutura molecular dos íons e podem ser monitorados por um terceiro analisador de massa quadripolar (Q3) que fornece a informação estrutural dos íons moleculares. Este sistema em tandem é comumente denotado como MS/MS na literatura. Quando Q1 é configurado para selecionar apenas uma faixa de relação m/z específica, ele filtra outros íons moleculares com valores diferentes de m/z . Esta é uma etapa de “purificação” dentro do sistema MS, eliminando procedimentos de purificação de amostras complicados e demorados antes da análise por MS [37-40].

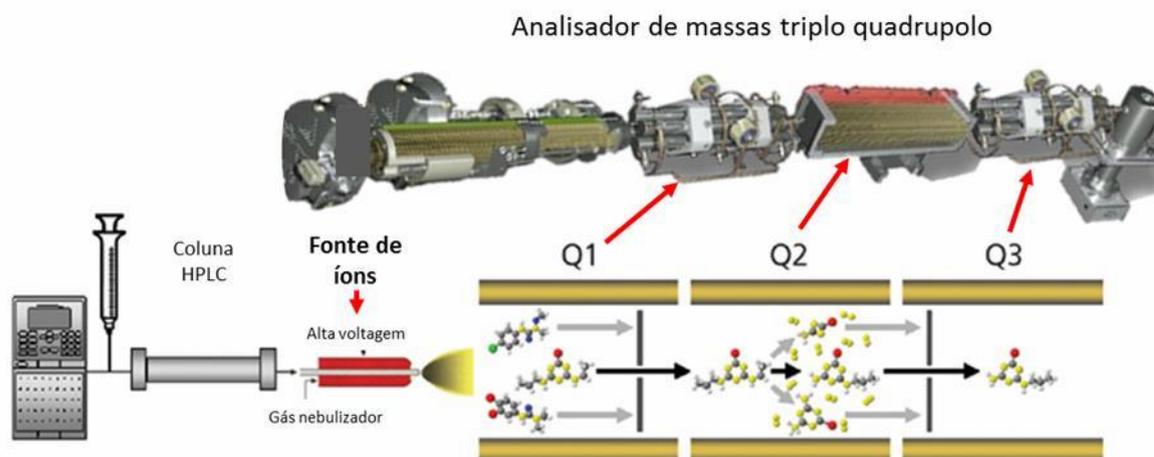


Figura 3. Representação esquemática do funcionamento de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo. Espectrômetros de massas com este tipo de analisador permitem análises em tandem (MS/MS)

1.3 Espectrometria de massas por injeção em fluxo (FIA-MS)

A análise química por injeção em fluxo (FIA) pode ser definida como um processo de automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução aquosa diluída em um fluido carreador é introduzida diretamente em uma câmara de ionização (**Figura 2**), onde é vaporizada e ionizada. Após a ionização, os íons são transportados ao longo de um analisador de massas até o detector de um espectrômetro de massas. É uma técnica que dispensa a separação prévia dos analitos como ocorre, por exemplo, quando se usa HPLC acoplada à espectrometria de massas [41].

A espectrometria de massas baseia-se na separação a vácuo dos íons em uma determinada amostra, em fase gasosa, de acordo com a sua relação massa-carga (m/z). Em sua forma original, a espectrometria de massas fez uso de uma técnica chamada impacto de elétrons (EI) para ionizar os analitos a serem analisados. Essa forma de ionização ainda é a mais usada atualmente. O princípio é simples: um feixe de elétrons de alta energia (e^-), nominalmente de 70 eV, produzido pela passagem de uma corrente através de um filamento (geralmente feito de

tungstênio) é direcionado para o analito de interesse. O feixe de elétrons é suficientemente energético para causar a remoção de um elétron externo do analito, produzindo assim um radical iônico. O radical iônico, em seguida é conduzido pelo analisador de massas até o detector [42, 43].

1.4 Análises estatísticas em metabolômica

Embora experimentos metabolômicos gerem dados multivariados pode-se empregar métodos univariados para testar individualmente se os metabólitos aumentaram ou diminuíram significativamente entre os diferentes grupos. A princípio, os testes univariados comparam valores estatísticos (por exemplo, média ou mediana) entre dois grupos de amostras. Esses testes incluem métodos paramétricos para dados que apresentam distribuição normal, sendo os mais comuns a ANOVA (análise de variância) e o teste t de *student* [44]. Quando uma distribuição normal dos dados não pode ser assumida, então métodos não paramétricos podem ser usados, por exemplo, o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Wilcoxon rank-sum [44, 45]. As comparações resultantes destes testes apresentam uma inferência estatística dada pelos valores de p (probabilidade de significância). O valor p é a probabilidade de ver a diferença observada, ou maior, apenas por acaso, se a hipótese nula for verdadeira. Sendo uma probabilidade, p pode assumir qualquer valor entre 0 e 1. Valores próximos a 0 indicam que a diferença observada é improvável devido ao acaso, enquanto que um valor de p próximo a 1 sugere que não há diferença entre os grupos além daquele devido a variação aleatória. Simplificando, o valor P mede a força da evidência contra a hipótese nula [46].

A maioria dos estudos metabolômicos resulta em conjuntos complexos de dados multivariados com diferentes correlações entre os níveis de metabólitos, de modo que as análises estatísticas multivariadas são essenciais para explorar esses dados [47]. Dentre as técnicas de análises mais comumente empregadas estão a análise de componentes principais (PCA), análises de agrupamento, método dos mínimos quadrados parcial discriminante (PLS-DA), projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA) e variações destes métodos [48-51].

Antes do desenvolvimento de modelos estatísticos multivariados, o conjunto de dados deve ser organizado em uma matriz e uma etapa de pré-processamento é necessária. Na análise metabolômica, o conjunto de dados resultante pode ter diferenças em ordens de grandeza entre as concentrações de metabólitos medidas, por exemplo, a concentração média de uma molécula pode ser muito menor do que a concentração média de um composto altamente abundante. No entanto, do ponto de vista biológico, os metabólitos presentes em altas concentrações não são necessariamente mais importantes do que aqueles presentes em baixas concentrações [52]. Um dos métodos de pré-processamento de dados é o auto-escalamento. Neste método, a média de cada variável (cada coluna da matriz) é subtraída de cada valor de dados, que é subsequentemente dividido pelo desvio padrão da variável. O auto-escalamento é amplamente utilizado em análises metabolômicas por remover a ponderação inadvertida das variáveis que, de outra forma, ocorreriam. Assim, cada variável tem um peso igual na análise [53].

As análises por PCA apresentam um modelo não supervisionado que tenta explicar a variância dentro de um conjunto de dados por um número menor de componentes principais (PCs) mutuamente correlacionados. O objetivo do PCA é chegar a uma transformação linear que preserve o máximo da variação dos dados originais quanto possível nos dados resultantes, porém com uma menor dimensionalidade [24]. No caso de dados metabolômicos, os PCs são vetores que demonstram as contribuições dos metabólitos no modelo. Todos os PCs são construídos de tal forma que eles sejam ortogonais, emparelhados entre si e ordenados pela quantidade de variância que explicam. Na PCA, a matriz de dados é fatorada em duas matrizes: uma matriz de pontuação (*scores*), que contém as posições das observações em um novo sistema de coordenadas rotacionadas e uma matriz de carregamento (*loadings*), que contém os pesos das variáveis originais para transformá-los nas pontuações. Devido à sua aplicabilidade na redução de dimensionalidade, visualização de dados, agrupamento e discriminação de grupos de amostra, o PCA é frequentemente usado como ponto de partida para a análise de dados, especialmente em uma configuração experimental exploratória livre de hipóteses [23, 54, 55].

PLS-DA é uma técnica quimiométrica utilizada para otimizar a separação entre diferentes grupos de amostras, o que é conseguido através da ligação de duas matrizes de dados X (dados brutos) e Y (grupos, membros da classe, etc.). O PLS-

DA) é um método supervisionado de regressão multivariada podendo analisar múltiplos fatores categóricos dependentes. Essa abordagem visa maximizar a covariância entre as variáveis independentes X (leituras amostrais, isto é, os dados metabolômicos) e a variável dependente Y correspondente (classes, grupos; ou seja, os alvos que se deseja prever) de alta multidimensionalidade de dados por encontrar um subespaço linear das variáveis explicativas. Este novo subespaço permite a predição da variável Y baseada em um número reduzido de fatores (componentes PLS, ou o que também são conhecidos como variáveis latentes). Esses fatores descrevem o comportamento das variáveis dependentes Y e abrangem o subespaço no qual as variáveis independentes X são projetadas. Por exemplo, se considerarmos a divisão de amostras em classes diferentes, como estudos de casos-controles, então a variável Y será composta de um único vetor onde pode ser atribuída uma especificação de entrada “0” para todas as amostras da primeira classe (casos) e uma entrada “1” para todas as amostras na segunda classe (controles), ou vice-versa. Quando os dados contiverem três classes, os três grupos serão codificados em 3 variáveis com a matriz Y como, por exemplo, ‘10’ para todas as amostras da classe 1, “20” para amostras da classe 2 e, finalmente, “30” para amostras da classe 3. A principal vantagem desta abordagem PLS-DA é a disponibilidade e manipulação de dados altamente colineares e ruidosos, que são resultados muito comuns de experimentos de metabolômica [47, 56, 57].

Os modelos PLS-DA devem ser validados durante a sua construção. Esta é a validação interna, quando a dimensionalidade do modelo é estabelecida, ou seja, o número de variáveis latentes (LV) é escolhido através da validação cruzada. Em um segundo passo, este modelo é validado com amostras externas não utilizadas em sua construção. Essa etapa é conhecida como validação externa e visa verificar a capacidade preditiva do modelo, garantindo previsões confiáveis e robustas [47].

Para a validação externa, testes de permutação têm sido úteis e recomendados [58]. Um teste de permutação pode avaliar se a classificação específica dos indivíduos em dois grupos designados é significativamente melhor do que qualquer outra classificação aleatória em dois grupos arbitrários [59]. Em um teste de permutação, os rótulos de classe de caso e controle são permutados, eles são aleatoriamente designados para diferentes indivíduos. Com os rótulos de classe "errados", novamente um modelo de classificação é calculado. A lógica por trás do teste de permutação é que, com os rótulos de classe errados, o modelo de

classificação recém-calculado não deve ser capaz de prever as classes muito bem. Como os grupos são formados de maneira aleatória, a suposição é de que não exista diferença entre eles. Ao repetir o teste de permutação muitas vezes, é formada uma distribuição H_0 (hipótese nula) de classificações que se espera que não sejam significativas. Destas classificações, distribuições H_0 para Q^2 (proporção de variância explicada), área sob a curva ROC (AUROC) e para coeficientes de regressão podem ser obtidas. Os resultados obtidos a partir do conjunto de amostras não permutadas devem estar fora dos limites de confiança de 95 ou 99% da distribuição H_0 das classificações permutadas para serem significativos. Uma grande vantagem do teste de permutação é que a distribuição de referência H_0 é sempre baseada em modelos com o mesmo número de amostras, a mesma quantidade de variação, *outliers*, dados ausentes, etc. do modelo original [60, 61].

O PLS-DA tende a construir modelos excessivamente complexos quando existe variação nas medidas que não se correlacionam com a participação em um grupo experimental [24]. Em estudos de amostras complexas, como a metabolômica, dados com alta variabilidade que não se relacionam a grupos são quase inevitáveis. Uma solução para essa questão foi realizada através da elaboração da técnica de correção de sinal ortogonal [62]. Aliando tal técnica ao PLS-DA obteve-se o método estatístico Análise Discriminante de Projeção Ortogonal para Estruturas Latentes (OPLS-DA). A ideia era remover informações sistemáticas em X não correlacionadas com a modelagem de Y , a fim de obter melhores modelos na calibração multivariada. O OPLS-DA fornece uma maneira de remover a variação sistemática de um conjunto de dados de entrada X não correlacionado ao conjunto de respostas Y ; em outras palavras, remove a variabilidade em X que é ortogonal a Y . O método analisa e separa a variação discrepante (não correlacionada) em X da variação correlacionada, com o benefício adicional de que a própria variação não correlacionada possa ser estudada e analisada. Remover a variação não correlacionada nos dados antes da modelagem de dados não é apenas interessante do ponto de vista preditivo, mas também melhora a capacidade interpretativa dos modelos resultantes [50, 63].

Em modelos estatísticos multivariados, a validação e qualidade do modelo, geralmente, são avaliadas pelo parâmetro de melhor ajuste do modelo (R^2) e pelo parâmetro de capacidade preditiva (Q^2). O R^2 representa a proporção de variância explicada por um dado componente no modelo, enquanto Q^2 é definida como a

proporção de variância no modelo previsível de dados sob validação cruzada [44]. O R^2 varia de 0 a 1, com níveis mais altos indicando maior precisão preditiva; enquanto $Q^2 = 1$ indica previsibilidade perfeita [61, 64]. Nos testes de permutação o limiar para R^2 e Q^2 é baseado no valor dos pontos onde as linhas de regressão tocam o eixo vertical do gráfico. É desejável que R^2 e Q^2 cruzem o eixo Y abaixo de 0,4 e 0,05, respectivamente [65].

Determinar quais variáveis independentes contribuem mais para as previsões é um aspecto importante na interpretação dos modelos de classificação multivariada, principalmente na pesquisa de potenciais biomarcadores. Um parâmetro robusto para a interpretação das variáveis é o vetor dos escores VIP (importância da variável na projeção) [66]. A importância variável na projeção dos escores (VIP scores) é uma soma ponderada dos quadrados dos pesos PLS (matriz X), levando em conta a quantidade de variância explicada em cada dimensão. Sua atração está em sua parcimônia intrínseca, já que para um dado modelo sempre haverá apenas um vetor VIP resumindo todos os componentes e variáveis. Como as pontuações VIP são uma função quadrada dos pesos PLS, somente valores positivos serão encontrados. Preditores com um grande VIP, geralmente maior que 1, são os mais influentes para o modelo [67, 68].

1.5 Motivação para o desenvolvimento do presente estudo

Em 1998, os grupos de trabalho dos Institutos Nacionais de Definição de Biomarcadores de Saúde dos EUA definiram um biomarcador como “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica” [69]. Para ser realmente útil, um biomarcador deve contribuir com informações clinicamente relevantes além do que está disponível ou fornecer as mesmas informações a um custo menor, ou com resultados em menor tempo e ser obtidos por métodos pouco invasivos aos pacientes. Como uma ferramenta para melhorar o diagnóstico, as assinaturas moleculares podem ser utilizadas para aumentar a precisão do diagnóstico na população em geral, nas

populações de risco ou naquelas com achados clínicos suspeitos que exigem confirmação [70].

Neste contexto, a metabolômica tem se destacado por ser uma metodologia capaz de caracterizar fenótipos metabólicos, que são o resultado do que é expresso pelo genoma e acrescido pela influência ambiental [3, 71]. Vários estudos têm relatado a eficiência desta abordagem para a investigação de biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico de diversas doenças: Alzheimer [72, 73], cânceres de vários tipos [74-77], cardiovasculares [78-80], cerebrovasculares [81, 82], neuropsiquiátricas [83, 84], dentre outras.

Considerando que a metabolômica oferece uma abordagem intensiva que permite a identificação de características metabólicas de uma doença, dado que uma pequena alteração nos níveis de expressão gênica ou proteínas gera uma mudança significativa no nível de metabólitos [85], realizamos, neste estudo, a investigação de potenciais biomarcadores para doenças que ainda não possuem marcadores bioquímicos para o diagnóstico laboratorial. Utilizando uma abordagem metabolômica alvo, encontramos painéis metabólicos capazes de caracterizar o acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI), infarto do miocárdio e esquizofrenia.

1.6 Objetivos Gerais

Utilizando uma abordagem metabolômica alvo, visamos encontrar potenciais biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico de acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI), infarto do miocárdio e esquizofrenia.

1.7 Objetivos Específicos

- Analisar e identificar 187 metabólitos pertencentes a cinco classes metabólicas (aminoácidos, aminas biogênicas, fosfatidilcolinas, esfingomielinas e hexose) em plasma/soro humano de pacientes com AVEI, infarto do miocárdio, esquizofrenia e controles;

- Realizar as análises de aminoácidos e aminas biogênicas por HPLC-MS/MS;
- Realizar as análises de fosfatidilcolinas, esfingomielinas e hexose por FIA-MS/MS;
- Quantificar os metabólitos nas amostras com base nos padrões de referência;
- Comparar, através de análises estatísticas univariadas, as diferenças de concentração dos metabólitos entre as amostras de pacientes e controles;
- Analisar, através de métodos estatísticos multivariados, a capacidade dos metabólitos que apresentarem relevância estatística em caracterizar e prever as doenças em questão;
- Selecionar, com base nos resultados estatísticos, os metabólitos com maiores potenciais para se tornarem biomarcadores das doenças em questão.

1.8 Preparo de amostras

Os metabólitos foram extraídos das amostras de plasma (ou soro) humano utilizando um sistema de placas (uma placa para HPLC-M/MS e outra para FIA-MS, acopladas) de 96 poços específicos para remoção de proteínas, normalização de padrões internos e derivatização utilizando o kit AbsoluteIDQ p180 (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria). A preparação da amostra foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram adicionadas no centro de um filtro na placa superior de 96 poços em alíquotas de 10 µL por poço e secas usando um evaporador sob um fluxo de nitrogênio (pressão de 3-4 bars), sob temperatura ambiente, durante 30 min. Após a secagem, foram adicionados 50 µl de uma solução contendo 300 µl de fenilisotiocianato (PITC) + 1900 µl de etanol + 1900 µl de H₂O + 1900 µl de piridina em cada poço e a placa ficou incubada durante 20 min à temperatura ambiente. Após, a placa foi submetida a secagem durante 60 min no evaporador sob um fluxo de nitrogênio (pressão de 3-4 bars). Em seguida, foram adicionados 300 µl de uma solução de acetato de amônio em metanol (5 mM) em cada poço e incubado em um agitador (450 rpm) por 30 min para a derivatização dos aminoácidos e aminas biogênicas. A placa foi centrifugada a 100 g por 2 min. Após a filtragem, 250 µl de extrato de amostra foram transferidos para a placa de análise

por injeção em fluxo (FIA) e o restante permaneceu na placa de análise para HPLC-MS. Na placa para FIA, foram adicionados 400 µl de solvente de corrida (Todo conteúdo de 1 ampola de solvente I - Biocrates diluído em 290 mL de metanol). Em ambas as placas, foram adicionadas uma amostra em branco (sem padrões internos e nenhuma amostra), três amostras zero (solução salina tamponada com fosfato) e três amostras de controle de qualidade (QCs). Os QCs são compostos por amostras de plasma humano liofilizadas contendo padrões de metabólitos em vários níveis de concentração, que foram ressuspensos em água mili-Q e utilizados para verificar o desempenho do ensaio e do espectrômetro de massas. Uma diluição serial de sete pontos de calibradores foi adicionada à placa de 96 poços (HPLC) para gerar curvas de calibração para quantificação de aminoácidos e amins biogênicas. Padrões internos de homólogos químicos foram utilizados para quantificar espécies de glicerofosfolípídeos e esfingomielinas na placa FIA, e padrões internos marcados com isótopo estável foram utilizados para quantificar as outras classes de compostos. A quantidade de padrão interno foi idêntica em cada poço, e as intensidades do padrão interno das amostras zero e dos demais poços foram comparadas para desenvolver conclusões sobre os efeitos de supressão de íons.

1.9 Condições de análise por HPLC-MS/MS e FIA-MS

As análises foram conduzidas utilizando o cromatógrafo Acquity-UPLC (Waters Technologies, Massachusetts, EUA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo-TQ-S (Waters Technologies, Massachusetts, EUA). Os aminoácidos e amins biogênicas foram separados por HPLC utilizando uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (1,7, 2,1 x 50 mm) (Waters Chromatography, Dublin, Irlanda) e em seguida analisados por espectrometria de massas em tandem no modo positivo. O gradiente da fase móvel foi obtido usando duas soluções: solvente A- água mili-Q + 0, 2% de ácido fórmico e solvente B- acetonitrila + 0,2% de ácido fórmico, conforme **Tabela 1**.

Tabela 1. Gradientes de concentração da fase móvel em HPLC

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0.00	100	0

0.38	100	0
3.00	85	15
5.40	30	70
5.50	0	100
5.66	0	100
5.84	0	100
5.93	0	100
6.10	100	0
6.60	100	0

Através de um amostrador automático, foram injetados 5 µL de cada extrato de amostra na coluna. A taxa de fluxo dos solventes da fase móvel foi de 900 µL/min e o forno da coluna foi mantido a uma temperatura constante de 50°C. A detecção e quantificação dos metabólitos por espectrometria de massas em tandem foram realizadas através de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os cromatogramas e espectros de massa obtidos por HPLC-MS/MS (aminoácidos e aminas biogênicas) foram analisados utilizando o software *TargetLynx Application Manager* (Waters Technologies, Massachusetts, EUA). Todas as concentrações foram medidas em µM.

As acilcarnitinas, glicerofosfolípídeos e esfingolípídeos foram analisados pela técnica de injeção em fluxo (FIA), no espectrômetro de massas triplo quadrupolo, no modo positivo. Nestas análises, 20 µL de extrato de cada amostra foram injetados, utilizando um amostrador automático, diretamente em uma fonte de íons do tipo *electrospray* (ESI). Como solução carreadora foi utilizado o Solvente I Biocrates + 290 mL de metanol, conforme **Tabela 2**. O tempo total de corrida para cada amostra foi de 3 minutos. A intensidade dos sinais MS/MS de cada analito em relação ao seu padrão interno foi utilizada como base de cálculo da concentração do analito na amostra. A análise de dados e o cálculo das concentrações de metabólitos analisados por FIA-MS (acilcarnitinas, glicerofosfolípídeos, esfingolípídeos e hexoses) foram automatizados usando o software MetIDQ (Biocrates Life Sciences AG, Áustria), parte integrante do kit que importa os arquivos de dados brutos da Waters.

Tabela 2. Taxa de fluxo da solução carreadora nas análises de FIA-MS

Tempo em minutos	Taxa de Fluxo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Concentração do Solvente I (%)
0.0	30	100
1.6	30	100
2.4	200	100
2.8	200	100
3.0	30	100

1.10 Tratamentos estatísticos de dados

Os conjuntos de dados obtidos por HPLC-MS/MS foram analisados usando métodos univariados e multivariados. O software GraphPad Prism-8 (La Jolla, California, USA) e o servidor Metaboanalyst 3.0 (www.metaboanalyst.ca) foram utilizados para realizar análises univariadas entre os grupos estudados, especificamente foram realizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Wilcoxon Mann-Whitney para identificar variáveis (metabólitos) com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) nas concentrações.

Para a análise multivariada, foi utilizado o software SIMCA 14.0 (Umetrics, Umeå, Suécia). Os conjuntos de dados contendo as variáveis estatisticamente significativas foram submetidos à normalização por escala de variância unitária (UV) e em seguida à análise de componentes principais (PCA), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e projeção ortogonal análise discriminante de estruturas latentes (OPLS-DA) [41]. O método não supervisionado PCA foi realizado para verificar as tendências de separação entre os grupos. Após, o PLS-DA foi executado. Os modelos foram avaliados pelo parâmetro de ajuste do modelo (R^2) e pelo parâmetro capacidade preditiva (Q^2). Os modelos OPLS-DA foram construídos e examinados para determinar quais variáveis foram as principais responsáveis por qualquer separação observada entre os grupos. Para identificar quais variáveis foram responsáveis por essa separação, o parâmetro de influência da variável na projeção (VIP) foi utilizado para selecionar variáveis com a contribuição mais significativa na discriminação entre os perfis metabolômicos dos pacientes com acidente vascular encefálico isquêmico e os controles. Em nosso trabalho, as

variáveis independentes foram as concentrações de metabólitos e a observação dos coeficientes de regressão permitiu identificar quais foram os mais positivos (alto conteúdo) ou negativamente (baixo conteúdo) relacionados a uma classe prevista. Foram construídos *heatmaps* baseados em ANOVA (análise de variância) e agrupamento hierárquico (método de Ward e distância Euclidiana) usando o servidor Metaboanalyst 3.0 (www.metaboanalyst.ca). As variações entre as concentrações dos metabólitos podem ser observadas nos *heatmaps*. A elucidação das vias metabólicas relacionadas aos perfis metabólicos encontrados também foi realizada utilizando o servidor Metaboanalyst 3.0. Este servidor via web, obtém sua capacidade preditiva do banco de dados de vias metabólicas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). O software utiliza o enriquecimento de via e a análise topológica para identificar as vias mais alteradas sob as condições experimentais específicas. Diagramas de *Venn* foram construídos para separar metabólitos específicos de uma determinada condição (exclusivamente para as fases de AVEI) usando o servidor online Bioinformática e Genômica Evolutiva (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Capítulo 2

METABOLÔMICA APLICADA NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO

Neste capítulo apresentaremos uma breve revisão sobre o Acidente Vascular Encefálico Isquêmico, as características demográficas e clínicas do grupo estudado, os resultados obtidos através das metodologias descritas nos itens 1.8, 1.9 e 1.10 do capítulo anterior e a discussão destes resultados.

2.1 Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI)

Acidente vascular encefálico (AVE) é uma das principais causas de morte e incapacidade permanente no mundo [86]. O acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI) é geralmente caracterizado pelo comprometimento do suprimento vascular para o cérebro e é o evento primário na maioria (85-90%) dos AVEs agudos [87]. A grande maioria dos AVEIs é devido à oclusão da artéria encefálica por um trombo, especialmente na artéria cerebral média [88]. O reconhecimento precoce da lesão isquêmica é fundamental para minimizar as consequências, a recorrência e melhorar os resultados terapêuticos [89].

No AVEI, os processos bioquímicos que levam à lesão tecidual resultam de déficits de oxigênio e glicose [90]. Imediatamente após o acidente vascular encefálico isquêmico, uma cascata de eventos bioquímicos promove a morte do tecido cerebral e subsequente ativação da resposta imune à área afetada [91]. Durante a isquemia, a inibição da síntese de ATP mitocondrial leva ao consumo de todo ATP presente nas células dentro de aproximadamente dois minutos, o que provoca a despolarização das membranas plasmáticas neuronais e das células da glia, a liberação do K^+ para o espaço extracelular e a entrada de Na^+ , Cl^- e água para as células. Além do desequilíbrio osmótico e iônico, a despolarização da membrana também ativa os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, provocando a liberação de neurotransmissores. Os níveis de Ca^{2+} intracelulares podem subir para 50-100 mM, sendo que em condições normais a concentração é cerca de 1,2 mM [92]. Este rápido aumento do cálcio intracelular se deve ao influxo através da membrana e também da liberação do Ca^{2+} presentes nas mitocôndrias e no retículo citoplasmático. O excesso de Ca^{2+} citosólico causa a ativação de proteases cálcio-dependentes, fosfolipases, lipases, ATPases e endonucleases [93]. A ativação dessas enzimas altera a função celular, desestabiliza a estrutura da membrana plasmática e do citoesqueleto, aumenta a lipólise pelo metabolismo de ácidos graxos livres, induz a produção de radicais superóxido; promovendo danos ao DNA, e por fim, levam à morte celular [94]. Resumidamente, a isquemia desencadeia uma cascata de eventos, incluindo a liberação de mediadores inflamatórios agudos, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 beta (IL-1 β), metabólitos do ácido araquidônico, espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico e metaloproteinases de matriz [95, 96]. Esses mediadores levam à supra-regulação das moléculas de adesão E- e P-selectina nas células endoteliais e à peroxidação lipídica da membrana induzida por radicais livres, culminando na ativação da resposta imune e morte celular por apoptose ou necrose [87, 97, 98].

O AVE isquêmico é uma doença heterogênea que pode ser dividida em subtipos de acordo com a etiologia. O sistema TOAST (Trial of Org 10172) de classificação denota cinco subtipos de acidente vascular encefálico isquêmico: aterotrombótico (aterosclerose de grandes artérias), cardioembólico (cardioembolismo), lacunar (oclusão de pequenos vasos), acidente vascular encefálico de outra etiologia determinada (por exemplo, causado por anemia

falciforme) e acidente vascular encefálico etiologia indeterminada (AVE criptogênico) [99]. Recentemente, o constructo clínico de “acidente vascular encefálico embólico de fonte indeterminada” (ESUS) foi introduzido para identificar pacientes com AVE isquêmico criptogênico e não lacunar nos quais a embolia era o provável mecanismo de AVE [100].

A gravidade do AVE está diretamente relacionada ao volume da lesão, à área do cérebro envolvida e ao tempo de início do tratamento [101]. O reconhecimento da causa específica dos acidentes vasculares cerebrais, que são etiologicamente heterogêneos, tem implicações clínicas importantes [102]. O prognóstico e a administração de estratégias precoces e de longo prazo para prevenir a recaída podem variar consideravelmente para os diferentes subtipos de AVE [103]. Para recuperação, os pacientes devem ser tratados com terapias restauradoras específicas. A maioria dos pacientes apresenta alguma melhora, geralmente durante os primeiros 3 a 6 meses após a isquemia [104]. Entretanto, o maior risco de recorrência e mortalidade para pacientes com AVEI ocorre nos primeiros 30 dias [105].

A maior compreensão de como as manifestações da neuroplasticidade estão relacionadas à recuperação do AVE é obtida por meio de técnicas multimodais no imageamento cerebral [106]. Atualmente, as técnicas padrão para o diagnóstico e prognóstico do AVE são baseadas em observações clínicas e avaliação de neuroimagem [107]. Assim como a neuroimagem, a avaliação cardíaca e a angiografia são usadas no diagnóstico de acidente vascular encefálico, podendo identificar suas causas e auxiliando no tratamento e mecanismos de recuperação [106]. O padrão atual de diagnóstico é a tomografia computadorizada (TC) cerebral sem contraste por ser rápida e amplamente disponível [108]. No entanto, a ressonância magnética (MRI) tem uma maior sensibilidade para detectar acidente vascular encefálico isquêmico e uma maior resolução espacial para detectar isquemia cerebral de menor volume, ou seja, casos em que os déficits são muito leves [109]. Ambas as técnicas possuem limitações inerentes, o que significa que algumas etiologias de acidente vascular encefálico isquêmico não são diagnosticadas adequadamente [108].

O prognóstico do AVEI depende de vários fatores demográficos e clínicos: idade, sexo, etnia, subtipo de AVE, hipertensão, AVE prévio, hipoglicemia, diabetes, fibrilação atrial e doenças cardíacas [110-112]. Atualmente, escalas preditoras de

desfecho de AVE, como a NIHSS (*National Institutes of Health Stroke Scale*), têm sido utilizadas para auxiliar na escolha do tratamento e evitar recidivas, incapacidades e morte [113]. NIHSS é uma ferramenta utilizada pelos profissionais de saúde para quantificar objetivamente os déficits cognitivos e motores causados por um acidente vascular encefálico [114].

O tratamento ideal do AVEI envolve a remoção do trombo e o restabelecimento do fluxo sanguíneo para a região afetada. A remoção pode ser feita mecanicamente ou por trombólise intravenosa [115]. A única opção de tratamento farmacológico aprovada pela “*Food and Drug Administration*” dos Estados Unidos (FDA) para o AVE agudo é o ativador do plasminogênio tecidual (tPA), um agente fibrinolítico [116]. No entanto, tPA tem muitas desvantagens, incluindo uma janela de tempo estreita para uso, baixa adesão do paciente e efeitos colaterais graves, incluindo hemorragia [117].

A restauração do fluxo de sangue e oxigênio, no primeiro momento, pode provocar um aumento da área lesionada. Esse processo é chamado de lesão de isquemia-reperfusão e é caracterizado pelo aumento da geração de EROs pelas células do parênquima, do endotélio e por leucócitos infiltrantes [118]. As mitocôndrias desempenham um papel crítico na lesão de isquemia-reperfusão. As grandes concentrações de EROs e cálcio podem promover a transição da permeabilidade da membrana interna mitocondrial, impossibilitando a produção de ATP e o declínio energético, conseqüentemente, leva à morte celular [119]. Além disso, outros mecanismos desencadeados pelo excesso de produção de EROs também culminam no aumento da lesão, sendo eles: peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; oxidação de grupos sulfidríla inativando uma variedade de enzimas; alterações do DNA inibindo a síntese de ATP e consumindo as reservas de dinucleotídeos adenínicos; direta inativação do óxido nítrico comprometendo os relaxamentos vasculares do endotélio; formação de peroxinitrito, um ânion instável e tóxico, resultante da reação do óxido nítrico com o oxigênio; ativação de citocinas; ruptura da barreira hematoencefálica e estimulação da agregação plaquetária nos vasos sanguíneos reperfundidos [120-122].

Até então, nenhum biomarcador bioquímico para o diagnóstico ou prognóstico do AVE foi aceito para uso clínico. Muitos potenciais biomarcadores já foram identificados, no entanto, nenhum até agora demonstrou sensibilidade e especificidade suficientes para serem utilizados no cenário clínico [123-125]. Vários

estudos têm analisado alterações metabólicas em biofluidos causadas pela isquemia [78, 126-128]. A isquemia cerebral resulta na ativação de uma cascata de eventos moleculares, na qual vários metabólitos com as características potenciais dos biomarcadores são liberados no sangue periférico [129]. Embora ainda em fase de pesquisa, a análise desses biomarcadores no sangue e seus derivados pode ser útil para o diagnóstico de acidente vascular encefálico, bem como para a previsão da evolução da lesão isquêmica e do prognóstico clínico [130-132].

Metabolômica é um método analítico imparcial para obter uma medida quantitativa da resposta metabólica a estímulos fisiopatológicos, que tem sido amplamente aplicada para a descoberta de biomarcadores e para elucidar a patogênese de doenças [133, 134]. Como a patogênese do AVEI é heterogênea e multifatorial, é crucial estabelecer abordagens metabolômicas abrangentes para elucidar essas alterações nesta doença [3, 135]. Análises metabólicas e ferramentas de bioinformática têm sido amplamente utilizadas para descobrir perfis metabólicos capazes de caracterizar a doença em suas fases e etiologia [8, 103, 136].

2.2 Recrutamento de pacientes e questões éticas

As amostras foram obtidas de pacientes com AVE isquêmico (n = 23) em três momentos: T1 = tempo de internação (fase hiperaguda); T2 = 72 horas após o *ictus* (fase subaguda) e T3 = após dez dias (fase crônica) de internação [137, 138]. Os pacientes foram diagnosticados com acidente vascular encefálico isquêmico por ressonância magnética (MRI), que é considerada a técnica padrão ouro para o diagnóstico. De acordo com a NIHSS, os pacientes foram avaliados e classificados com os seguintes escores: 1-normal (sem sintomas), 2-leve acidente vascular encefálico, 3- acidente vascular encefálico moderado e 4- acidente vascular encefálico grave [113]. Os critérios de exclusão foram: diagnóstico positivo de AVE hemorrágico, presença de outras doenças neurodegenerativas, tumores cerebrais e aneurisma. As amostras de plasma do grupo controle (n=19) foram obtidas de indivíduos que nunca tiveram AVEI ou AVE hemorrágico, doenças neurodegenerativas, tumores cerebrais e aneurisma. Quanto a etiologia, os

pacientes com AVEI foram classificados em subtipos de acordo com o sistema TOAST: aterotrombótico, Cardioembólico, Lacunar, Indeterminado e ESUS.

Os participantes foram recrutados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG, Brasil) e na Santa Casa de BH (Belo Horizonte, MG, Brasil). As características demográficas e clínicas dos pacientes e controles são mostradas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Dados demográficos e clínicos de pacientes com AVEI e controles

Pacientes	Idade (média, ±SD)	Fatores de risco					AVEI prévio
		HAS* (%)	Tabagismo (%)	Dislipidemia (%)	Diabetes Mellitus (%)		
AVEI n= 23							
Homens	9 73,33 (±12,01)	66,67	55,56	33,33	11,11	17,4	
Mulheres	14 63,15 (±13,39)	78,57	7,15	50,00	64,29	34,8	
Controles n= 19							
Homens	9 55,56 (±12,07)	44,4	44,4	-	-	-	
Mulheres	10 58,30 (±7,70)	70,0	30,0	-	-	-	
NIHSS*	1		2	3	4		
Hiperagudo ^a	-		13,0	69,6	17,4		
Subagudo ^b	-		13,0	74,0	13,0		
Crônico ^c	17,4		13,04	60,87	8,70		
TOAST*	Aterotrombótico	Cardioembólico	Lacunar	Indeterminado	ESUS*		
	21,7%	4,3%	34,8%	30,5%	8,7%		

*HAS= Hipertensão Arterial Sistêmica; * NIHSS= National Institutes of Health Stroke Scale (escala de classificação de prognóstico de AVE); * ESUS = AVEI embólico de fonte desconhecida; *SD= desvio padrão; *TOAST= Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (escala de classificação da etiologia do AVEI); Fases: a) Hiperaguda=momento da admissão; b) subaguda= ~72h após o infarto e c) Crônico=dez dias após o infarto.

As amostras de sangue foram obtidas usando tubos BD Vacutainer (Becton Dickinson, New Jersey, EUA) contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Os tubos de sangue foram mantidos à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos antes da centrifugação. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 12

minutos a 1500g e 4°C. Em seguida, o plasma foi coletado, transferido para microtubos (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e armazenado a -80 °C até o momento de análise.

O estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque, e seu protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número 312.840. O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por cada paciente e indivíduo controle antes de sua inclusão no estudo.

2.3 Resultados

As concentrações de 184 metabólitos foram obtidas a partir do plasma de pacientes com AVEI e controles. Destes metabólitos, 126 apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados com base no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Esses resultados demonstraram que as concentrações para cada metabólito variaram significativamente entre os grupos. Na análise estatística multivariada, este painel metabólico foi utilizado para construir modelos com o objetivo de caracterizar as fases do AVEI em relação aos controles, apontando as semelhanças e diferenças metabólicas entre eles.

A análise não supervisionada por PCA foi aplicada, primeiramente, para explorar correlações entre indivíduos saudáveis e pacientes com AVEI. De acordo com a análise dos gráficos de escores por PCA, houve uma tendência de separação dos pacientes com AVEI e controles (**Figura 4A-C**). Essa tendência apareceu no início do AVE isquêmico (fase hiperaguda), foi mais evidente na fase subaguda e ainda estava presente na fase crônica. Esses resultados sugerem que os pacientes com AVEI, nas três fases analisadas, apresentam perfis metabólicos significativamente diferentes dos indivíduos que nunca tiveram a doença.

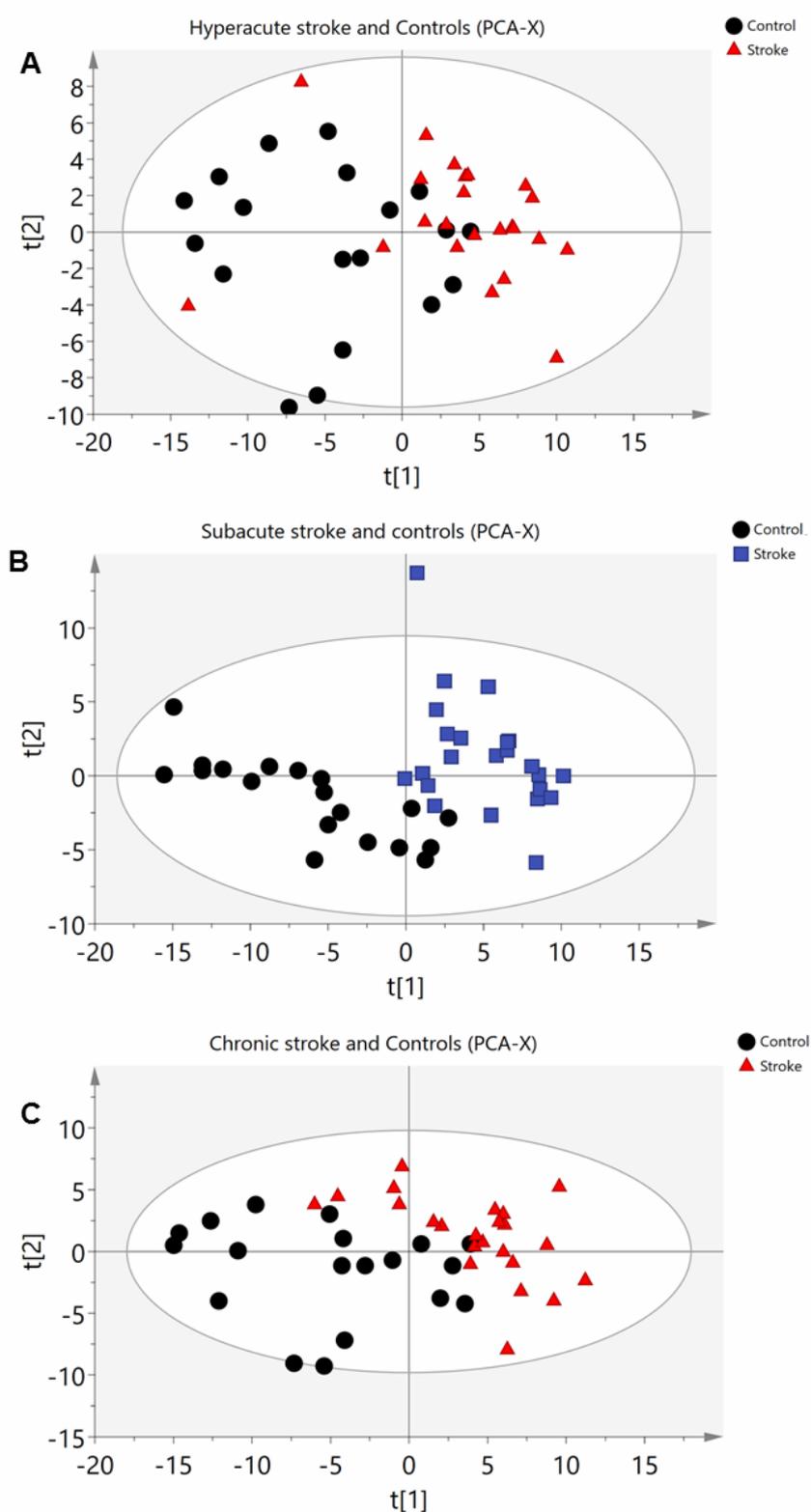


Figura 4. Gráficos dos resultados da Análise de Componentes Principais (PCA). Plotagem dos escores discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com AVEI hiperagudo e controles (A), AVEI subagudo e controles (B) e AVEI crônico e controles (C). Os parâmetros dos modelos foram: (A) 6 PCs, $R^2 = 0,741$ e $Q^2 = 0,505$; (B) 7 PCs, $R^2 = 0,784$ e $Q^2 = 0,538$ e (C) 6 PCs, $R^2 = 0,736$ e $Q^2 = 0,491$.

Em seguida, as análises por PLS-DA foram realizadas. A análise PLS-DA é uma extensão do PCA na qual o algoritmo é fornecido com uma associação de classe das amostras. Os componentes são projetados e girados em torno de um eixo para obter a separação máxima entre as classes, ou seja, fornecer a melhor descrição da variabilidade relacionada à classe [61]. Os modelos de classificação por PLS-DA (**Figura 5A-C**) demonstraram que as diferenças metabólicas são evidentes entre o grupo controle e o grupo de acidente vascular encefálico nas fases hiperaguda, subaguda e crônica. Os valores AUROC para cada modelo PLS-DA são mostrados na **Figura 6A-C**. O eixo X mostra a taxa de falsos positivos e o eixo Y mostra a taxa de verdadeiros positivos. Isso possibilitou avaliar a qualidade do modelo de classificação de acordo com a especificidade e sensibilidade, respectivamente. O valor de AUROC para o modelo de classificação entre pacientes com AVEI e controles foi de 0,991 na fase hiperaguda, 1 na fase subaguda e 0,997 na fase crônica. A validação dos modelos PLS foi realizada utilizando o teste de permutação. Duzentas permutações foram realizadas para cada modelo, e os valores dos interceptos obtidos são mostrados na **Figura 7A-C**. Para a verificação da qualidade do modelo pelo teste de permutação foram avaliados, no gráfico, os pontos onde as linhas de regressão cruzaram o eixo vertical, interceptos com limiares $R^2 < 0,4$ e $Q^2 < 0,05$ são desejáveis [65]. Os valores dos interceptos Q^2 apresentados para os três modelos de PLS-DA (**Figura 7A-C**) foram todos menores do que o limiar, o que indica que são modelos altamente preditivos. Os modelos construídos para as fases hiperaguda e crônica tiveram resultados de R^2 inferiores ao limiar, o que demonstra que não foram sobreajustados. O valor do R^2 para o modelo da fase subaguda foi um pouco acima do limite desejável, mas a capacidade preditiva do modelo não foi afetada.

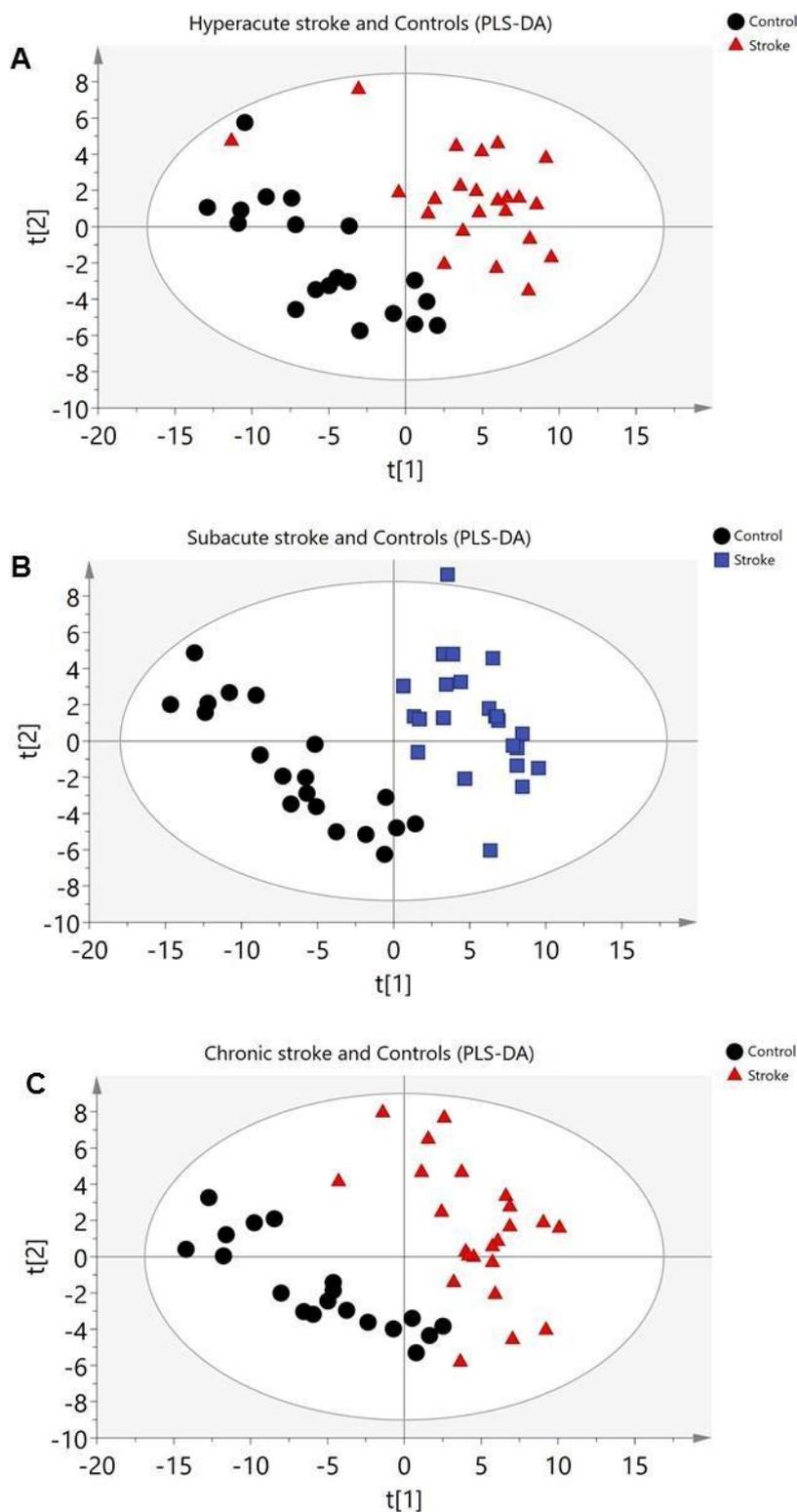


Figura 5. Gráficos dos resultados de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). Plotagem dos escores discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com AVEI hiperagudo e controles (A), AVEI subagudo e controles (B) e AVEI crônico e controles (C). Os parâmetros dos modelos foram: (A) 2 variáveis latentes, $R^2Y = 0,778$ e $Q^2Y = 0,586$; (B) 7 variáveis latentes, $R^2Y = 0,919$ e $Q^2Y = 0,828$ e (C) 2 variáveis latentes, $R^2Y = 0,799$ e $Q^2Y = 0,696$.

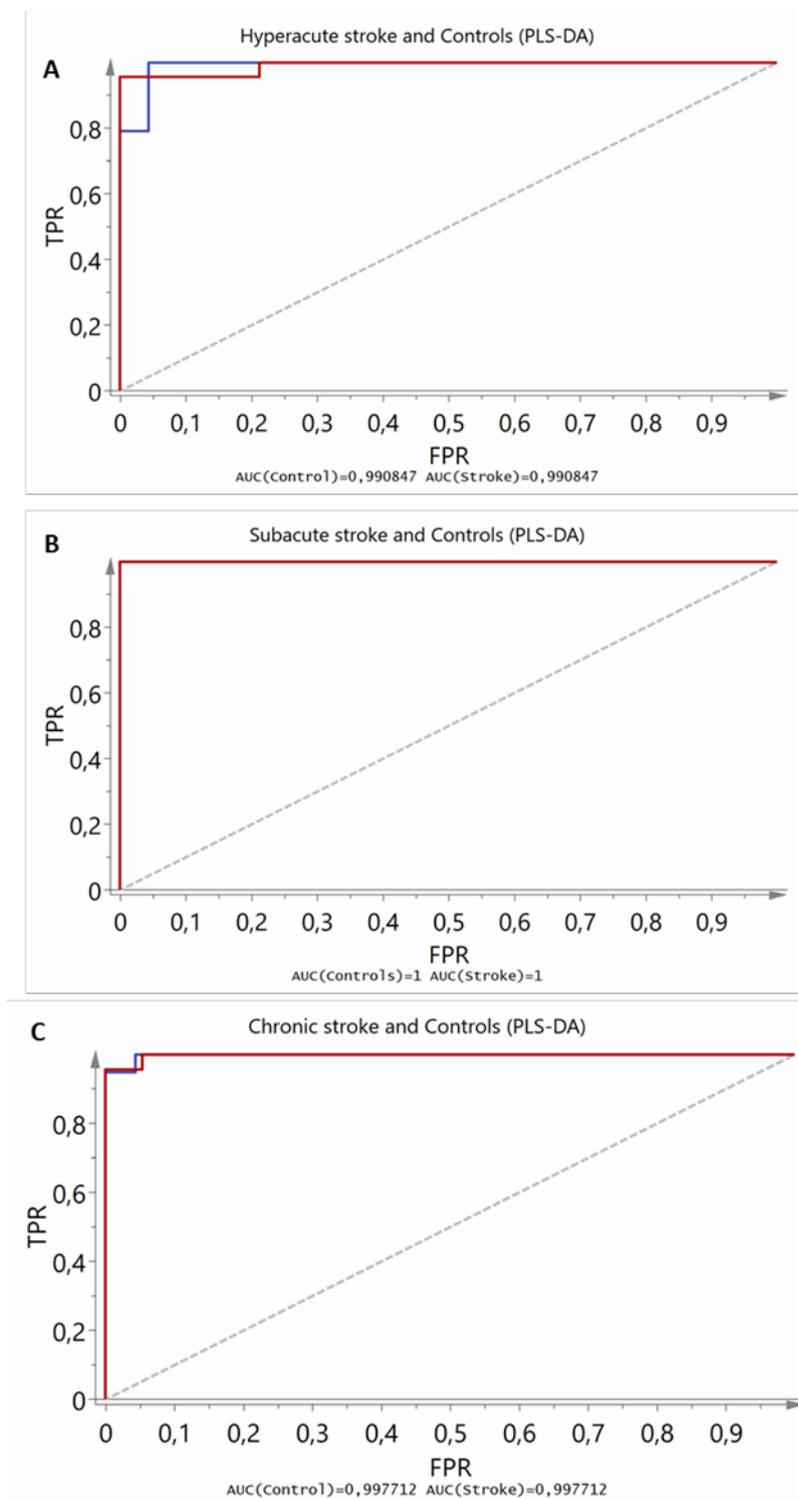


Figura 6. Precisão preditiva dos modelos PLS-DA. AUROC (área sobre a curva ROC) construídos a partir de perfis metabólicos de pacientes com AVEI hiperagudo *versus* controles (A); AVEI subagudo *versus* controles (B) e AVEI crônico *versus* controles (C). Linha vermelha: AVEI. Linha azul: controles. TPR: taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade). FPR: taxa de falsos positivos (especificidade).

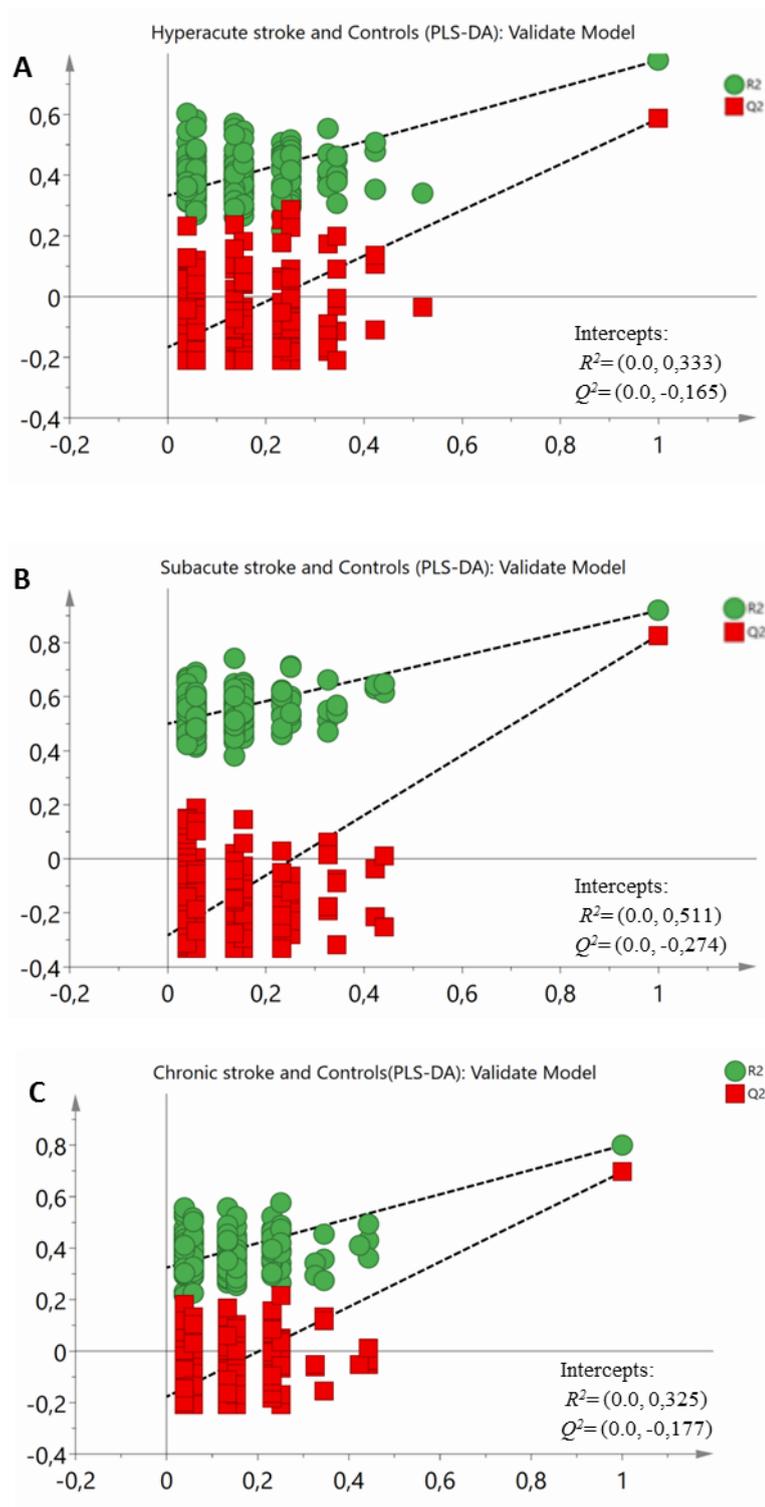


Figura 7. Plotagem do teste de permutação dos modelos PLS-DA, construídos com base no perfil metabólico de pacientes com AVEI e grupo controle. A validação dos modelos foi realizada com 200 permutações.

Para identificar quais metabólitos melhor caracterizavam cada grupo, foram construídos os modelos supervisionados por OPLS-DA. Os resultados obtidos por OPLS-DA foram mais eficientes para a investigação de biomarcadores e para as distinções entre os grupos estudados. As plotagens dos escores das análises por OPLS-DA mostraram uma separação evidente entre os grupos de AVEI (nas três fases) e controles (**Figura 8A-C**). Para verificar quais variáveis independentes (metabólitos) foram mais importantes para a classificação entre os grupos, usando OPLS-DA, os VIP escores foram calculados. Combinando os valores de $VIP > 1$ com os resultados obtidos através da análise estatística univariada, selecionamos os metabólitos diferenciais entre pacientes com AVEI e controles. As **Tabelas 4, 5 e 6** mostram os metabólitos mais importantes para a discriminação entre pacientes com AVEI hiperagudo, subagudo e crônico *versus* controles, respectivamente. Através desta análise, observamos que 50 metabólitos foram mais importantes para a separação/classificação entre as amostras de pacientes com AVEI na fase hiperaguda e os controles, 31 metabólitos foram mais importantes na fase subaguda e 30 metabólitos foram mais importantes na fase crônica do AVEI. Utilizamos os painéis de metabólitos mais importantes nas três fases do AVEI e controles para a construção de um *heatmap*. Através do *heatmap*, observamos que as concentrações dos metabólitos flutuaram ao longo das três fases do AVEI (**Figura 9**). Isto sugere que os pacientes com AVEI agudo sofreram alterações em seus perfis metabólicos desde o início dos sintomas até a fase de recuperação.

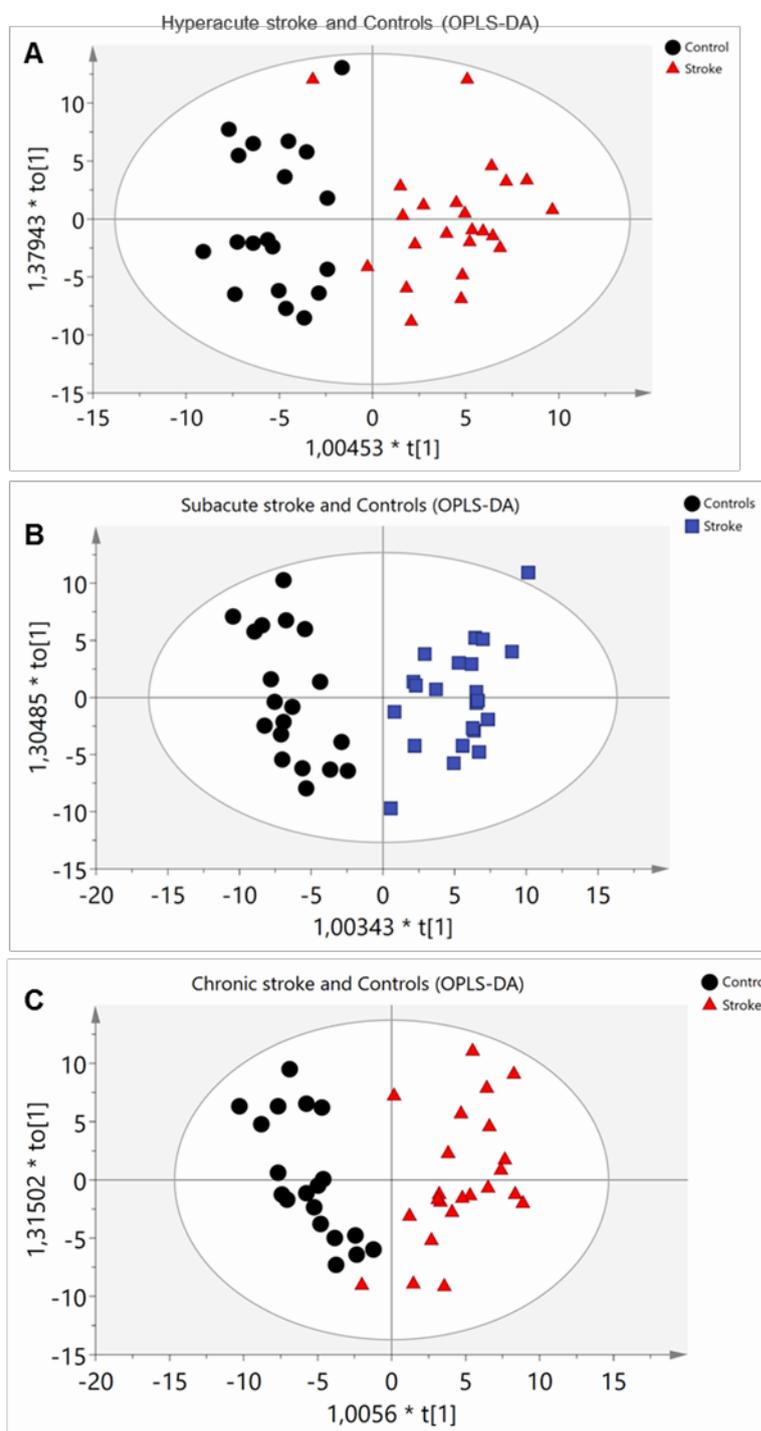


Figura 8. Gráficos das análises por OPLS-DA. Plotagem dos escores discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com AVEI hiperagudo e controles (A), AVEI subagudo e controles (B) e AVEI crônicos e controles (C). Os parâmetros dos modelos foram: (A) 2 PCs, $R^2Y = 0,778$ e $Q^2 = 0,571$; (B) 2 PCs, $R^2Y = 0,87$ e $Q^2 = 0,813$ e (C) 2 PCs, $R^2Y = 0,799$ e $Q^2 = 0,687$.

Tabela 4. Principais metabólitos para a discriminação entre AVEI hiperagudo e controles

Nº	Metabólitos	Classes	VIP ^a	FC ^b	p-value ^c	q-value ^d	Controles	AVEI
1	PC aa C34:3	Fosfatidilcolinas	1,54	2.11	< 0.0001	0.0001	Alto	Down
2	PC ae C36:3	Fosfatidilcolinas	1,47	1.89	< 0.0001	0.0000	Alto	Baixo
3	PC aa C36:1	Fosfatidilcolinas	1,46	1.8	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
4	PC ae C42:2	Fosfatidilcolinas	1,46	1.55	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
5	PC ae C34:3	Fosfatidilcolinas	1,43	1.84	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
6	PC ae C36:2	Fosfatidilcolinas	1,43	1.85	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
7	PC aa C36:3	Fosfatidilcolinas	1,41	1.59	< 0.0001	0.0000	Alto	Baixo
8	PC ae C38:2	Fosfatidilcolinas	1,37	1.77	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
9	PC aa C34:4	Fosfatidilcolinas	1,36	2.0	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
10	PC ae C42:0	Fosfatidilcolinas	1,35	1.13	< 0.0001	0.0000	Alto	Baixo
11	PC aa C36:6	Fosfatidilcolinas	1,35	1.8	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
12	PC ae C34:1	Fosfatidilcolinas	1,34	1.53	0.0003	0.0007	Alto	Baixo
13	PC ae C36:4	Fosfatidilcolinas	1,33	1.52	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
14	PC ae C36:1	Fosfatidilcolinas	1,33	1.55	0.0001	0.0003	Alto	Baixo
15	PC ae C38:0	Fosfatidilcolinas	1,31	1.51	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
16	PC ae C32:1	Fosfatidilcolinas	1,31	1.54	0.0004	0.0008	Alto	Baixo
17	PC ae C36:0	Fosfatidilcolinas	1,30	1.35	0.0002	0.0004	Alto	Baixo
18	PC ae C32:2	Fosfatidilcolinas	1,28	1.48	0.0006	0.0010	Alto	Baixo
19	lysoPC a C16:0	Lisofosfatidilcolinas	1,28	-2.14	0.0001	0.0003	Baixo	Alto
20	PC aa C32:1	Fosfatidilcolinas	1,27	2.03	0.0002	0.0004	Alto	Baixo
21	Phe	Aminoácidos	1,26	-1.4	< 0.0001	0.0001	Baixo	Alto
22	PC aa C42:6	Fosfatidilcolinas	1,26	1.37	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
23	PC aa C38:0	Fosfatidilcolinas	1,25	1.33	0.0009	0.0013	Alto	Baixo
24	PC aa C34:1	Fosfatidilcolinas	1,25	1.34	0.0005	0.0010	Alto	Baixo
25	PC ae C34:0	Fosfatidilcolinas	1,24	1.52	0.0005	0.0010	Alto	Baixo
26	PC aa C40:3	Fosfatidilcolinas	1,24	1.46	0.0004	0.0008	Alto	Baixo
27	PC aa C36:2	Fosfatidilcolinas	1,23	1.5	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo

28	lysoPC a C20:4	Lisofosfatidilcolinas	1,23	-2.22	0.0006	0.0010	Baixo	Alto
29	PC ae C38:6	Fosfatidilcolinas	1,23	1.38	0.0004	0.0008	Alto	Baixo
30	PC ae C38:3	Fosfatidilcolinas	1,22	1.63	0.0009	0.0013	Alto	Baixo
31	PC aa C30:0	Fosfatidilcolinas	1,22	1.51	0.0017	0.0021	Alto	Baixo
32	PC ae C38:5	Fosfatidilcolinas	1,20	1.36	0.0005	0.0009	Alto	Baixo
33	PC ae C42:3	Fosfatidilcolinas	1,20	1.4	0.0007	0.0011	Alto	Baixo
34	PC aa C42:2	Fosfatidilcolinas	1,19	1.36	0.0012	0.0017	Alto	Baixo
35	PC ae C38:4	Fosfatidilcolinas	1,19	1.33	0.0006	0.0010	Alto	Baixo
36	PC aa C32:3	Fosfatidilcolinas	1,19	1.39	0.0016	0.0021	Alto	Baixo
37	PC ae C40:4	Fosfatidilcolinas	1,18	1.41	0.0018	0.0022	Alto	Baixo
38	PC ae C40:5	Fosfatidilcolinas	1,17	1.3	0.0056	0.0060	Alto	Baixo
39	PC aa C42:5	Fosfatidilcolinas	1,16	1.35	0.0003	0.0007	Alto	Baixo
40	PC ae C40:6	Fosfatidilcolinas	1,15	1.28	0.0012	0.0017	Alto	Baixo
41	PC aa C42:4	Fosfatidilcolinas	1,15	1.46	0.0004	0.0008	Alto	Baixo
42	PC ae C30:0	Fosfatidilcolinas	1,13	1.62	0.0021	0.0024	Alto	Baixo
43	PC ae C40:2	Fosfatidilcolinas	1,13	1.31	0.0037	0.0040	Alto	Baixo
44	PC aa C40:1	Fosfatidilcolinas	1,10	1.25	0.0066	0.0069	Alto	Baixo
45	PC ae C36:5	Fosfatidilcolinas	1,09	1.37	0.0025	0.0028	Alto	Baixo
46	PC aa C36:5	Fosfatidilcolinas	1,09	1.56	0.0013	0.0018	Alto	Baixo
47	lysoPC a C18:0	Lisofosfatidilcolinas	1,08	-2.0	0.0019	0.0022	Baixo	Alto
48	lysoPC a C14:0	Lisofosfatidilcolinas	1,07	-1.36	0.0016	0.0021	Baixo	Alto
49	PC aa C32:0	Fosfatidilcolinas	1,04	1.22	0.0263	0.0263	Alto	Baixo
50	lysoPC a C18:1	Lisofosfatidilcolinas	1,03	-1.7	0.0142	0.0145	Baixo	Alto

a Importância da variável na projeção (VIP) foi obtida do modelo OPLS-DA com um limiar acima de 1,0;

b *Fold-change* (FC) foi calculada pelo valor da média de concentração de metabólitos do grupo AVEI hiperagudo em relação ao grupo Controle;

c O valor de *p* foi calculado pelo teste de Wilcoxon Mann Whitney;

d *q-values* foram calculados usando o valor *p* ajustado com a taxa de falsa descoberta (FDR)

Tabela 5. Principais metabólitos para a discriminação entre AVEI subagudo e controles

Nº	Metabólitos	Classes	VIP ^a	FC ^b	p-value ^c	q-value ^d	Controles	AVEI
1	PC aa C34:3	Fosfatidilcolinas	1,48	-2.13	0.0019	0.0057	Baixo	Alto
2	PC ae C34:3	Fosfatidilcolinas	1,42	2.34	0.0002	0.0009	Alto	Baixo
3	PC ae C36:2	Fosfatidilcolinas	1,42	-3.43	<0.0001	0.0000	Baixo	Alto
4	PC aa C36:1	Fosfatidilcolinas	1,41	2.3	< 0.0001	0.0000	Alto	Baixo
5	PC ae C36:3	Fosfatidilcolinas	1,41	2.17	0.0001	0.0008	Alto	Baixo
6	PC aa C36:3	Fosfatidilcolinas	1,36	-2.78	0.0074	0.0173	Baixo	Alto
7	PC ae C32:2	Fosfatidilcolinas	1,32	1.78	0.0002	0.0009	Alto	Baixo
8	PC ae C42:2	Fosfatidilcolinas	1,32	1.58	0.0002	0.0010	Alto	Baixo
9	PC aa C32:3	Fosfatidilcolinas	1,29	1.66	0.0003	0.0011	Alto	Alto
10	PC aa C36:6	Fosfatidilcolinas	1,27	2.18	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
11	PC ae C38:6	Fosfatidilcolinas	1,27	1.98	< 0.0001	0.0001	Alto	Baixo
12	PC aa C30:0	Fosfatidilcolinas	1,27	1.94	0.0001	0.0008	Alto	Baixo
13	PC ae C38:2	Fosfatidilcolinas	1,26	1.56	0.0361	0.0695	Alto	Baixo
14	PC aa C38:0	Fosfatidilcolinas	1,19	1.17	0.0038	0.0110	Alto	Baixo
15	PC aa C42:2	Fosfatidilcolinas	1,19	1.57	0.0004	0.0014	Alto	Baixo
16	SM C24:0	Esfingomielinas	1,18	1.55	< 0.0001	0.0002	Alto	Baixo
17	PC ae C30:0	Fosfatidilcolinas	1,17	2.06	0.0055	0.0141	Alto	Baixo
18	PC ae C42:3	Fosfatidilcolinas	1,17	1.43	0.0165	0.0346	Alto	Baixo
19	PC aa C42:5	Fosfatidilcolinas	1,17	1.48	< 0.0001	0.0000	Alto	Baixo
20	PC ae C36:0	Fosfatidilcolinas	1,15	1.23	0.0052	0.0139	Alto	Baixo
21	PC ae C40:6	Fosfatidilcolinas	1,15	1.3	0.0365	0.0695	Alto	Baixo
22	lysoPC a C16:0	Lisofosfatidilcolinas	1,11	-1.3	0.0080	0.0180	Baixo	Alto
23	SM OH C16:1	Esfingomielinas	1,11	1.58	0.0006	0.0023	Alto	Baixo
24	lysoPC a C18:1	Lisofosfatidilcolinas	1,10	-1.7	0.0089	0.0194	Baixo	Alto
25	PC aa C34:2	Fosfatidilcolinas	1,08	-1.32	0.0071	0.0173	Baixo	Alto
26	Phe	Aminoácidos	1,08	-1.47	< 0.0001	0.0001	Baixo	Alto
27	PC aa C38:5	Fosfatidilcolinas	1,07	1.49	< 0.0001	0.0005	Alto	Baixo

28	PC aa C40:1	Fosfatidilcolinas	1,06	1.34	0.0052	0.0139	Alto	Baixo
29	lysoPC a C16:1	Lisofosfatidilcolinas	1,06	-1.74	0.0015	0.0047	Baixo	Alto
30	PC ae C40:2	Fosfatidilcolinas	1,06	1.09	0.0472	0.0873	Alto	Baixo
31	PC aa C42:4	Fosfatidilcolinas	1,02	1.74	< 0.0001	0.0002	Alto	Baixo

a Importância da variável na projeção (VIP) foi obtida do modelo OPLS-DA com um limiar acima de 1,0;

b *Fold-change* (FC) foi calculada pelo valor da média de concentração de metabólitos do grupo AVEI subagudo em relação ao grupo Controle;

c O valor de *p* foi calculado pelo teste de Wilcoxon Mann Whitney;

d *q-values* foram calculados usando o valor *p* ajustado com a taxa de falsa descoberta (FDR)

Tabela 6. Principais metabólitos para a discriminação entre AVEI crônico e controles

Nº	Metabólitos	Classes	VIP ^a	FC ^b	<i>p</i> -value ^c	<i>q</i> -value ^d	Controles	AVEI
1	PC aa C34:3	Fosfatidilcolinas	1,53	-2.67	0.0107	0.0275	Baixo	Alto
2	PC ae C36:2	Fosfatidilcolinas	1,46	-4.03	< 0.0001	0.0000	Baixo	Alto
3	PC ae C36:3	Fosfatidilcolinas	1,43	1.71	0.0016	0.0095	Alto	Baixo
4	PC ae C42:2	Fosfatidilcolinas	1,40	1.54	0.0007	0.0062	Alto	Baixo
5	PC ae C34:3	Fosfatidilcolinas	1,39	1.75	0.0021	0.0100	Alto	Baixo
6	PC aa C36:6	Fosfatidilcolinas	1,38	1.92	< 0.0001	0.0007	Alto	Baixo
7	PC aa C36:1	Fosfatidilcolinas	1,35	1.96	< 0.0001	0.0003	Alto	Baixo
8	PC ae C38:2	Fosfatidilcolinas	1,34	1.43	0.0801	0.1325	Alto	Baixo
9	lysoPC a C16:0	Lisofosfatidilcolinas	1,34	-1.22	0.0031	0.0112	Baixo	Alto
10	PC aa C30:0	Fosfatidilcolinas	1,29	1.65	0.0014	0.0092	Alto	Baixo
11	PC ae C42:3	Fosfatidilcolinas	1,28	1.29	0.0201	0.0432	Alto	Baixo
12	PC ae C32:2	Fosfatidilcolinas	1,26	1.49	0.0039	0.0133	Alto	Baixo
13	PC ae C42:0	Fosfatidilcolinas	1,25	1.16	0.0007	0.0062	Alto	Baixo
14	PC ae C40:2	Fosfatidilcolinas	1,25	1.17	0.0181	0.0408	Alto	Baixo
15	PC ae C36:0	Fosfatidilcolinas	1,24	1.29	0.0123	0.0303	Alto	Baixo
16	PC ae C30:0	Fosfatidilcolinas	1,23	2.14	0.0046	0.0145	Alto	Baixo
17	PC aa C38:0	Fosfatidilcolinas	1,22	1.17	0.0103	0.0275	Alto	Baixo
18	PC aa C42:2	Fosfatidilcolinas	1,22	1.5	0.0022	0.0100	Alto	Baixo
19	PC aa C42:4	Fosfatidilcolinas	1,21	1.6	< 0.0001	0.0007	Alto	Baixo
20	PC aa C34:1	Fosfatidilcolinas	1,20	-1.21	0.0337	0.0675	Baixo	Alto

21	PC ae C38:6	Fosfatidilcolinas	1,19	1.54	0.0008	0.0062	Alto	Baixo
22	PC aa C32:3	Fosfatidilcolinas	1,18	1.33	0.0061	0.0183	Alto	Baixo
23	PC ae C40:6	Fosfatidilcolinas	1,18	1.33	0.0103	0.0275	Alto	Baixo
24	PC aa C42:5	Fosfatidilcolinas	1,13	1.32	0.0018	0.0097	Alto	Baixo
25	PC aa C40:1	Fosfatidilcolinas	1,12	1.14	0.0834	0.1325	Alto	Baixo
26	PC aa C36:2	Fosfatidilcolinas	1,11	-1.67	0.0401	0.0967	Baixo	Alto
27	lysoPC a C18:1	Lisofosfatidilcolinas	1,11	-1.74	0.0024	0.0100	Baixo	Alto
28	lysoPC a C16:1	Lisofosfatidilcolinas	1,08	-1.45	0.0208	0.0432	Baixo	Alto
29	PC aa C36:5	Fosfatidilcolinas	1,04	-2.27	0.0153	0.0358	Baixo	Alto
30	PC ae C42:4	Fosfatidilcolinas	1,03	-1.96	0.0030	0.0112	Baixo	Alto

a Importância da variável na projeção (VIP) foi obtida do modelo OPLS-DA com um limiar acima de 1,0;

b *Fold-change* (FC) foi calculada pelo valor da média de concentração de metabólitos do grupo AVEI crônico em relação ao grupo Controle;

c O valor de *p* foi calculado pelo teste de Wilcoxon Mann Whitney;

d *q-values* foram calculados usando o valor *p* ajustado com a taxa de falsa descoberta (FDR)

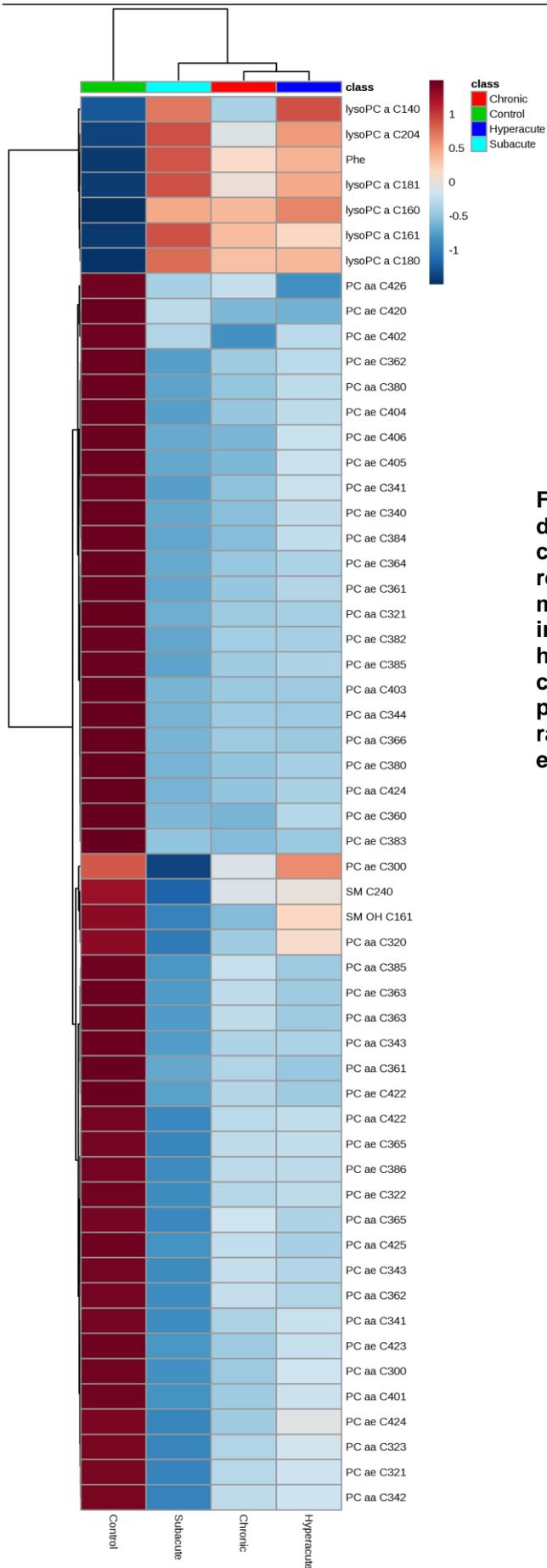
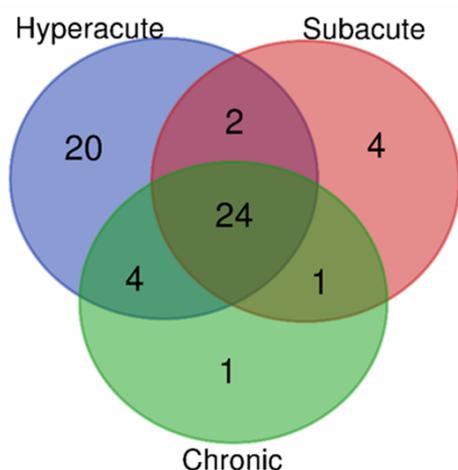


Figura 9. Heatmap representando o conjunto de metabólitos mais importantes para caracterizar o AVEI. A escala de cores representa a variação da concentração dos metabólitos entre as três fases do AVEI e indivíduos controle. Para o agrupamento hierárquico foi utilizado o algoritmo de Ward, com o dendrograma sendo dimensionado para representar a distância entre cada ramificação através da medida de distância euclidiana.

Para visualizar quais dos metabólitos apresentados nas **Tabelas 4, 5 e 6** foram comuns nas três fases do AVEI, construímos um diagrama de *Venn* (**Figura 10**). Descobrimos que 24 metabólitos foram comuns às três fases do AVE. Na fase hiperaguda, 20 metabólitos foram específicos. Quatro metabólitos foram específicos para a fase subaguda e apenas um metabólito foi específico para a fase crônica do AVEI.

Dentre as cinco classes de metabólitos analisadas neste estudo (aminoácidos, aminas biogênicas, fosfatidilcolinas, esfingomielinas e hexose), os resultados obtidos por meio da investigação de vias metabólicas mostraram que o metabolismo dos glicerofosfolípídeos foi o que sofreu maiores alterações durante as três fases do AVEI (**Figura 11**). A diminuição nas concentrações de alguns lipídeos em pacientes com AVEI, principalmente fosfatidilcolinas, já havia sido demonstrada nas **Tabelas 4, 5 e 6**.



Stroke phases	Total metabolites	Metabolites
Chronic Hyperacute Subacute	24	PC ae C42:2; PC ae C42:3; PC aa C32:3; PC ae C40:6; PC ae C34:3; PC ae C36:2; PC ae C36:0; PC aa C36:6; PC aa C30:0; PC ae C38:6; PC aa C40:1; PC aa C42:4; PC ae C30:0; lysoPC a C18:1; PC ae C38:2; PC ae C32:2; PC aa C42:5; lysoPC a C16:0; PC ae C40:2; PC aa C34:3; PC aa C42:2; PC aa C36:1; PC aa C38:0 and PC ae C36:3.
Hyperacute Subacute	2	Phe and PC aa C36:3.
Chronic Hyperacute	4	PC aa C36:5; PC aa C36:2; PC ae C42:0 and PC aa C34:1.
Chronic Subacute	1	lysoPC a C16:1.
Hyperacute	20	PC aa C34:4; PC ae C38:4; lysoPC a C20:4; PC ae C38:0; PC ae C36:5; lysoPC a C18:0; PC ae C38:3; PC ae C36:4; PC ae C34:0 PC aa C32:1; PC aa C40:3; PC ae C32:1; PC ae C40:4; lysoPC a C14:0; PC aa C42:6; PC ae C36:1; PC ae C38:5; PC ae C40:5; PC ae C34:1 and PC aa C32:0.
Subacute	4	SM OH C16:1; SM C24:0; PC aa C38:5 and PC aa C34:2.
Chronic	1	PC ae C42:4.

Figura 10. Diagrama de Venn. Metabólitos comuns às três fases do AVEI e específicos para cada fase.

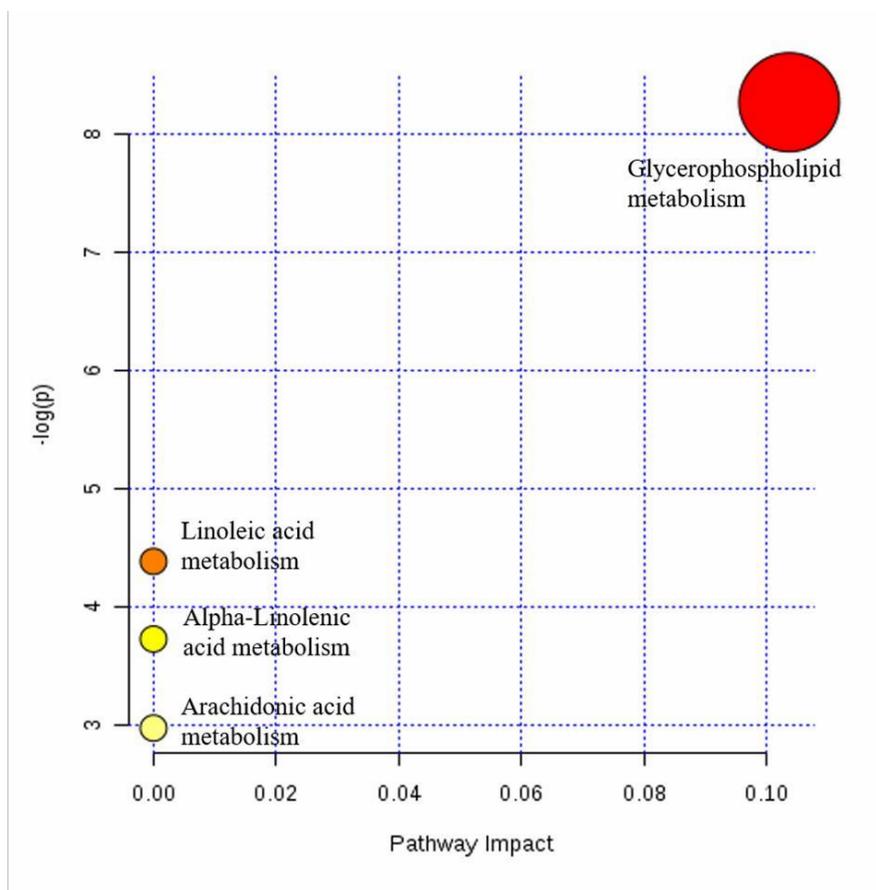


Figura 11. Vias metabólicas associadas ao AVEI. Com base no conjunto de dados metabolômicos, cada círculo representa uma via metabólica diferente; o tamanho do círculo e a tonalidade da cor são baseados no impacto da via e no valor de p (sendo o vermelho o mais significativo), respectivamente.

2.4 Discussão

Após a privação de oxigênio e glicose, altos níveis de cálcio, sódio e difosfato de adenosina (ADP) nas células isquêmicas estimulam a produção excessiva de radicais livres de oxigênio mitocondrial e outras fontes de produção de radicais livres, como pela síntese de prostaglandinas e degradação da hipoxantina[139]. Essas espécies reativas de oxigênio (EROs) danificam diretamente lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, e metabólitos de degradação são liberados [119]. Vários estudos têm como objetivo explicar se essas alterações metabólicas focais podem interferir no metabolismo global do organismo e se são

detectáveis a nível periférico [140]. Neste estudo, utilizamos uma abordagem metabolômica alvo para investigar possíveis alterações metabólicas no plasma de pacientes após AVEI. Vinte e três pacientes com AVEI foram acompanhados durante os três estágios da doença: hiperagudo, subagudo e crônico. A análise do perfil metabólico desses pacientes, juntamente com a progressão de suas lesões isquêmicas, permitiu verificar as variações metabólicas e diferenciá-las das de indivíduos saudáveis. De acordo com as tendências observadas nos modelos de PCA (**Figura 4**) e confirmadas pelos modelos PLS-DA e OPLS-DA (**Figuras 5 e 6**), os pacientes com AVEI apresentam um perfil metabólico característico e distinto em relação aos indivíduos sem essa doença. De acordo com nossos resultados, as alterações metabólicas em pacientes com AVEI começaram a ocorrer na fase hiperaguda da doença, tornaram-se mais evidentes durante a fase subaguda e ainda estavam presentes na fase crônica. De acordo com os resultados obtidos através dos VIP scores (**Tabelas 4, 5 e 6**), as alterações que nos permitiram diferenciar pacientes com AVEI de indivíduos saudáveis estão relacionadas às concentrações de metabólitos pertencentes à classe dos glicerofosfolipídeos (**Figura 11**).

Os glicerofosfolipídeos apresentam duas subclasses principais de metabólitos lipídicos denominados fosfatidilcolinas: diacil fosfatidilcolina (PC aa) e acil-alquil fosfatidilcolinas (PC ae). As membranas celulares são compostas de glicerofosfolipídeos (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI), esfingolipídeos (SM, ceramida e gangliosídeos), colesterol e ésteres de colesterol, acilgliceróis e ácidos graxos [141]. O tecido cerebral é rico em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). O rápido acúmulo de Ca^{2+} intracelular no cérebro isquêmico resulta na ativação de lipases, o que contribui para a degradação da membrana e peroxidação lipídica [142]. Os níveis de fosfatidilcolina no cérebro são regulados por um equilíbrio entre a síntese e a hidrólise. Tem sido relatado que os níveis de fosfatidilcolina no cérebro diminuem em resposta a um evento agudo de AVEI. Por outro lado, há um aumento nas Lisofosfatidilcolinas [143]. Citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1a / b) ativam a fosfolipase A2 (PLA2) e a fosfatidilcolina-fosfolipase C (PC-PLC), que hidrolisam fosfatidilcolinas. A hidrólise de fosfatidilcolinas pela PLA2 libera ácidos graxos livres, incluindo ácido araquidônico e lisofosfatidilcolinas [144]. Nossos resultados sugerem que esse equilíbrio entre fosfatidilcolinas e lisofosfatidilcolinas no cérebro durante a isquemia, como apresentado por outros autores [144, 145],

também se reflete no plasma de pacientes na fase hiperaguda do AVEI. Observamos que a fase hiperaguda é caracterizada por uma diminuição de fosfatidilcolinas e um aumento de lisofosfatidilcolinas comparado aos controles **(Tabela 4)**.

Encontramos 24 metabólitos comuns às três fases do AVEI **(Figura 10)**. Embora estejam presentes nas três fases, suas concentrações variam entre as fases e com a progressão da lesão isquêmica **(Figura 9)**. Embora existam poucos estudos na literatura que promovam o monitoramento e a dosagem desses metabólitos durante a progressão do AVEI, nossos resultados sugerem que o monitoramento dessas fosfatidilcolinas pode auxiliar na determinação do estágio da doença. Em novos estudos, eles podem ser utilizados como alvos iniciais na busca de marcadores relacionados ao prognóstico da doença. O painel metabólico obtido na fase subaguda **(Tabela 5)** pode ser indicativo de um melhor resultado do tratamento. De acordo com a escala NIHSS, observamos uma diminuição nos escores durante os dez dias de acompanhamento, ou seja, os pacientes tiveram melhor prognóstico e neste período não apresentaram recidivas **(Tabela 3)**. Biomarcadores de prognóstico que possam ser utilizados na prática clínica são importantes para melhorar a decisão sobre o tratamento do paciente, diminuir as sequelas e evitar recidivas [146]. Outra classe de metabólitos importantes para a caracterização do AVEI foram as esfingomielinas. Os esfingolípido complexos mais abundantes nas células de mamíferos são espécies de esfingomielinas [147]. As citocinas TNF- α e IL-1 α/β podem induzir fosfolipases (A2, C e D) e esfingomielinases e, concomitantemente, a proteólise de enzimas que sintetizam fosfatidilcolina e esfingomielina. Juntas, essas alterações contribuem para a diminuição de fosfatidilcolinas e esfingomielinas após o AVEI [145, 148]. Essa diminuição na concentração de esfingomielinas e fosfatidilcolinas coincide com nossos resultados. Observamos que nas fases crônica e hiperaguda, as esfingomielinas não apresentaram significância na caracterização dos pacientes. No entanto, na fase subaguda **(Tabela 5)**, duas esfingomielinas (SM C24: 0 e SM OH C16: 1) foram importantes para distinguir os pacientes. A diminuição das esfingomielinas na fase subaguda é consistente com o fato de que as citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela ativação da lipase aumentam gradualmente após a lesão isquêmica e estão em níveis mais altos entre 24-72 horas após o evento [149].

Da classe dos aminoácidos, apenas a fenilalanina foi importante para a classificação do AVEI. Observou-se que durante as fases de acidente vascular encefálico isquêmico hiperagudo e subagudo as concentrações de fenilalanina permaneceram elevadas em relação ao grupo controle (**Tabelas 4 e 5**). Resultados semelhantes já haviam sido relatados e tal aumento correlacionou-se positivamente com o aumento das citocinas IL-6 e IL-1 β , indicando que o aumento da fenilalanina pode estar relacionado ao processo inflamatório após o acidente vascular encefálico isquêmico [150].

Com relação à classificação dos subtipos de AVEI, devido ao pequeno número de pacientes diagnosticados com cada subtipo, nossos resultados estatísticos foram inconclusivos (dados não mostrados). Cerca de 30% das amostras analisadas neste estudo foram de pacientes que não tiveram a etiologia do AVEI determinado. A tentativa de reclassificá-los para outros subtipos, utilizando os painéis metabólicos encontrados neste estudo, também não foi bem sucedida. Embora seja possível observar uma tendência de separação através da construção de modelos estatísticos multivariados, a validação desses modelos depende de um grupo maior de pacientes.

Neste estudo identificamos painéis de metabólitos, predominantemente compostos de glicerofosfolipídeos, capazes de caracterizar as fases hiperaguda, subaguda e crônica do AVEI em relação aos controles. Estes painéis são compostos principalmente de metabólitos da degradação dos lipídeos da membrana plasmática através da ação de enzimas ativadas durante a lesão isquêmica. Como bem descrito na literatura, a ação de moléculas pró-inflamatórias desempenha um papel importante na ativação dessas enzimas lipolíticas. Nossos resultados sugerem novos potenciais biomarcadores e novos alvos na busca por melhorar o diagnóstico e o prognóstico do AVEI.

Capítulo 3

METABOLÔMICA APLICADA NA ANÁLISE DE PACIENTES COM INFARTO DO MIOCÁRDIO

Neste capítulo apresentaremos uma breve revisão sobre o infarto do miocárdio com supranivelamento do segmento ST, as características demográficas e clínicas do grupo estudado, os resultados obtidos através das metodologias descritas nos itens 1.8, 1.9 e 1.10 do capítulo 1 e a discussão destes resultados.

3.1 Infarto do miocárdio com supranivelamento do segmento ST

O infarto do miocárdio (IM), comumente conhecido como ataque cardíaco, apresenta uma incidência anual de 605.000 novos ataques e 200.000 ataques recorrentes, somente nos Estados Unidos [86]. O diagnóstico de IM baseia-se na anamnese, no exame clínico, nas alterações do eletrocardiograma de 12 derivações

e nos marcadores bioquímicos de necrose [151]. Como os sintomas são extremamente variados e as alterações dos marcadores de necrose começam cerca de seis horas após o início dos primeiros sintomas, o diagnóstico bioquímico ainda precisa ser melhorado [151, 152]. Existem dois subtipos principais de infarto agudo do miocárdio (IAM), que são manifestações clínicas da síndrome coronariana aguda: infarto do miocárdio sem supradesnivelamento do segmento ST (IAMSSST) e infarto do miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST (IAMCSST) [153].

O IAMCSST é a forma mais grave da doença e o principal contribuinte para a morbimortalidade em todo o mundo [154, 155]. O IAMCSST resulta da oclusão abrupta de uma artéria coronária epicárdica, como resultado, o miocárdio distal ao local da oclusão torna-se isquêmico [156]. Durante o processo isquêmico, ocorre perda de oxigênio e a fosforilação oxidativa mitocondrial pára rapidamente, com uma redução maciça da produção de ATP a partir do metabolismo energético. Um aumento compensatório na glicólise anaeróbica para a produção de ATP leva ao acúmulo de íons de hidrogênio e lactato, resultando em acidose intracelular e inibição da glicólise, assim como no metabolismo de ácido graxo mitocondrial e energia residual. Contração prejudicada com atividade elétrica persistente (desacoplamento da contração da excitação) se desenvolve em associação com alterações nos sistemas de transporte iônico no sarcolema e membranas organelares [157, 158]. Além do desequilíbrio osmótico e iônico, a despolarização da membrana também ativa os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, elevando os níveis de Ca^{2+} intracelular. O rápido aumento do cálcio intracelular é devido ao influxo através da membrana e pela liberação de Ca^{2+} presente nas mitocôndrias e no retículo citoplasmático. O excesso de Ca^{2+} citosólico provoca a ativação de proteases, fosfolipases, lipases, ATPases e endonucleases dependentes de cálcio. A ativação dessas enzimas altera a função celular, desestabiliza a estrutura da membrana plasmática e do citoesqueleto, aumenta a lipólise pelo metabolismo de ácidos graxos livres, induz a produção de radicais superóxido, promove danos ao DNA e, finalmente, leva à morte celular [159-162].

A lesão do IAMCSST desencadeia alterações na transcrição gênica, expressão proteica e concentrações de metabólitos, que conferem uma bioassinatura da disfunção cardíaca [163-165]. A detecção dessas alterações bioquímicas resultou na descoberta de biomarcadores emergentes para essa doença, como mioglobina, creatina quinase total (CK), CK-MB, troponina I (cTnI) e

troponina T (cTnT), entre outros [166]. No entanto, a eficácia destes biomarcadores para IAMCSST é questionável devido à baixa sensibilidade (35% para CK-MB e cTnI) e especificidade (85 e 86% para CK-MB e cTnI, respectivamente) nas primeiras 8 horas após a lesão [166, 167].

A abordagem metabolômica baseia-se na medição quantitativa global de metabólitos endógenos de baixo peso molecular em tecidos ou fluidos biológicos [134]. Esta abordagem demonstrou grande utilidade no campo da descoberta de biomarcadores, bem como na detecção de alterações nas vias biológicas e no fornecimento de informações sobre os mecanismos subjacentes a várias condições, incluindo doenças cardiovasculares [168, 169]. Neste estudo, foi realizada a caracterização fenotípica de pacientes com IAMCSST e indivíduos saudáveis, utilizando uma abordagem meta-metabolômica. Nosso objetivo foi comparar os perfis metabólicos entre o IAMCSST e indivíduos saudáveis para entender as alterações metabólicas e sugerir potenciais biomarcadores.

3.2 Recrutamento de pacientes e questões éticas

Pacientes com IAMCSST foram rastreados para os seguintes critérios de inclusão: idade entre 40 e 80 anos, ambos os sexos, dor torácica acima de 20 minutos e características eletrocardiográficas (ECG) compatíveis com IAMCSST. Os critérios de exclusão foram: histórico prévio de infarto do miocárdio ou acidente vascular encefálico, infarto do miocárdio sem elevação do segmento ST ou outra síndrome coronariana aguda. Amostras de plasma (n = 15) foram obtidas até sete horas após a hospitalização. Para compor o grupo controle (n = 19) foram recrutados indivíduos que nunca tiveram doença cardíaca ou acidente vascular encefálico. Os participantes foram recrutados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e na Santa Casa de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil).

As características demográficas e clínicas dos pacientes e controles estão apresentadas na **Tabela 7**. As amostras de sangue (4mL) foram coletadas usando tubos do sistema Vacuette® contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para a obtenção do plasma. As amostras de sangue foram rapidamente centrifugadas a 3.000 rotações por minuto (RPM) por 10

minutos para a separação do plasma e em seguida foram distribuídas em microtubos e imediatamente armazenadas a -80 ° C.

O estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque, e seu protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa Misericórdia de Belo Horizonte sob o número 064/2009. O termo de consentimento livre esclarecido foi obtido de todos os indivíduos antes de sua inclusão no estudo.

Tabela 7. Dados clínicos e demográficos de pacientes com IAMCSST e controles

Pacientes	Fatores de risco					
	Idade*	HAS** (%)	Tabagismo (%)	Dislipidemia (%)	Diabetes Mellitus (%)	
IAMCSST n=15						
Homens	8	66,72 (±4,92)	50,0	62,5	12,5	12,5
Mulheres	7	69,43 (±9,95)	57,2	28,5	28,5	12,5
Controles n=19						
Homens	9	55,56 (±12,07)	44,4	44,4	-	-
Mulheres	10	58,30 (±7,70)	70,0	30,0	-	-

* média, ±SD = desvio padrão

**HAS: Hipertensão Sistêmica Arterial

3.3 Resultados

As concentrações de 184 metabólitos foram analisadas nas amostras de plasma de pacientes com IAMCSST e controles. A análise não supervisionada foi realizada, primeiramente, para explorar correlações entre indivíduos saudáveis e pacientes com IAMCSST. De acordo com os resultados da PCA, houve uma tendência de separação entre os pacientes IAMCSST e controles (**Figura 12**).

Em seguida, o mesmo conjunto de dados foi submetido a análises por PLS-DA. Testes de permutação foram utilizados para confirmar a validade do modelo.

Testes de permutação envolvem a atribuição aleatória de rótulos de classes para casos e controles [61]. Os resultados obtidos demonstraram uma evidente discriminação entre os perfis metabólicos (**Figura 13A**). Os testes de permutação (usando 200 permutações aleatórias) demonstraram que a qualidade do ajuste do modelo original e a capacidade preditiva foram maiores do que nos modelos permutados, entretanto, R^2 ficou um pouco acima do limiar desejável: $R^2 < 0,4$ (**Figura 13B**).

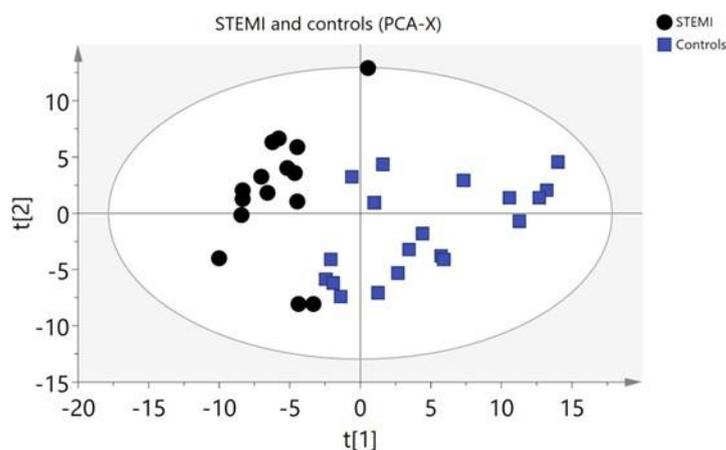


Figura 12. Gráficos dos resultados da Análise de Componentes Principais (PCA). Plotagem dos escores de PCA discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com IAMCSST e controles. Os parâmetros dos modelos foram: 4 PCs, $R^2 = 0,679$ e $Q^2 = 0,47$.

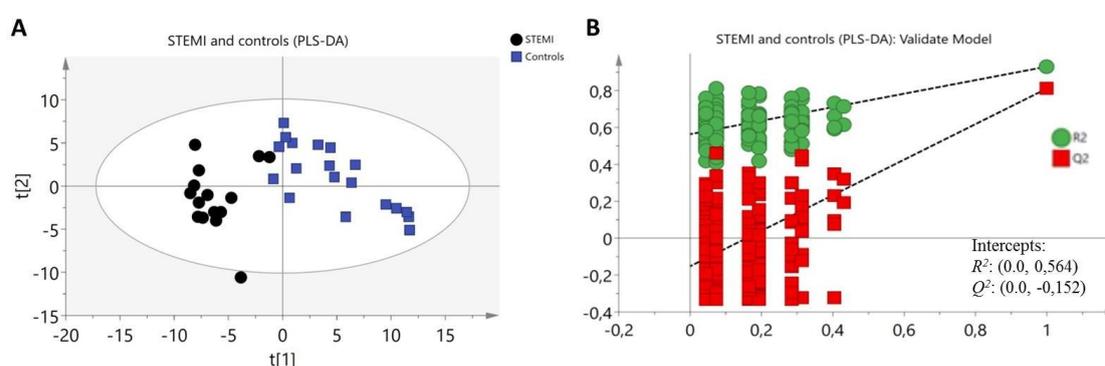


Figura 13. Gráficos dos resultados da análise por PLS-DA e validação do modelo. Plotagem dos escores de PCA discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com IAMCSST versus controles (A). Os parâmetros do modelo foram: 3 variáveis latentes, $R^2 = 0,93$ e $Q^2 = 0,811$. Teste de permutação do modelo PLS-DA (B). Validação do modelo com o número de permutações igual a 200.

A melhor visualização da discriminação entre o IAMCSST e os controles foi obtida através da construção do modelo por OPLS-DA (**Figura 14**). Este modelo, assim como o PLS-DA, foi validado usando uma etapa de validação cruzada como validação interna. Após a validação, os parâmetros de qualidade obtidos foram $R^2 = 0,93$ e $Q^2 = 0,771$.

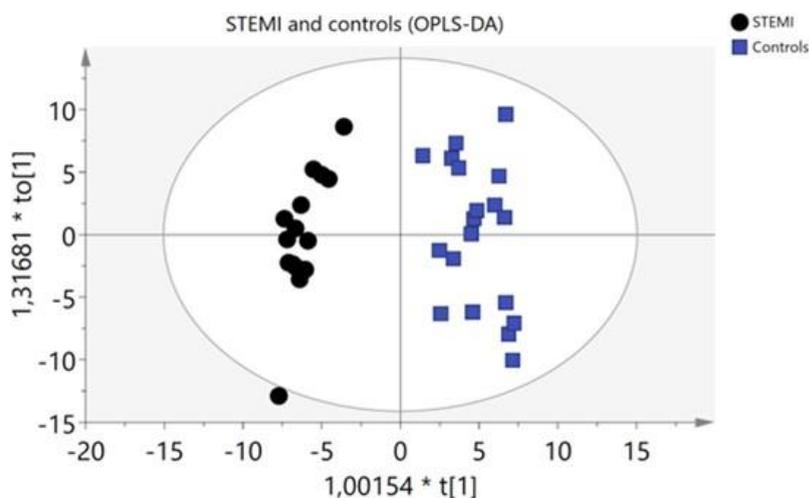


Figura 14. Gráfico dos resultados obtidos por OPLS-DA. Plotagem dos escores discriminando os perfis metabólicos em amostras de plasma entre pacientes com IAMCSST *versus* controles. Os parâmetros do modelo foram: 2 PCs, $R^2 = 0,93$ e $Q^2 = 0,771$.

Para verificar quais variáveis independentes (metabólitos) foram mais importantes para a classificação entre os grupos utilizando o OPLS-DA, os VIP escores foram calculados. Combinando os valores de $VIP > 1$ com os resultados da análise estatística univariada, selecionamos os metabólitos diferenciais entre os pacientes com IAMCSST e controles. Encontramos 60 metabólitos com VIP escore > 1 , dentre os quais 44 apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre o IAMCSST e os controles (**Tabela 8**). Destes metabólitos, 41 apresentaram registro de identificação no HMDB (Human Metabolome Database, <http://www.hmdb.ca/>). Este painel metabólico foi utilizado para construir *heatmaps*. As variações nas concentrações desses metabólitos entre as amostras controle e IAMCSST foram demonstradas na **Figura 15**.

Tabela 8. Principais metabólitos para a discriminação entre IAMCSST e controles

N ^o	Metabólitos	Classes	VIP ^a	FC ^b	p-value ^c	q-value ^d	IAMCSST	Controles
1	PC ae C36:4	Fosfatidilcolinas	1,49	- 3.69	0.0003	0.0049	Alto	Baixo
2	PC ae C36:3	Fosfatidilcolinas	1,48	1.98	0.0021	0.0140	Baixo	Alto
3	PC ae C34:2	Fosfatidilcolinas	1,47	1.05	0.8082	0.8841	Baixo	Alto
4	PC ae C38:5	Fosfatidilcolinas	1,44	- 3.65	0.0014	0.0119	Alto	Baixo
5	PC ae C38:6	Fosfatidilcolinas	1,42	2.27	< 0.0001	0.0000	Baixo	Alto
6	PC ae C34:3	Fosfatidilcolinas	1,39	1.92	0.0020	0.0140	Baixo	Alto
7	PC aa C34:4	Fosfatidilcolinas	1,39	-2.4	0.0076	0.0285	Alto	Baixo
8	PC ae C40:3	Fosfatidilcolinas	1,38	- 2.29	0.0442	0.0913	Alto	Baixo
9	PC aa C40:2	Fosfatidilcolinas	1,37	1.22	0.5324	0.6310	Baixo	Alto
10	PC ae C40:6	Fosfatidilcolinas	1,35	1.64	0.0022	0.0142	Baixo	Alto
11	lysoPC a C14:0	Lisofosfatidilcolinas	1,35	1.68	0.0004	0.0049	Baixo	Alto
12	PC aa C36:1	Fosfatidilcolinas	1,33	1.7	< 0.0001	0.0017	Baixo	Alto
13	PC aa C36:3	Fosfatidilcolinas	1,33	- 3.29	0.0302	0.0729	Alto	Baixo
14	PC ae C36:5	Fosfatidilcolinas	1,32	- 1.21	0.7157	0.8035	Alto	Baixo
15	PC ae C32:1	Fosfatidilcolinas	1,32	1.14	0.0076	0.0285	Baixo	Alto
16	PC aa C36:0	Fosfatidilcolinas	1,32	- 1.44	0.0136	0.0426	Alto	Baixo
17	PC aa C40:3	Fosfatidilcolinas	1,30	3.0	0.0264	0.0663	Baixo	Alto
18	PC ae C38:4	Fosfatidilcolinas	1,29	- 3.69	0.0003	0.0049	Alto	Baixo
19	PC aa C38:3	Fosfatidilcolinas	1,29	1.54	0.0003	0.0049	Baixo	Alto
20	PC aa C42:4	Fosfatidilcolinas	1,28	-1.6	0.0045	0.0190	Alto	Baixo
21	SM C26:0	Esfingomielinas	1,27	2.42	0.0002	0.0036	Baixo	Alto
22	lysoPC a C18:2	Lisofosfatidilcolinas	1,25	1.58	0.0045	0.0190	Baixo	Alto
23	PC aa C30:0	Fosfatidilcolinas	1,23	1.82	0.0004	0.0049	Baixo	Alto
24	PC ae C42:1	Fosfatidilcolinas	1,22	- 1.35	0.1401	0.2330	Alto	Baixo

25	PC ae C38:3	Fosfatidilcolinas	1,22	2.23	0.0860	0.1594	Baixo	Alto
26	PC ae C36:2	Fosfatidilcolinas	1,21	- 4.02	0.0315	0.0733	Alto	Baixo
27	PC ae C34:1	Fosfatidilcolinas	1,20	1.05	0.5324	0.6310	Baixo	Alto
28	Nitro-Tyr	Aminas Biogênicas	1,20	- 2.18	0.0008	0.0075	Alto	Baixo
29	PC aa C38:5	Fosfatidilcolinas	1,20	1.87	<0.0001	0.0017	Baixo	Alto
30	SM (OH) C24:1	Esfingomielinas	1,19	- 1.14	0.1760	0.2715	Baixo	Baixo
31	lysoPC a C20:3	Lisofosfatidilcolinas	1,19	1.04	0.3764	0.4824	Baixo	Alto
32	PC ae C38:1	Fosfatidilcolinas	1,17	- 2.11	0.0183	0.0533	Alto	Baixo
33	PC ae C44:3	Fosfatidilcolinas	1,16	- 1.32	0.3488	0.4603	Baixo	Baixo
34	Ac-Orn	Aminas Biogênicas	1,16	1.82	0.0039	0.0190	Baixo	Alto
35	PC aa C40:5	Fosfatidilcolinas	1,15	- 2.44	0.0201	0.0548	Alto	Baixo
36	PC ae C32:2	Fosfatidilcolinas	1,15	1.55	0.0005	0.0052	Baixo	Alto
37	PC ae C30:1	Fosfatidilcolinas	1,15	1.98	0.0159	0.0474	Baixo	Alto
38	PC ae C40:4	Fosfatidilcolinas	1,14	- 1.68	0.0044	0.0190	Baixo	Baixo
39	PC aa C40:1	Fosfatidilcolinas	1,13	- 1.44	0.0376	0.0829	Alto	Baixo
40	SM (OH) C14:1	Esfingomielinas	1,13	1.07	0.2746	0.3779	Baixo	Alto
41	PC ae C34:0	Fosfatidilcolinas	1,13	- 1.42	0.9171	0.9403	Alto	Baixo
42	SM C24:0	Esfingomielinas	1,13	1.41	0.0001	0.0035	Baixo	Alto
43	PC aa C38:4	Fosfatidilcolinas	1,13	- 2.04	0.1600	0.2561	Alto	Baixo
44	lysoPC a C16:1	Fosfatidilcolinas	1,12	1.59	0.0080	0.0293	Baixo	Alto
45	PC aa C40:6	Fosfatidilcolinas	1,11	- 1.02	0.0329	0.0738	Alto	Baixo
46	SM (OH) C22:1	Esfingomielinas	1,11	1.55	0.0119	0.0391	Baixo	Alto
47	PC aa C38:0	Fosfatidilcolinas	1,11	1.29	0.0113	0.0388	Baixo	Alto
48	SM (OH)	Esfingomielinas	1,11	1.62	0.0018	0.0136	Baixo	Alto

C22:2

49	PC aa C42:2	Fosfatidilcolinas	1,10	- 1.44	0.0201	0.0548	Alto	Baixo
50	PC ae C44:5	Fosfatidilcolinas	1,10	- 1.58	0.2382	0.3397	Alto	Baixo
51	PC ae C44:6	Fosfatidilcolinas	1,07	- 1.72	0.3580	0.4675	Alto	Baixo
52	lysoPC a C18:1	Lisofosfatidilcolinas	1,07	1.27	0.0329	0.0738	Baixo	Alto
53	PC aa C24:0	Fosfatidilcolinas	1,07	- 1.77	0.0090	0.0321	Alto	Baixo
54	PC aa C38:6	Fosfatidilcolinas	1,06	1.69	0.0009	0.0084	Baixo	Alto
55	PC aa C28:1	Fosfatidilcolinas	1,03	1.48	0.0263	0.0663	Baixo	Alto
56	PC ae C30:0	Fosfatidilcolinas	1,03	1.58	0.1761	0.2715	Baixo	Alto
57	PC ae C38:2	Fosfatidilcolinas	1,02	- 1.81	0.0033	0.0184	Alto	Baixo
58	lysoPC a C18:0	Lisofosfatidilcolinas	1,01	1.21	0.0315	0.0733	Baixo	Alto
59	PC aa C40:4	Fosfatidilcolinas	1,01	1.41	0.0040	0.0190	Baixo	Alto
60	PC aa C32:0	Fosfatidilcolinas	1,01	-1.5	0.9862	0.9862	Alto	Baixo

a Importância da variável na projeção (VIP) foi obtida do modelo OPLS-DA com um limiar acima de 1,0;

b *Fold-change* (FC) foi calculada pelo valor da média de concentração de metabólitos de pacientes com IAMCSST em relação ao grupo Controle;

c O valor de *p* foi calculado pelo teste de Wilcoxon Mann Whitney; valores significativos estão em negrito.

d *q-values* foram calculados usando o valor *p* ajustado com a taxa de falsa descoberta (FDR)

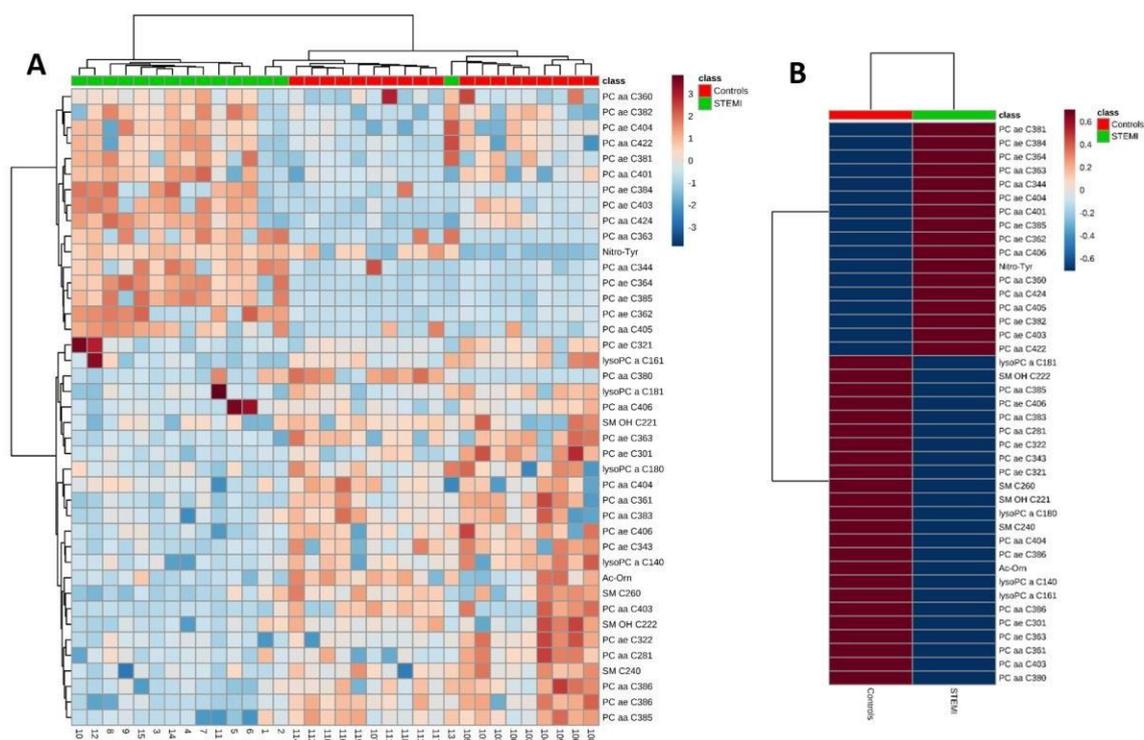


Figura 15. Heatmap do conjunto de dados metabolômicos. As escalas de cores representam a variação da concentração dos metabólitos. Em A estão representadas amostras individuais (eixo horizontal) e metabólitos (eixo vertical); e são separados usando o agrupamento hierárquico (algoritmo de Ward), com o dendrograma sendo dimensionado para representar a distância entre cada ramificação (medida de distância: euclidiana). Em B, o contraste nas médias de concentrações de metabólitos entre o grupo de pacientes com IAMCSST e indivíduos controles.

Este painel contendo 41 metabólitos foi utilizado para investigar as vias metabólicas associadas ao IAMCSST. Vias significativamente alteradas ($p < 0,05$) que também tiveram altos valores de impacto incluem o metabolismo de glicerofosfolídeos, o metabolismo do ácido linoléico e o metabolismo dos esfingolípídeos (**Figura 16**). A significância da via foi determinada a partir da análise de enriquecimento de via e com base nos valores de cada composto no conjunto de dados. O valor de impacto, por outro lado, foi determinado pela análise de topologia da via. O impacto determina a importância de determinados metabólitos dentro de uma via.

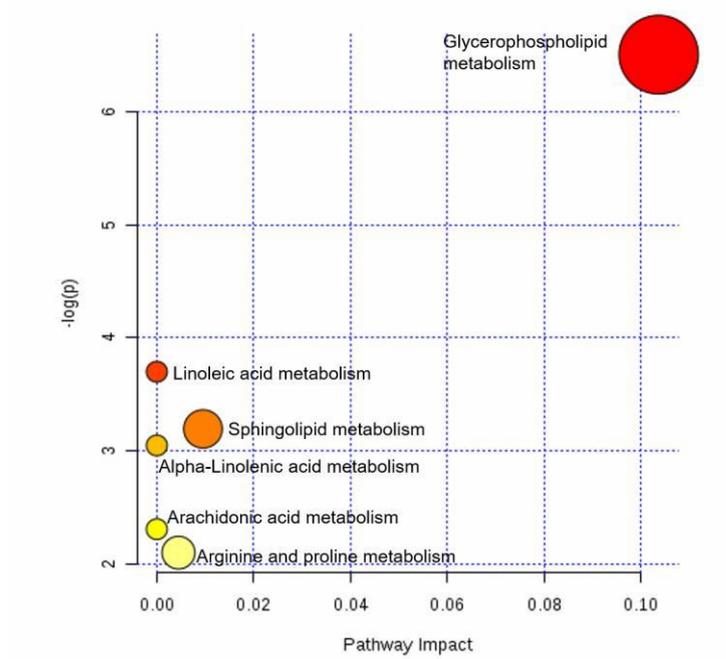


Figura 16. Vias metabólicas associadas ao IAMCSST. Na visão do metaboloma, cada círculo representa uma via metabólica diferente; o tamanho do círculo e a tonalidade da cor são baseados no impacto da via e no valor p (sendo o vermelho o mais significativo), respectivamente.

As fosfatidilcolinas foram o principal grupo de metabólitos que apresentaram diferença entre o IAMCSST e os controles: 15 estavam em menor concentração e 16 em maior concentração em pacientes com IAMCSST. Quatro lisofosfatidilcolinas e quatro esfingomielinas apresentaram menor concentração em pacientes com IAMCSST. Duas aminas biogênicas apresentaram diferença no IAMCSST: uma apresentou alta concentração e a outra menor (**Figura 15B**).

3.4 Discussão

O IAMCSST frequentemente é causado pela oclusão completa e persistente de uma artéria coronária por um coágulo sanguíneo (trombo) [154]. Assim que o suprimento sanguíneo coronariano é interrompido, o dano miocárdico começa e quanto mais tempo o suprimento sanguíneo é ocluído, maior é a perda de músculo cardíaco [155]. Durante o processo isquêmico, ocorre perda de oxigênio e a

fosforilação oxidativa mitocondrial pára rapidamente, com uma perda da principal fonte de produção de ATP para o metabolismo energético. Um aumento compensatório na glicólise anaeróbica para a produção de ATP leva ao acúmulo de íons de hidrogênio e lactato, resultando em acidose intracelular e inibição da glicólise, assim como o ácido graxo mitocondrial e o metabolismo de energia residual. A contração torna-se prejudicada com a atividade elétrica persistente (desacoplamento da contração da excitação) que se desenvolve em associação com alterações nos sistemas de transporte iônico no sarcolema e membranas organelares [157, 158]. Além do desequilíbrio osmótico e iônico, a despolarização da membrana também ativa os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, elevando os níveis de Ca^{2+} intracelular. O rápido aumento do cálcio intracelular é devido ao influxo através da membrana e também pela liberação de Ca^{2+} presente nas mitocôndrias e no retículo citoplasmático. O excesso de Ca^{2+} citosólico provoca a ativação de proteases, fosfolipases, lipases, ATPases e endonucleases dependentes de cálcio. A ativação dessas enzimas altera a função celular, desestabiliza a estrutura da membrana plasmática e do citoesqueleto, aumenta a lipólise pelo metabolismo dos ácidos graxos livres, induz a produção de radicais superóxidos, promove danos no DNA e leva à morte celular [159, 160].

As estratégias de reperfusão são a terapia padrão atual para infarto do miocárdio. Podem, no entanto, resultar em disfunção paradoxal dos cardiomiócitos e agravar o dano tecidual, em um processo conhecido como “lesão de reperfusão” [28]. A lesão de reperfusão geralmente surge em pacientes que apresentam IAMCSST, nos quais a intervenção terapêutica mais eficaz é a reperfusão miocárdica [162, 170].

Por mais de três décadas, a hidrólise dos glicerofosfipídeos da membrana dos cardiomiócitos durante a isquemia tem sido associada à patogênese do infarto do miocárdio [171, 172]. A contribuição do metabolismo fosfolipídico para a ruptura da membrana plasmática na morte celular necrótica induzida por hipóxia ou isquemia tem sido classicamente atribuída à ação de fosfolipases, perda de assimetria ou acúmulo de lipídeos anfifílicos disruptivos, tais como lisofosfolipídeos [173]. Em geral, as alterações no metabolismo lipídico miocárdico durante a isquemia/reperfusão podem ser classificadas em dois grupos: (1) alterações na β -oxidação de ácidos graxos e (2) alterações mediadas pela ativação de fosfolipases e outras enzimas lipídicas catabólicas (por exemplo, ceramidase e esfingomielinase)

que têm como alvo os constituintes lipídicos estruturalmente importantes das estruturas da membrana celular dos cardiomiócitos [174].

Os principais lipídeos presentes na membrana celular eucariótica são glicerofosfolipídeos, esteróis e esfingolipídeos [175]. De acordo com nossos resultados, a principal via metabólica associada ao IAMCSST é o metabolismo dos glicofosfolipídeos, seguido do metabolismo do ácido linoléico e do metabolismo dos esfingolipídeos (**Figura17**). As principais classes de glicerofosfolipídeos incluem: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e ácido fosfatídico [176]. Os plasmalogênios são espécies fosfolípídicas particularmente derivadas de fosfatidilcolina (PC) ou fosfatidiletanolamina (PE); eles são caracterizados pela presença de uma ligação vinil-éter e uma ligação éster nas posições sn-1 e sn-2, respectivamente, do esqueleto do glicerol [177]. Com base em seus grupos de cabeças polares na posição sn-3, os plasmalogênios são principalmente classificados em plasmalogênios de colina ou plasmalogênios de etanolamina [178].

Os glicerofosfolipídeos têm recebido atenção especial em pesquisas sobre infarto do miocárdio e suas causas [179, 180]. A fosfatidilcolina é o principal fosfolípídio no coração dos mamíferos [181]. Os cardiomiócitos humanos são compostos por aproximadamente 40% de fosfatidilcolinas [181, 182]. Encontramos 15 fosfatidilcolinas em uma concentração mais baixa no plasma de pacientes com IAMCSST em comparação com o grupo controle. No tecido cardíaco, estudos anteriores relataram a inibição da síntese de fosfatidilcolinas durante hipóxia ou isquemia. Hatch e Choy descreveram a inibição da síntese de fosfatidilcolinas em corações perfundidos submetidos à hipóxia [183], a síntese de fosfatidilcolinas também foi prejudicada pela hipóxia em cardiomiócitos isolados de ventrículo de rato [184], e uma perda líquida de colina após isquemia global foi demonstrada recentemente em ratos com corações reperfundidos [185]. Nesse contexto, vários autores sugeriram que a depleção de ATP e CTP era a causa da inibição observada na síntese de fosfatidilcolinas [183, 186].

Em amostras de plasma, a diminuição da concentração de glicerofosfolipídeos também foi demonstrada. Sutter e colegas analisaram amostras de plasma de pacientes recrutados até cinco dias após o infarto do miocárdio. Utilizando o método de LC-MS, foram quantificados 45 metabólitos

(glicerofosfolídeos e esfingomielinas) com concentrações inferiores às encontradas em indivíduos saudáveis [187].

Recentemente foi demonstrado que em duas coortes adultas de meia-idade, aparentemente saudáveis, que foram monitoradas em média por mais de 7,5 anos, as concentrações séricas de quatro esfingomielinas e seis fosfatidilcolinas foram associadas a um maior risco de IAMCSST, independentemente dos fatores dos fatores de risco para doença cardiovascular. São elas: PC aa C38: 3, PC aa C40: 4, PC ae C36: 3, PC ae C38:3, PC ae C38:4 e PC ae C40:3; bem como esfingomielinas C16: 0, C24: 0, C16: 1 e hidroxí-esfingomielina C22: 1[188]. De acordo com nossos resultados, sete desses marcadores prevaleceram após o IAMCSST, dois em maiores concentrações em relação ao grupo controle (PC ae C38: 4 e PC ae C40: 3) e cinco em menores concentrações (PC aa C38: 3, PC aa C40, PC ae C36: 3, esfingomielina C24: 0 e hidroxí-esfingomielina C22: 1). Algumas substâncias biologicamente ativas durante a isquemia, por exemplo, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) podem induzir a síntese de ceramida a partir da esfingomielina via esfingomielinase. A ceramida, por sua vez, pode atuar como um segundo mensageiro, promovendo a apoptose dos cardiomiócitos [189, 190]. Isso pode ser uma explicação para a diminuição das esfingomielinas em pacientes com IAMCSST **(Figura 15)**.

Evidências substanciais acumuladas na última década indicam que os glicosfosfolídeos, especificamente os plasmalogênios, poderiam representar um dos principais componentes antioxidantes lipossolúveis [190, 191]. Esta proposta baseia-se na capacidade dos plasmalogênios de eliminar várias espécies reativas de oxigênio, suas concentrações relativamente altas no tecido cardíaco e suas localizações subcelular e extracelular próximas aos substratos oxidáveis [178, 187]. Dessa forma, o estresse oxidativo pode ser uma justificativa para a diminuição de fosfatidilcolinas (plasmalogênios de colina) no infarto do miocárdio.

Por outro lado, encontramos 16 fosfatidilcolinas em maior concentração em pacientes com IAMCSST. Algumas hipóteses podem ser sugeridas para justificar esses resultados: a grande variedade de fosfolipases A e suas seletividades por certos substratos [192, 193]; e o tempo que essas enzimas permanecem ativadas [194]. Utilizando coelhos Langdorf como modelo experimental de isquemia miocárdica global, Ford e colegas analisaram a ação da enzima A2 fosfolipase seletivas de plasmalogênio independente de cálcio. Foi relatado que a atividade da

fosfolipase A2 independente de cálcio, associada à membrana aumentou mais de 400% durante 2 min de isquemia global, foi ativada quase mais de 10 vezes após apenas 5 min de isquemia e permaneceu ativada por todo o intervalo isquêmico completo examinado (2-60 min). A ativação da fosfolipase A2 seletiva de plasmalogênio associada à membrana após 5 min de isquemia miocárdica foi rapidamente revertida durante a reperfusão do tecido isquêmico [174]. Este exemplo sugere que após a reperfusão, após o processo de lesão e inflamação, a biossíntese de fosfolipídeos pode aumentar durante o processo de reparo da mesma forma que ocorre com o colesterol e outras biomoléculas [195].

Em relação aos lisofosfolipídeos, nossos resultados mostraram que quatro apresentaram menores concentrações em pacientes com IAMCSST (lysoPC a C18: 1, lysoPC a 18: 0, lysoPC a C14: 0 e lysoPC a C16: 1). Zhu e seus colegas descobriram, pelo método UHPLC, três lisofosfolipídeos em uma concentração sérica mais baixa em pacientes que tiveram infarto do miocárdio (lysoPC C18: 2, lysoPC C1 a C16: 0 e lysoPC a C18: 1); as amostras foram coletadas no período de 1 a 6 meses após o infarto [196]. Pode-se observar que um dos potenciais biomarcadores que encontramos em pacientes com IAMCSST na fase aguda (lysoPC a 18: 1) também está presente na fase crônica da doença.

A nitrotirosina é produzida pela modificação dos resíduos da proteína tirosina pelo peroxinitrito gerado a partir da reação do óxido nítrico (NO) e superóxido [197] [53]. Em nosso estudo, encontra-se aumentado em pacientes com IAMCSST. Esse aumento já foi relatado por outros autores em pacientes com patologias cardiovasculares, inclusive foi considerado como um marcador bioquímico transitório de isquemia miocárdica [198] [54, 55].

Em relação à acetilornitina, nenhum trabalho foi encontrado relacionando esta amina biogênica ao infarto do miocárdio.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que existem alterações significativas no metabolismo dos glicerofosfolipídeos, do ácido linoléico e dos esfingolipídeos em pacientes com IAMCSST. Estas alterações foram observadas pela diferença nas concentrações de 31 fosfatidilcolinas, quatro lisofosfatidilcolinas, quatro esfingomielinas e duas aminas biogênicas em relação a indivíduos saudáveis. Embora tenhamos uma limitação no número de amostras, nossos resultados confirmam as tendências exibidas em estudos anteriores. Além disso, nosso trabalho

aponta para metabólitos com grande potencial para serem biomarcadores para o IAMCSST e para o estudo de novos alvos farmacológicos.

Capítulo 4

METABOLÔMICA APLICADA NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES COM ESQUIZOFRENIA

Neste capítulo apresentaremos uma breve revisão sobre a esquizofrenia, as características demográficas e clínicas do grupo estudado, os resultados obtidos através das metodologias descritas nos itens 1.8, 1.9 e 1.10 do capítulo 1 e a discussão destes resultados.

4.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico grave caracterizado por delírios, alucinações, comportamento desorganizado e pensamento e fala desordenados [199]. Afeta aproximadamente 1% da população mundial, exercendo um enorme impacto socioeconômico. A patogênese da esquizofrenia é complexa e envolve a interação de fatores genéticos e ambientais (por exemplo, infecções perinatais), levando ao desequilíbrio de neurotransmissores em diferentes circuitos cerebrais [200, 201].

Ainda não existem testes laboratoriais para o diagnóstico da doença [202]. O diagnóstico é baseado em avaliações dos sinais e sintomas específicos do paciente. A avaliação é feita através de entrevista, por médicos treinados, usando extensivos questionários validados como ferramenta de diagnóstico do paciente. Atualmente, tem sido utilizada a *Mini-International Neuropsychiatric Interview* (M.I.N.I.) que é uma entrevista diagnóstica de curta duração, desenvolvida em conjunto por psiquiatras e clínicos dos Estados Unidos e Europa, para os transtornos psiquiátricos [203]. Com um tempo de administração de aproximadamente 15 minutos, foi projetado para atender à necessidade de uma entrevista psiquiátrica curta, mais precisa, estruturada para estudos clínicos multicêntricos e estudos epidemiológicos e para ser usada como um primeiro passo no rastreamento de resultados em ambientes clínicos não relacionados à pesquisa [203, 204].

O tratamento farmacológico da esquizofrenia é baseado em antipsicóticos típicos (ou de primeira geração) e atípicos (ou de segunda geração) que afetam principalmente a neurotransmissão da dopamina [205]. Embora tenha sido discutível se a eficácia dos antipsicóticos típicos versus atípicos (exceto a clozapina) difere, o perfil dos efeitos colaterais é definitivamente diferente. Antipsicóticos típicos têm sido associados a efeitos colaterais motores (ou extrapiramidais) e atípicos com ganho de peso e síndrome metabólica [206]. Na verdade, esses últimos efeitos colaterais têm sido relacionados a taxas mais altas de mortalidade por doenças cardiovasculares em pacientes com esquizofrenia [207, 208].

4.2 Recrutamento de pacientes e questões éticas

Dez pacientes com esquizofrenia crônica recrutados no Ambulatório de Esquizofrenia do Instituto Raul Soares / FHEMIG, Belo Horizonte-MG, Brasil, e da Clínica de Saúde Mental de Nova Lima-MG, Brasil. Dez indivíduos saudáveis foram recrutados da comunidade local e participaram do estudo como controles. A entrevista MINI-Plus (Amorim 2000), utilizando os critérios do DSM-IV TR (Association 2000) foi usada para confirmar o diagnóstico de esquizofrenia em pacientes e ausência de qualquer distúrbio psiquiátrico em controles.

Os critérios de inclusão para os pacientes foram: (a) idade entre 18 e 60 anos; (b) diagnóstico de esquizofrenia; c) pacientes que estavam clinicamente estáveis. Controles foram recrutados usando como critério de inclusão: (a) idade entre 18 e 60 anos; (b) nenhum histórico atual ou passado de transtorno psiquiátrico; (c) parentes de primeiro grau não poderiam ter histórico de transtornos psiquiátricos. Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: (a) história de epilepsia, demência, trauma cerebral, tumor ou outras doenças neurológicas primárias; (b) dependência / uso de drogas (por exemplo, álcool, cannabis, cocaína e crack); (c) infecções atuais ou recentes (últimas quatro semanas); (d) doenças clínicas autoimunes ou graves; (e) uso atual ou recente (últimas quatro semanas) de drogas corticosteróides ou anti-inflamatórias.

Cinco mililitros de sangue foram retirados de cada indivíduo por venopunção em um tubo de vácuo sem anticoagulante. O sangue foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm durante 10 min e o soro foi separado e mantido congelado a -80 até o momento de análise.

O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque, e seu protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Raul Soares/ FHEMIG (Protocolo número 034-B / 2010). Ambos, os pacientes e controles forneceram consentimento informado por escrito.

Tabela 9. Características clínicas e demográficas de controles e pacientes com esquizofrenia

	Controles (N=10)	Pacientes (N=10)	p value
Sexo masculino (frequência,%)	60%	50%	0.65†
Idade em anos (média ±SD)	43.40 ± 9.96	43.60 ± 10.07	0.96
Nível educacional em anos (média ±SD)	11.20 ± 3.64	7.60 ± 4.03	0.0507
Idade de início (anos) (média ±SD)	–	31.00 ± 9.95	–
Duração da doença (média ±SD)	–	12.60 ± 9.62	–
Medicações em uso (frequência, %)			
Antipsicóticos típicos potentes	–	40.00	–
Antipsicóticos típicos sedativos	–	10.00	–
Antipsicóticos atípicos	–	70.00	–
Clozapine	–	0.00	–
Antipsicóticos dose (equivalente de clorpromazina /média±SD)	–	245.3 ± 56.58	–

† Qui-quadrado de Pearson

4.3 Resultados

Neste estudo, analisamos 184 metabólitos no soro de pacientes com esquizofrenia e voluntários saudáveis. A análise não supervisionada PCA foi realizada para explorar as correlações entre os grupos (4PCs; $R^2 = 0,642$; $Q^2 = 0,286$). Foi observada uma tendência de separação no gráfico de scores (**Figura 17A**) entre pacientes com esquizofrenia sob terapia farmacológica e voluntários saudáveis.

Em seguida, a modelagem por PLS-DA foi adicionalmente realizada (2 PCs; $R^2 = 0,817$; $Q^2 = 0,403$) (**Figura 17B**). Neste modelo, observamos uma melhor separação entre os grupos de pacientes e controles. A análise de sensibilidade e especificidade por AUROC foi igual a 1, o que significa a ausência de falsos positivos e falsos negativos (**Figura 17C**). A validação do modelo com 200 permutações gerou interceptos ($0,0, 0,698$) e $Q^2 = (0,0, -0,142)$, o que significa que o PLS-DA teve uma excelente capacidade preditiva (Q^2), mas a capacidade de ajuste (R^2) não estava no limiar desejável (**Figura 17D**).

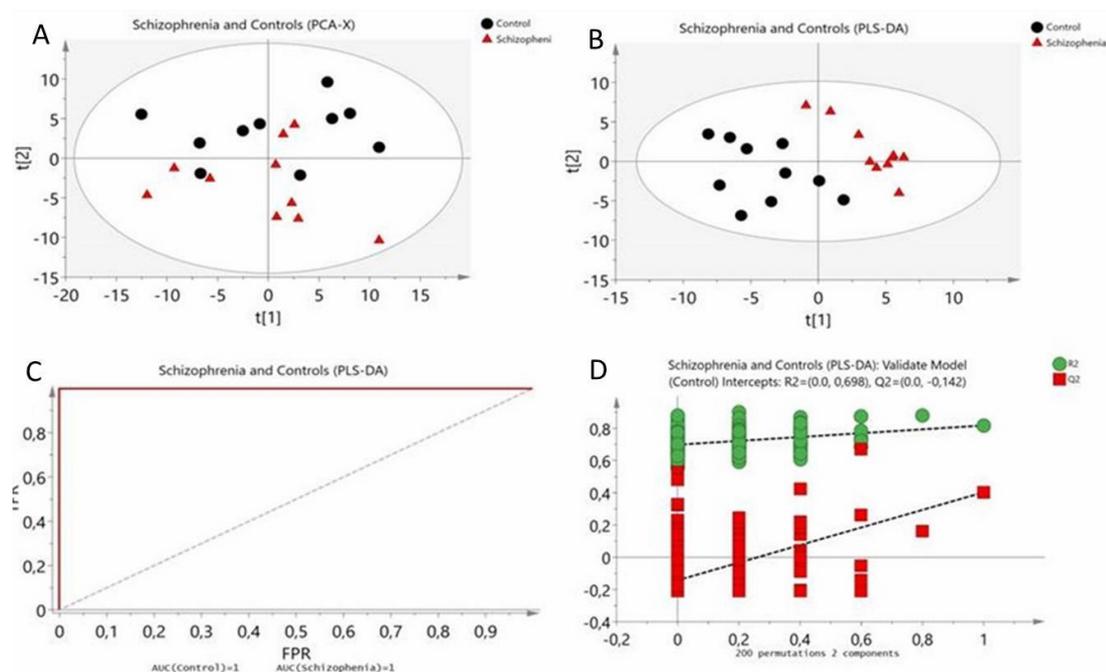


Figura 17. Gráficos das análises por PCA, PLS-DA e validação do modelo. (A) Plotagem dos escores de PCA, (B) plotagem dos escores de PLS-DA, (C) Resultados de validação do modelo PLS-DA por AUROC e (D) Teste de permutação do modelo PLS-DA com interceptos $R^2 = (0,0, 0,698)$ e $Q^2 = (0,0, -0,142)$

Para identificar os metabólitos capazes de discriminar pacientes e controles, foi construído o modelo supervisionado OPLS-DA (**Figura 18**). Os resultados obtidos por este modelo (2 PCs; $R^2 = 0,987$; $Q^2 = 0,966$) mostraram diferenças significativas entre os pacientes com esquizofrenia e indivíduos controle. As análise de VIP escores, obtidas do modelo OPLS-DA, com limiar maior que 1 apresentaram 55 lipídeos e 15 metabólitos de outras classes. A combinação de valores VIP do modelo OPLS-DA com o teste de Wilcoxon Mann Whitney resultou na seleção de 23 lipídeos e 09 metabólitos de outras classes como analitos diferenciais entre pacientes com esquizofrenia e controles (Tabela 2 e 3).

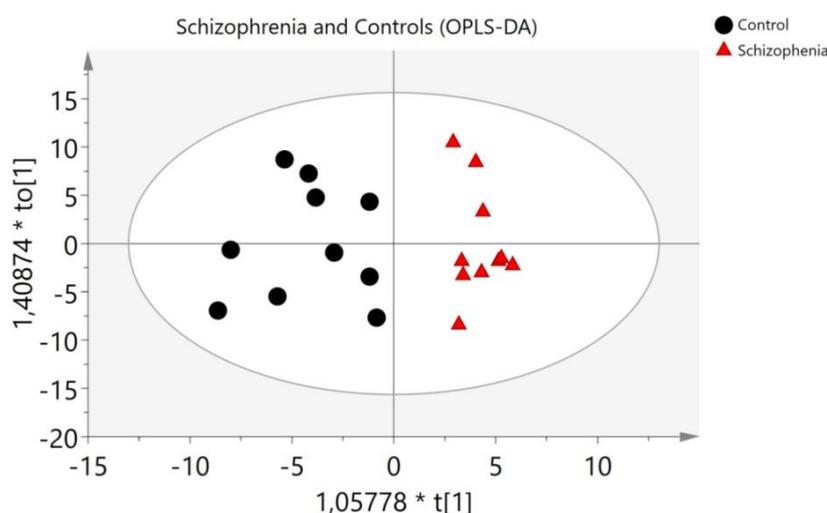


Figura 18. Gráfico dos resultados da análise por OPLS-DA. Plotagem dos escores demonstrando a discriminação entre pacientes com esquizofrenia e controles. Os parâmetros dos modelos foram: 2 PCs; $R^2 = 0,987$; $Q^2 = 0,966$.

Tabela 10. Principais metabólitos capazes de diferenciar esquizofrenia e controles

		Classes	VIP ^a	FC ^b	p-value ^c	q-value ^d	Esquizofrenia	Controles
N#	Lipídeos							
1	lysoPC a C18:1	Lisofosfatidilcolinas	2,06139	1.94	< 0.0001	0.0048	Baixo	Alto
2	lysoPC a C17:0	Lisofosfatidilcolinas	2,01841	2.19	0.0012	0.0320	Baixo	Alto
3	lysoPC a C18:0	Lisofosfatidilcolinas	1,93826	2.03	0.0023	0.0320	Baixo	Alto
4	PC ae C38:1	Fosfatidilcolinas	1,80906	1.62	0.0027	0.0320	Baixo	Alto
5	C14:1-OH	Acilcarnitinas	1,77514	1.42	0.0188	0.0885	Baixo	Alto

6	lysoPC a C16:1	Lisofosfatidilcolinas	1,6837	1.62	0.0028	0.0320	Baixo	Alto
7	lysoPC a C18:2	Lisofosfatidilcolinas	1,64357	1.29	0.0325	0.0885	Baixo	Alto
8	C18:1	Acilcarnitinas	1,59796	2.13	0.0039	0.0378	Baixo	Alto
9	PC ae C38:2	Fosfatidilcolinas	1,55215	1.42	0.0298	0.0885	Baixo	Alto
10	PC ae C40:2	Fosfatidilcolinas	1,54693	1.35	0.0781	0.1437	Baixo	Alto
11	C16:1	Acilcarnitinas	1,53647	1.69	0.0487	0.1044	Baixo	Alto
12	lysoPC a C20:3	Lisofosfatidilcolinas	1,51681	1.4	0.0812	0.1437	Baixo	Alto
13	C16:2-OH	Acilcarnitinas	1,44829	1.56	0.0075	0.0635	Baixo	Alto
14	C18:2	Acilcarnitinas	1,44044	1.89	0.0311	0.0885	Baixo	Alto
15	C18	Acilcarnitinas	1,40918	1.46	0.1855	0.2381	Baixo	Alto
16	PC ae C36:1	Fosfatidilcolinas	1,39758	1.25	0.0811	0.1437	Baixo	Alto
17	lysoPC a C20:4	Lisofosfatidilcolinas	1,39061	1.43	0.1230	0.1859	Baixo	Alto
18	lysoPC a C14:0	Lisofosfatidilcolinas	1,3845	1.28	0.0281	0.0885	Baixo	Alto
19	C14	Acilcarnitinas	1,37926	1.3	0.0873	0.1448	Baixo	Alto
20	PC aa C38:5	Fosfatidilcolinas	1,37594	-1.48	0.0257	0.0885	Alto	Baixo
21	C16	Acilcarnitinas	1,35806	1.59	0.1506	0.2179	Baixo	Alto
22	PC ae C40:6	Fosfatidilcolinas	1,32752	-1.3	0.0201	0.0885	Alto	Baixo
23	PC ae C40:3	Fosfatidilcolinas	1,31783	1.29	0.1555	0.2202	Baixo	Alto
24	PC aa C38:6	Fosfatidilcolinas	1,29743	-1.56	0.0154	0.0876	Alto	Baixo
25	PC aa C40:5	Fosfatidilcolinas	1,29458	-1.7	0.0155	0.0876	Alto	Baixo
26	PC aa C34:4	Fosfatidilcolinas	1,2901	-1.42	0.0024	0.0320	Alto	Baixo
27	C5-OH (C3- DC-M)	Acilcarnitinas	1,28334	1.38	0.1194	0.1845	Baixo	Alto
28	PC aa C36:4	Fosfatidilcolinas	1,27593	-1.35	0.0375	0.0910	Alto	Baixo
29	C12	Acilcarnitinas	1,24929	1.18	0.1145	0.1810	Baixo	Alto
30	C16:1-OH	Acilcarnitinas	1,21769	1.23	0.2212	0.2735	Baixo	Alto
31	PC aa C38:4	Fosfatidilcolinas	1,20201	-1.37	0.1903	0.1903	Alto	Baixo
32	C14:1	Acilcarnitinas	1,20185	1.3	0.0873	0.1448	Baixo	Alto
33	PC ae C38:6	Fosfatidilcolinas	1,19007	-1.22	0.0845	0.1437	Alto	Baixo
34	C12:1	Acilcarnitinas	1,17301	1.15	0.1615	0.2241	Baixo	Alto
35	PC ae C44:6	Fosfatidilcolinas	1,16705	-1.32	0.0491	0.1044	Alto	Baixo

36	PC aa C40:2	Fosfatidilcolinas	1,16255	1.23	0.2572	0.3015	Alto	Baixo
37	PC aa C30:0	Fosfatidilcolinas	1,14806	-1.19	0.0577	0.1190	Alto	Baixo
38	PC aa C32:1	Fosfatidilcolinas	1,1447	-1.43	0.0223	0.0885	Alto	Baixo
39	C5-M-DC	Acilcarnitinas	1,14249	1.17	0.1404	0.2076	Baixo	Alto
40	C4-OH-Pro	Acilcarnitinas	1,1382	1.5	0.0691	0.1382	Baixo	Alto
41	PC ae C38:3	Fosfatidilcolinas	1,13683	1.15	0.3916	0.4295	Baixo	Alto
42	PC aa C40:6	Fosfatidilcolinas	1,12863	-1.69	0.0342	0.0895	Alto	Baixo
43	PC ae C34:1	Fosfatidilcolinas	1,10357	-1.08	0.4292	0.4633	Alto	Baixo
44	PC aa C32:0	Fosfatidilcolinas	1,08944	-1.06	0.5496	0.5578	Alto	Baixo
45	C7-DC	Acilcarnitinas	1,08586	1.19	0.3809	0.4246	Alto	Baixo
46	PC ae C38:4	Fosfatidilcolinas	1,08569	-1.15	0.2364	0.2820	Alto	Baixo
47	PC ae C32:1	Fosfatidilcolinas	1,07935	-1.08	0.4794	0.4939	Alto	Baixo
48	PC ae C36:4	Fosfatidilcolinas	1,04549	-1.22	0.1694	0.2303	Alto	Baixo
49	C0	Acilcarnitinas	1,04534	1.21	0.0832	0.1437	Baixo	Alto
50	PC ae C38:5	Fosfatidilcolinas	1,04335	-1.24	0.1808	0.2381	Alto	Baixo
51	PC ae C44:5	Fosfatidilcolinas	1,04024	-1.19	0.2898	0.3284	Alto	Baixo
52	C16:2	Acilcarnitinas	1,04006	1.22	0.2285	0.2774	Baixo	Alto
53	PC ae C36:0	Fosfatidilcolinas	1,03992	1.1	0.4564	0.4774	Baixo	Alto
54	PC aa C36:5	Fosfatidilcolinas	1,03366	-1.34	0.0291	0.0885	Alto	Baixo
55	PC ae C34:0	Fosfatidilcolinas	1,01744	1.04	0.7006	0.7006	Baixo	Alto
N#	Metabólitos							
1	Glu	Aminoácidos	1,68222	1.69	0.0086	0.0652	Baixo	Alto
2	Orn	Aminoácidos	1,66777	1.43	0.0096	0.0652	Baixo	Alto
3	Taurine	Aminas Biogênicas	1,56115	1.55	0.0323	0.0885	Baixo	Alto
4	Ser	Aminoácidos	1,45139	1.44	0.0269	0.0885	Baixo	Alto
5	Met-SO	Aminas Biogênicas	1,30801	1.74	0.0418	0.0981	Baixo	Alto
6	Trp	Aminoácidos	1,24727	1.28	0.0304	0.0885	Baixo	Alto
7	Gly	Aminoácidos	1,20667	1.22	0.0363	0.0910	Baixo	Alto
8	Thr	Aminoácidos	1,2033	1.37	0.0433	0.0981	Baixo	Alto
9	Lys	Aminoácidos	1,19136	1.38	0.0709	0.1418	Baixo	Alto

10	Phe	Aminoácidos	1,07671	1.16	0.4495	0.4774	Baixo	Alto
11	Ala	Aminoácidos	1,04906	1.38	0.0753	0.1437	Baixo	Alto
12	Tyr	Aminoácidos	1,04424	1.23	0.1974	0.2486	Baixo	Alto
13	His	Aminoácidos	1,03604	1.18	0.2725	0.3141	Baixo	Alto
14	Val	Aminoácidos	1,00774	1.18	0.1851	0.2381	Baixo	Alto
15	Cit	Aminoácidos	1,00421	1.4	0.0315	0.0885	Baixo	Alto

a Importância da variável na projeção (VIP) foi obtida do modelo OPLS-DA com um limiar acima de 1,0;

b *Fold-change* (FC) foi calculada pelo valor da média de concentração de metabólitos de pacientes com Esquizofrenia em relação ao grupo Controle;

c O valor de *p* foi calculado pelo teste de Wilcoxon Mann Whitney; valores significativos estão em negrito.
d *q-values* foram calculados usando o valor *p* ajustado com a taxa de falsa descoberta (FDR)

As amostras de soro de pacientes com esquizofrenia sob o uso de fármacos antipsicóticos exibiram níveis mais altos de fosfatidilcolinas (PC aa C38:5; PC ae C40:6; PC aa C38:6; PC aa C40:5; PC aa C34:4; PC aa C36:4; PC ae C38:6) em contraste com níveis mais baixos de algumas lisofosfatidilcolinas (lysoPC a C18:1; lysoPC a C17:0; lysoPC a C18:0; lysoPC a C16:1; lysoPC a C18:2), de algumas fosfatidilcolinas (PC ae C38: 1; PCae C38: 2; PCae C40: 2), acilcarnitinas (C14: 1-OH; C18: 1; C16: 1) glutamato, ornitina, taurina e serina. Esses níveis anormais de metabólitos no soro refletem as alterações no fenótipo metabólico, o que poderia fornecer informações sobre o tratamento farmacológico subjacente com os antipsicóticos.

4.4 Discussão

Neste trabalho, traçamos um perfil de lipídios e metabólitos em pacientes esquizofrênicos em tratamento antipsicótico. É bem conhecido que os tratamentos da esquizofrenia geralmente promovem ganho de peso em pacientes e parecem estar associados com maior risco de hiperlipidemia [209]. Há dados relatados indicando aumento do colesterol (CT), Apo B, LDL e principalmente dos triglicerídeos [210]. Estudos anteriores sugeriram alguns aminoácidos (arginina, glutamina, histidina e ornitina) e um lipídio (PCae C38: 6) como biomarcadores candidatos para a esquizofrenia [211]. Em nosso estudo, observamos uma redução de

lisofosfatidilcolinas, acilcarnitinas e alguns metabólitos e um aumento de várias fosfatidilcolinas.

Os metabólitos lysoPC a C18: 1, lysoPC a C17: 0 e lysoPC a C18: 0 foram altamente associados a pacientes com esquizofrenia sob drogas antipsicóticas. Estas moléculas parecem estar intimamente relacionadas com a função normal do cérebro [212]. Por outro lado, observamos um aumento nos níveis de fosfatidilcolinas (PC) no soro de pacientes com esquizofrenia sob antipsicóticos. Estes resultados estão de acordo com a concentração de PC em tecidos cerebrais *post-mortem* e no soro de pacientes com esquizofrenia [213, 214]. As lisofosfatidilcolinas são produzidas a partir de fosfatidilcolinas como resultado da hidrólise parcial pela fosfolipase A2, que normalmente remove um grupo de ácidos graxos das moléculas. Evidências acumuladas ao longo dos anos demonstraram que pacientes com esquizofrenia apresentam um aumento na função da fosfolipase A2 cerebral [215, 216]. Essa ruptura na função da fosfolipase A2 está associada a mudanças na composição dos fosfolípidos e à patogênese da esquizofrenia [213, 214]. As drogas antipsicóticas podem modular a neurotransmissão monoaminérgica e indiretamente reduzir a atividade da fosfolipase A2. Por exemplo, a administração crônica de haloperidol em ratos reduziu os níveis de ácido araquidônico em neurônios dopaminérgicos, possivelmente devido a interações com os receptores dopaminérgicos da fosfolipase A2 [217]. Nossa abordagem metabolômica indica que drogas antipsicóticas podem estar indiretamente reduzindo a função da fosfolipase A2 e a produção de lisofosfatidilcolinas em pacientes com esquizofrenia.

Algumas acilcarnitinas também foram reduzidas em pacientes com esquizofrenia sob o uso de drogas antipsicóticas. As acilcarnitinas estão envolvidas na beta-oxidação de ácidos graxos e tem se mostrado útil na identificação de problemas no metabolismo [218]. As acilcarnitinas do cérebro podem funcionar na síntese de lipídios, alterando e estabilizando a composição da membrana, modulando genes e proteínas, melhorando a função mitocondrial, aumentando a atividade antioxidante e aumentando a neurotransmissão colinérgica [218].

É bem conhecido que a serina, a ornitina e o glutamato estão envolvidos na neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central e que os pacientes com esquizofrenia apresentam algum déficit na neurotransmissão glutamatérgica [219, 220]. A neurotransmissão por glutamato tem um papel fundamental na fisiopatologia da esquizofrenia. A potenciação da neurotransmissão glutamatérgica através do

bloqueio do transportador de glicina e receptores NMDA tem efeitos benéficos no tratamento da esquizofrenia [219]. Uma explicação para a redução do glutamato no soro seria o aumento da captação cerebral pelos astrócitos. A concentração de ornitina foi proposta como sendo maior em pacientes com esquizofrenia em estudos anteriores, mas aqui, observamos uma redução neste nível de aminoácidos em pacientes sob tratamento antipsicótico [213]. É possível que os antipsicóticos aumentem a expressão da ornitina descarboxilase 1 (ODC) no metabolismo ornitina-poliamina, o que poderia ser responsável por essa redução no nível sérico.

Em nosso estudo, analisamos vários lipídeos, aminoácidos, carnitinas e outros metabólitos, mas, infelizmente, não cobrimos todo o metaboloma, o que poderia expandir nosso perfil de pacientes com esquizofrenia sob drogas antipsicóticas. O tamanho da amostra foi pequeno, mas os participantes deste estudo eram brasileiros, que têm um background genético muito misto e isso torna o estudo mais relevante para a população em geral.

Em conclusão, neste trabalho nós desenhamos a assinatura metabólica no soro de pacientes com esquizofrenia sob terapia antipsicótica. A alteração nas concentrações de lipídeos e metabólitos pode refletir a fisiopatologia da esquizofrenia e a abordagem farmacológica. Este dado é relevante para pacientes com esquizofrenia devido a grandes alterações metabólicas relacionadas à terapia antipsicótica. Trabalhos futuros explorarão mais metabólitos e poderão melhorar o prognóstico e a terapêutica de pacientes com esquizofrenia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos metabolômicos são muito amplos e complexos. Neste estudo, tivemos a oportunidade de trabalhar com técnicas sofisticadas de análises analíticas, de preparo de amostras e análises estatísticas. Nossos resultados apontam novas direções para a descoberta de biomarcadores para doenças que são urgências médicas, como o AVEI e o IAMCSST, e para uma doença crônica e altamente incapacitante que é a esquizofrenia. Embora nosso grupo de estudos tenha sido pequeno nos três casos, ainda assim conseguimos caracterizar cada uma das doenças com base nas diferenças de perfis metabólicos. Conseguimos confirmar os resultados de pesquisas anteriores apresentados na literatura, principalmente no que se refere as modificações do perfil lipídico devido à resposta inflamatória ou ao uso de fármacos. Estamos cientes de que esse é ainda o primeiro passo para tornar viável a elaboração de métodos para o diagnóstico/prognóstico baseado em kits que sejam de fácil acesso, que apresentem resultados rápidos e com altos níveis de acurácia. Temos como perspectivas futuras conseguir grupos de estudo maiores e dar prosseguimento às análises metabolômicas alvo e não alvo.

REFERÊNCIAS

1. Oliver, S.G., et al., *Systematic functional analysis of the yeast genome*. Trends Biotechnol, 1998. 16(9): p. 373-8.
2. Kell, D.B. and S.G. Oliver, *The metabolome 18 years on: a concept comes of age*. Metabolomics, 2016. 12(9): p. 148.
3. Tebani, A., C. Afonso, and S. Bekri, *Advances in metabolome information retrieval: turning chemistry into biology. Part I: analytical chemistry of the metabolome*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2018. 41(3): p. 379-391.
4. Dumas, M.E., *Metabolome 2.0: quantitative genetics and network biology of metabolic phenotypes*. Mol Biosyst, 2012. 8(10): p. 2494-502.
5. Nicholson, J.K. and J.C. Lindon, *Metabonomics*. Nature, 2008. 455: p. 1054.
6. Homuth, G., et al., *A description of large-scale metabolomics studies: increasing value by combining metabolomics with genome-wide SNP genotyping and transcriptional profiling*. Journal of Endocrinology, 2012. 215(1): p. 17-28.
7. Bingol, K., *Recent Advances in Targeted and Untargeted Metabolomics by NMR and MS/NMR Methods*. High Throughput, 2018. 7(2).
8. Tsugawa, H., *Advances in computational metabolomics and databases deepen the understanding of metabolisms*. Current Opinion in Biotechnology, 2018. 54: p. 10-17.
9. Cambiaghi, A., M. Ferrario, and M. Masseroli, *Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration*. Briefings in Bioinformatics, 2017. 18(3): p. 498-510.
10. Patti, G.J., O. Yanes, and G. Siuzdak, *Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. 13(4): p. 263-9.
11. Roberts, L.D., et al., *Targeted metabolomics*. Curr Protoc Mol Biol, 2012. Chapter 30: p. Unit 30 2 1-24.
12. Vinayavekhin, N. and A. Saghatelian, *Untargeted metabolomics*. Curr Protoc Mol Biol, 2010. Chapter 30: p. Unit 30 1 1-24.
13. Dettmer, K. and B.D. Hammock, *Metabolomics--a new exciting field within the "omics" sciences*. Environmental health perspectives, 2004. 112(7): p. A396-A397.
14. Kosmides, A.K., et al., *Metabolomic fingerprinting: challenges and opportunities*. Critical reviews in biomedical engineering, 2013. 41(3): p. 205-221.
15. Kell, D.B., et al., *Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message*. Nature Reviews Microbiology, 2005. 3: p. 557.
16. Dunn, W.B., N.J. Bailey, and H.E. Johnson, *Measuring the metabolome: current analytical technologies*. Analyst, 2005. 130(5): p. 606-25.
17. Markley, J.L., et al., *The future of NMR-based metabolomics*. Curr Opin Biotechnol, 2017. 43: p. 34-40.

18. Kohler, A., et al., *High-Throughput Biochemical Fingerprinting of Saccharomyces cerevisiae by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. PLOS ONE, 2015. 10(2): p. e0118052.
19. Gowda, G.A.N. and D. Djukovic, *Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2014. 1198: p. 3-12.
20. de Raad, M., C.R. Fischer, and T.R. Northen, *High-throughput platforms for metabolomics*. Current Opinion in Chemical Biology, 2016. 30: p. 7-13.
21. Dunn, W.B., et al., *Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry*. Nat. Protocols, 2011. 6(7): p. 1060-1083.
22. Koek, M.M., et al., *Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives*. Metabolomics, 2011. 7(3): p. 307-328.
23. Bartel, J., J. Krumsiek, and F.J. Theis, *Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data*. Computational and structural biotechnology journal, 2013. 4: p. e201301009-e201301009.
24. Worley, B. and R. Powers, *Multivariate Analysis in Metabolomics*. Current Metabolomics, 2013. 1(1): p. 92-107.
25. Liland, K.H., *Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011. 30(6): p. 827-841.
26. Wilson, I.D. and U.A.T. Brinkman, *Hyphenation and hypernation: The practice and prospects of multiple hyphenation*. Journal of Chromatography A, 2003. 1000(1): p. 325-356.
27. Zhou, B., et al., *LC-MS-based metabolomics*. Molecular bioSystems, 2012. 8(2): p. 470-481.
28. Collins, C.H., G.L. Braga, and P.S. Bonato, *Introdução a métodos cromatográficos*. 5 ed. Vol. 1. 1990, São Paulo: Editora da UNICAMP. 279.
29. Coskun, O., *Separation techniques: Chromatography*. Northern clinics of Istanbul, 2016. 3(2): p. 156-160.
30. Pitt, J.J., *Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry*. The Clinical biochemist. Reviews, 2009. 30(1): p. 19-34.
31. Zotou, A., *An overview of recent advances in HPLC instrumentation*. Central European Journal of Chemistry, 2012. 10(3): p. 554-569.
32. Herderich, M., et al., *Application of atmospheric pressure ionization HPLC-MS-MS for the analysis of natural products*. Chromatographia, 1997. 45(1): p. 127-132.
33. Fenn, J.B., *Mass spectrometric implications of high-pressure ion sources*. International Journal of Mass Spectrometry, 2000. 200(1): p. 459-478.
34. N Patel, K., et al., *Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy*. Vol. 1. 2010. 2-13.
35. Banerjee, S. and S. Mazumdar, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*. International Journal of Analytical Chemistry, 2012. 2012: p. 40.

36. Bruins, A.P., *Mechanistic aspects of electrospray ionization*. Journal of Chromatography A, 1998. 794(1): p. 345-357.
37. Ho, C.S., et al., *Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications*. The Clinical biochemist. Reviews, 2003. 24(1): p. 3-12.
38. Griffiths, W.J., et al., *Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry*. Biochemical Journal, 2001. 355(3): p. 545-561.
39. McLafferty, F., *Tandem mass spectrometry*. Science, 1981. 214(4518): p. 280-287.
40. Shukla, A.K. and J.H. Futrell, *Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. 35(9): p. 1069-1090.
41. Stewart, K.K., *Flow-injection analysis: A review of its early history*. Talanta, 1981. 28(11): p. 789-797.
42. Jocelyn Paré, J.R. and V. Yaylayan, *Chapter 7 Mass spectrometry: Principles and applications*, in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, J.R.J. Paré and J.M.R. Bélanger, Editors. 1997, Elsevier. p. 239-266.
43. Schug, K.A., C. Serrano, and P. Frycak, *Controlled band dispersion for quantitative binding determination and analysis with electrospray ionization-mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev, 2010. 29(5): p. 806-29.
44. Goodacre, R., et al., *Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics*. Metabolomics, 2007. 3(3): p. 231-241.
45. Vinaixa, M., et al., *A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data*. Metabolites, 2012. 2(4): p. 775-795.
46. Whitley, E. and J. Ball, *Statistics review 3: hypothesis testing and P values*. Critical care (London, England), 2002. 6(3): p. 222-225.
47. Szymanska, E., et al., *Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies*. Metabolomics, 2012. 8(Suppl 1): p. 3-16.
48. Ramadan, Z., et al., *Metabolic profiling using principal component analysis, discriminant partial least squares, and genetic algorithms*. Talanta, 2006. 68(5): p. 1683-91.
49. Jiang, Z., et al., *A metabonomic approach applied to predict patients with cerebral infarction*. Talanta, 2011. 84(2): p. 298-304.
50. Trygg, J. and S. Wold, *Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)*. Journal of Chemometrics, 2002. 16(3): p. 119-128.
51. Geladi, P. and B.R. Kowalski, *Partial least-squares regression: a tutorial*. Analytica Chimica Acta, 1986. 185(0): p. 1-17.
52. van den Berg, R.A., et al., *Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data*. BMC Genomics, 2006. 7: p. 142-142.
53. Gromski, P.S., et al., *The influence of scaling metabolomics data on model classification accuracy*. Metabolomics, 2015. 11(3): p. 684-695.
54. Worley, B., S. Halouska, and R. Powers, *Utilities for quantifying separation in PCA/PLS-DA scores plots*. Analytical Biochemistry, 2013. 433(2): p. 102-104.

55. Long, F.H., *Chapter 19 - Multivariate Analysis for Metabolomics and Proteomics Data*, in *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*, H.J. Issaq and T.D. Veenstra, Editors. 2013, Academic Press: Boston. p. 299-311.
56. Gromski, P.S., et al., *A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis--a marriage of convenience or a shotgun wedding*. *Anal Chim Acta*, 2015. 879: p. 10-23.
57. Barker, M. and W. Rayens, *Partial least squares for discrimination*. *Journal of Chemometrics*, 2003. 17(3): p. 166-173.
58. Wang, L.-Y. and W.-C. Lee, *A Permutation Method to Assess Heterogeneity in External Validation for Risk Prediction Models*. *PLOS ONE*, 2015. 10(1): p. e0116957.
59. Golland, P. and B. Fischl. *Permutation Tests for Classification: Towards Statistical Significance in Image-Based Studies*. 2003. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
60. Westerhuis, J.A., et al., *Assessment of PLS-DA cross validation*. *Metabolomics*, 2008. 4(1): p. 81-89.
61. Triba, M.N., et al., *PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters*. *Molecular BioSystems*, 2015. 11(1): p. 13-19.
62. Wold, S., et al., *Orthogonal signal correction of near-infrared spectra*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1998. 44(1): p. 175-185.
63. Worley, B. and R. Powers, *PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability*. *Current Metabolomics*, 2016. 4(2): p. 97-103.
64. Sarstedt, M., et al., *Partial least squares structural equation modeling (PLS-SEM): A useful tool for family business researchers*. *Journal of Family Business Strategy*, 2014. 5(1): p. 105-115.
65. Ahn, J.K., et al., *A Comparative Metabolomic Evaluation of Behcet's Disease with Arthritis and Seronegative Arthritis Using Synovial Fluid*. *PLOS ONE*, 2015. 10(8): p. e0135856.
66. Chong, I.-G. and C.-H. Jun, *Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2005. 78(1): p. 103-112.
67. Galindo-Prieto, B., L. Eriksson, and J. Trygg, *Variable influence on projection (VIP) for orthogonal projections to latent structures (OPLS)*. *Journal of Chemometrics*, 2014. 28(8): p. 623-632.
68. Wang, X., et al., *Urine metabolomics analysis for biomarker discovery and detection of jaundice syndrome in patients with liver disease*. *Mol Cell Proteomics*, 2012. 11(8): p. 370-80.
69. Strimbu, K. and J.A. Tavel, *What are biomarkers? Current opinion in HIV and AIDS*, 2010. 5(6): p. 463-466.
70. Selleck, M.J., M. Senthil, and N.R. Wall, *Making Meaningful Clinical Use of Biomarkers*. *Biomarker insights*, 2017. 12: p. 1177271917715236-1177271917715236.
71. Fiehn, O., *Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes*. *Plant Molecular Biology*, 2002. 48(1-2): p. 155-171.
72. Wilkins, J.M. and E. Trushina, *Application of Metabolomics in Alzheimer's Disease*. *Frontiers in neurology*, 2018. 8: p. 719-719.

73. Yi, L., et al., *Characterizing Alzheimer's disease through metabolomics and investigating anti-Alzheimer's disease effects of natural products*. Ann N Y Acad Sci, 2017. 1398(1): p. 130-141.
74. Zhang, F., et al., *Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: a systematic review*. Oncotarget, 2017. 8(21): p. 35460-35472.
75. Armitage, E.G. and C. Barbas, *Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives*. J Pharm Biomed Anal, 2014. 87: p. 1-11.
76. Zhang, A.H., et al., *Metabolomics in noninvasive breast cancer*. Clin Chim Acta, 2013. 424: p. 3-7.
77. O'Connell, T.M., *Recent advances in metabolomics in oncology*. Bioanalysis, 2012. 4(4): p. 431-51.
78. Garcia-Berrocso, T., et al., *Blood Biomarkers in Cardioembolic Stroke*. Current Cardiology Reviews, 2010. 6(3): p. 194-201.
79. Rhee, E.P. and R.E. Gerszten, *Metabolomics and Cardiovascular Biomarker Discovery*. Clinical Chemistry, 2012. 58(1): p. 139-147.
80. McGarrah, R.W., et al., *Cardiovascular Metabolomics*. Circulation Research, 2018. 122(9): p. 1238-1258.
81. Kim, M.H., et al., *Plasma biomarkers in the diagnosis of acute ischemic stroke*. Ann Clin Lab Sci, 2010. 40(4): p. 336-41.
82. Triglia, T., et al., *Analysis of cerebral spinal fluid and plasma after aneurysmal subarachnoid hemorrhage by evaluating a metabolomic profile as biomarkers for early detection of arterial vasospasm: 7AP1-8*. European Journal of Anaesthesiology (EJA), 2013. 30: p. 103-103.
83. Quinones, M.P. and R. Kaddurah-Daouk, *Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases*. Neurobiology of Disease, 2009. 35(2): p. 165-176.
84. Sethi, S. and E. Brietzke, *Omics-Based Biomarkers: Application of Metabolomics in Neuropsychiatric Disorders*. The international journal of neuropsychopharmacology, 2015. 19(3): p. pyv096-pyv096.
85. López-López, Á., et al., *A review of validated biomarkers obtained through metabolomics*. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2018. 18(6): p. 557-575.
86. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2018. 137(12): p. e67-e492.
87. Deb, P., S. Sharma, and K.M. Hassan, *Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis*. Pathophysiology, 2010. 17(3): p. 197-218.
88. Walcott, B.P., et al., *Outcomes in severe middle cerebral artery ischemic stroke*. Neurocritical care, 2014. 21(1): p. 20-26.
89. Bustamante, A., et al., *Ischemic stroke outcome: A review of the influence of post-stroke complications within the different scenarios of stroke care*. European Journal of Internal Medicine, 2016. 29(Supplement C): p. 9-21.
90. Doyle, K.P., R.P. Simon, and M.P. Stenzel-Poore, *Mechanisms of ischemic brain damage*. Neuropharmacology, 2008. 55(3): p. 310-8.

91. Xing, C., et al., *Pathophysiologic cascades in ischemic stroke*. International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society, 2012. 7(5): p. 378-385.
92. Kristian, T., *Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage*. Cell Calcium, 2004. 36(3-4): p. 221-33.
93. Kunz, A., U. Dirnagl, and P. Mergenthaler, *Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2010. 24(4): p. 495-509.
94. Facecchia, K., et al., *Oxidative Toxicity in Neurodegenerative Diseases: Role of Mitochondrial Dysfunction and Therapeutic Strategies*. Journal of Toxicology, 2011. 2011: p. 12.
95. Dirnagl, U., *Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. 1268(1): p. 21-25.
96. Lakhan, S., A. Kirchgessner, and M. Hofer, *Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches*. Journal of Translational Medicine, 2009. 7(1): p. 97.
97. Radak, D., I. Resanovic, and E.R. Isenovic, *Link between oxidative stress and acute brain ischemia*. Angiology, 2014. 65(8): p. 667-76.
98. Maznyczka, A., et al., *The ischaemic constellation: an alternative to the ischaemic cascade—implications for the validation of new ischaemic tests*. Open Heart, 2015. 2(1).
99. Adams, H.P., Jr., et al., *Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*. Stroke, 1993. 24(1): p. 35-41.
100. Hart, R.G., et al., *Embolic strokes of undetermined source: the case for a new clinical construct*. Lancet Neurol, 2014. 13(4): p. 429-38.
101. Kodumuri, N., et al., *The association of insular stroke with lesion volume*. Neuroimage Clin, 2016. 11: p. 41-45.
102. Mikulik, R. and N. Wahlgren, *Treatment of acute stroke: an update*. J Intern Med, 2015. 278(2): p. 145-65.
103. Montaner, J., et al., *Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers*. Stroke, 2008. 39(8): p. 2280-7.
104. Green, J.B., *Brain reorganization after stroke*. Top Stroke Rehabil, 2003. 10(3): p. 1-20.
105. Bamford, J., et al., *The frequency, causes and timing of death within 30 days of a first stroke: the Oxfordshire Community Stroke Project*. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 1990. 53(10): p. 824-829.
106. Grefkes, C. and N.S. Ward, *Cortical reorganization after stroke: how much and how functional?* Neuroscientist, 2014. 20(1): p. 56-70.
107. Yew, K.S. and E. Cheng, *Acute stroke diagnosis*. Am Fam Physician, 2009. 80(1): p. 33-40.
108. Vymazal, J., et al., *Comparison of CT and MR imaging in ischemic stroke*. Insights into imaging, 2012. 3(6): p. 619-627.
109. Chalela, J.A., et al., *Magnetic resonance imaging and computed tomography in emergency assessment of patients with suspected acute stroke: a prospective comparison*. The Lancet, 2007. 369(9558): p. 293-298.

110. Luker, J.A., J. Bernhardt, and K.A. Grimmer-Somers, *Demographic and stroke-related factors as predictors of quality of acute stroke care provided by allied health professionals*. Journal of multidisciplinary healthcare, 2011. 4: p. 247-259.
111. Macciocchi, S.N., et al., *Ischemic stroke: relation of age, lesion location, and initial neurologic deficit to functional outcome*. Arch Phys Med Rehabil, 1998. 79(10): p. 1255-7.
112. Wiszniewska, M., M. Niewada, and A. Czlonkowska, *Sex differences in risk factor distribution, severity, and outcome of ischemic stroke*. Acta Clin Croat, 2011. 50(1): p. 21-8.
113. Adams, H.P., et al., *Baseline NIH Stroke Scale score strongly predicts outcome after stroke*. A report of the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST), 1999. 53(1): p. 126-126.
114. Kwah, L.K. and J. Diong, *National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)*. Journal of Physiotherapy, 2014. 60(1): p. 61.
115. Behme, D., et al., *Intravenous Thrombolysis Facilitates Successful Recanalization with Stent-Retriever Mechanical Thrombectomy in Middle Cerebral Artery Occlusions*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2016. 25(4): p. 954-9.
116. Bansal, S., K.S. Sangha, and P. Khatri, *Drug treatment of acute ischemic stroke*. Am J Cardiovasc Drugs, 2013. 13(1): p. 57-69.
117. Xian, Y., et al., *Risks and Benefits Associated With Prestroke Antiplatelet Therapy Among Patients With Acute Ischemic Stroke Treated With Intravenous Tissue Plasminogen Activator*. JAMA Neurol, 2016. 73(1): p. 50-9.
118. Wu, M.Y., et al., *Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018. 46(4): p. 1650-1667.
119. Sims, N.R. and H. Muyderman, *Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1802(1): p. 80-91.
120. Olmez, I. and H. Ozyurt, *Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease*. Neurochem Int, 2012. 60(2): p. 208-12.
121. Sanderson, T., et al., *Molecular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury in Brain: Pivotal Role of the Mitochondrial Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Generation*. Molecular Neurobiology, 2013. 47(1): p. 9-23.
122. Nour, M., F. Scalzo, and D.S. Liebeskind, *Ischemia-Reperfusion Injury in Stroke*. Interventional Neurology, 2012. 1(3-4): p. 185-199.
123. Makris, K., et al., *Blood biomarkers in ischemic stroke: potential role and challenges in clinical practice and research*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2018. 55(5): p. 294-328.
124. Whiteley, W., M.-C. Tseng, and P. Sandercock, *Blood Biomarkers in the Diagnosis of Ischemic Stroke: A Systematic Review*. Stroke, 2008. 39(10): p. 2902-2909.
125. Jickling, G.C. and F.R. Sharp, *Blood biomarkers of ischemic stroke*. Neurotherapeutics, 2011. 8(3): p. 349-60.
126. Wang, Y., et al., *Dynamic metabolites profile of cerebral ischemia/reperfusion revealed by (1)H NMR-based metabolomics contributes to potential biomarkers*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. 7(7): p. 4067-75.

127. Hjalmarsson, C., et al., *Neuronal and glia-related biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke*. J Cent Nerv Syst Dis, 2014. 6: p. 51-8.
128. Gao, J., et al., *Analysis of serum metabolites for the discovery of amino acid biomarkers and the effect of galangin on cerebral ischemia*. Mol Biosyst, 2013. 9(9): p. 2311-21.
129. Castellanos, M. and J. Serena, *Applicability of biomarkers in ischemic stroke*. Cerebrovasc Dis, 2007. 24 Suppl 1: p. 7-15.
130. Jickling, G.C. and F.R. Sharp, *Biomarker panels in ischemic stroke*. Stroke, 2015. 46(3): p. 915-920.
131. Kim, S.J., G.J. Moon, and O.Y. Bang, *Biomarkers for Stroke*. Journal of Stroke, 2013. 15(1): p. 27-37.
132. Miao, Y. and J.K. Liao, *Potential serum biomarkers in the pathophysiological processes of stroke*. Expert Review of Neurotherapeutics, 2014. 14(2): p. 173-185.
133. Peng, B., H. Li, and X.-X. Peng, *Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming*. Protein & cell, 2015. 6(9): p. 628-637.
134. Clish, C.B., *Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine*. Cold Spring Harbor Molecular Case Studies, 2015. 1(1): p. a000588.
135. Sun, H., et al., *Potential serum biomarkers and metabonomic profiling of serum in ischemic stroke patients using UPLC/Q-TOF MS/MS*. PloS one, 2017. 12(12): p. e0189009-e0189009.
136. Jove, M., et al., *Metabolomics predicts stroke recurrence after transient ischemic attack*. Neurology, 2015. 84(1): p. 36-45.
137. Duchene, G., et al., *A comparative study of the sensitivity of diffusion-related parameters obtained from diffusion tensor imaging, diffusional kurtosis imaging, q-space analysis and bi-exponential modelling in the early disease course (24 h) of hyperacute (6 h) ischemic stroke patients*. MAGMA, 2017. 30(4): p. 375-385.
138. Birenbaum, D., L.W. Bancroft, and G.J. Felsberg, *Imaging in acute stroke*. The western journal of emergency medicine, 2011. 12(1): p. 67-76.
139. Di Meo, S., et al., *Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016. 2016: p. 1245049-1245049.
140. Jung, J.Y., et al., *¹H-NMR-Based Metabolomics Study of Cerebral Infarction*. Stroke, 2011. 42(5): p. 1282-1288.
141. Fahy, E., et al., *Lipid classification, structures and tools*. Biochim Biophys Acta, 2011. 1811(11): p. 637-47.
142. Rink, C. and S. Khanna, *Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke*. Antioxidants & redox signaling, 2011. 14(10): p. 1889-1903.
143. Zhang, Z., et al., *Production of lysophosphatidylcholine by cPLA2 in the brain of mice lacking PPT1 is a signal for phagocyte infiltration*. Hum Mol Genet, 2007. 16(7): p. 837-47.
144. Adibhatla, R.M. and J.F. Hatcher, *Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders*. Neurochem Res, 2005. 30(1): p. 15-23.

145. Adibhatla, R.M., R. Dempsy, and J.F. Hatcher, *Integration of cytokine biology and lipid metabolism in stroke*. *Front Biosci*, 2008. 13: p. 1250-70.
146. Saenger, A.K. and R.H. Christenson, *Stroke Biomarkers: Progress and Challenges for Diagnosis, Prognosis, Differentiation, and Treatment*. *Clinical Chemistry*, 2010. 56(1): p. 21-33.
147. Gault, C.R., L.M. Obeid, and Y.A. Hannun, *An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown*. *Adv Exp Med Biol*, 2010. 688: p. 1-23.
148. Jin, J., et al., *Ceramide generated by sphingomyelin hydrolysis and the salvage pathway is involved in hypoxia/reoxygenation-induced Bax redistribution to mitochondria in NT-2 cells*. *The Journal of biological chemistry*, 2008. 283(39): p. 26509-26517.
149. Nayak, A.R., et al., *Time course of inflammatory cytokines in acute ischemic stroke patients and their relation to inter-alfa trypsin inhibitor heavy chain 4 and outcome*. *Ann Indian Acad Neurol*, 2012. 15(3): p. 181-5.
150. Ormstad, H., R. Verkerk, and L. Sandvik, *Serum Phenylalanine, Tyrosine, and their Ratio in Acute Ischemic Stroke: on the Trail of a Biomarker?* *J Mol Neurosci*, 2016. 58(1): p. 102-8.
151. Ibáñez, B., et al., *Evolving Therapies for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2015. 65(14): p. 1454-1471.
152. Kumar, A. and C.P. Cannon, *Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I*. *Mayo Clinic proceedings*, 2009. 84(10): p. 917-938.
153. Silva, F.M.F., et al., *Acute management of unstable angina and non-ST segment elevation myocardial infarction*. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 2015. 13(3): p. 454-461.
154. Karwowski, J., et al., *Relationship between infarct artery location, acute total coronary occlusion, and mortality in STEMI and NSTEMI patients*. *Pol Arch Intern Med*, 2017. 127(6): p. 401-411.
155. Crossman, D.C., *The pathophysiology of myocardial ischaemia*. *Heart (British Cardiac Society)*, 2004. 90(5): p. 576-580.
156. Pasotti, M., F. Prati, and E. Arbustini, *The pathology of myocardial infarction in the pre- and post-interventional era*. *Heart (British Cardiac Society)*, 2006. 92(11): p. 1552-1556.
157. Buja, L.M., *Myocardial ischemia and reperfusion injury*. *Cardiovasc Pathol*, 2005. 14(4): p. 170-5.
158. Turer, A.T. and J.A. Hill, *Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy*. *Am J Cardiol*, 2010. 106(3): p. 360-8.
159. Kalogeris, T., et al., *Cell biology of ischemia/reperfusion injury*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012. 298: p. 229-317.
160. Murphy, E. and C. Steenbergen, *Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury*. *Physiol Rev*, 2008. 88(2): p. 581-609.
161. Neri, M., et al., *Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists*. *Mediators Inflamm*, 2017. 2017: p. 7018393.
162. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. *N Engl J Med*, 2007. 357(11): p. 1121-35.

163. Teren, A., et al., *Alteration of Multiple Leukocyte Gene Expression Networks is Linked with Magnetic Resonance Markers of Prognosis After Acute ST-Elevation Myocardial Infarction*. Scientific reports, 2017. 7: p. 41705-41705.
164. Silbiger, V.N., et al., *Time course proteomic profiling of human myocardial infarction plasma samples: An approach to new biomarker discovery*. Clinica Chimica Acta, 2011. 412(11): p. 1086-1093.
165. Buja, L.M., *Lipid abnormalities in myocardial cell injury*. Trends in Cardiovascular Medicine, 1991. 1(1): p. 40-45.
166. Mythili, S. and N. Malathi, *Diagnostic markers of acute myocardial infarction*. Biomedical reports, 2015. 3(6): p. 743-748.
167. Al-Hadi, H.A. and K.A. Fox, *Cardiac markers in the early diagnosis and management of patients with acute coronary syndrome*. Sultan Qaboos University medical journal, 2009. 9(3): p. 231-246.
168. Au, A., *Metabolomics and Lipidomics of Ischemic Stroke*. Adv Clin Chem, 2018. 85: p. 31-69.
169. Ussher, J.R., et al., *The Emerging Role of Metabolomics in the Diagnosis and Prognosis of Cardiovascular Disease*. J Am Coll Cardiol, 2016. 68(25): p. 2850-2870.
170. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. The Journal of Clinical Investigation, 2013. 123(1): p. 92-100.
171. Sen, A., et al. *Membrane phospholipid metabolism during myocardial ischaemia: past, present and future*. in *Lipid metabolism in the normoxic and ischaemic heart*. 1987. Heidelberg: Steinkopff.
172. Chien, K.R., J.T. Willerson, and L.M. Buja, *Phospholipid alterations and membrane injury during myocardial ischemia*. Adv Myocardiol, 1985. 5: p. 347-53.
173. Sarri, E., et al., *Effects of hypoxia, glucose deprivation and acidosis on phosphatidylcholine synthesis in HL-1 cardiomyocytes. CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity correlates with sarcolemmal disruption*. Biochem J, 2006. 394(Pt 1): p. 325-34.
174. Ford, D.A., *Alterations in myocardial lipid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion*. Prog Lipid Res, 2002. 41(1): p. 6-26.
175. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(2): p. 112-24.
176. Harayama, T. and H. Riezman, *Understanding the diversity of membrane lipid composition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. 19(5): p. 281-296.
177. Braverman, N.E. and A.B. Moser, *Functions of plasmalogen lipids in health and disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. 1822(9): p. 1442-52.
178. Lessig, J. and B. Fuchs, *Plasmalogens in biological systems: their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis*. Curr Med Chem, 2009. 16(16): p. 2021-41.
179. Kohno, S., et al., *Lipidomic insight into cardiovascular diseases*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018. 504(3): p. 590-595.

180. **Montero Bullón, J.F., et al., *P 129 - Alteration of phospholipidome profile in the heart of an animal model of acute myocardial infarction*. Free Radical Biology and Medicine, 2017. 108: p. S61.**
181. **Post, J.A., A.J. Verkleij, and G.A. Langer, *Organization and function of sarcolemmal phospholipids in control and ischemic/reperfused cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 1995. 27(2): p. 749-60.**
182. **Rocquelin, G., et al., *Phospholipid content and fatty acid composition of human heart*. Lipids, 1989. 24(9): p. 775-80.**
183. **Hatch, G.M. and P.C. Choy, *Effect of hypoxia on phosphatidylcholine biosynthesis in the isolated hamster heart*. The Biochemical journal, 1990. 268(1): p. 47-54.**
184. **Choy, P.C., et al., *Phosphatidylcholine metabolism in ischemic and hypoxic hearts*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1992. 116(1): p. 53-58.**
185. **Bruhl, A., G. Hafner, and K. Loffelholz, *Release of choline in the isolated heart, an indicator of ischemic phospholipid degradation and its protection by ischemic preconditioning: no evidence for a role of phospholipase D*. Life Sci, 2004. 75(13): p. 1609-20.**
186. **Lochner, A. and M. de Villiers, *Phosphatidylcholine biosynthesis in myocardial ischaemia*. J Mol Cell Cardiol, 1989. 21(2): p. 151-63.**
187. **Sutter, I., et al., *Decreased phosphatidylcholine plasmalogens--A putative novel lipid signature in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction*. Atherosclerosis, 2016. 246: p. 130-40.**
188. **Floegel, A., et al., *Serum metabolites and risk of myocardial infarction and ischemic stroke: a targeted metabolomic approach in two German prospective cohorts*. Eur J Epidemiol, 2018. 33(1): p. 55-66.**
189. **Knapp, M., et al., *Myocardial infarction differentially alters sphingolipid levels in plasma, erythrocytes and platelets of the rat*. Basic research in cardiology, 2012. 107(6): p. 294-294.**
190. **Borodzicz, S., et al., *Sphingolipids in cardiovascular diseases and metabolic disorders*. Lipids Health Dis, 2015. 14: p. 55.**
191. **Zoeller, R.A., et al., *Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether*. Biochem J, 1999. 338 (Pt 3): p. 769-76.**
192. **Astudillo, A.M., M.A. Balboa, and J. Balsinde, *Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A2 enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2018.**
193. **Diez, E., et al., *Fatty acid and phospholipid selectivity of different phospholipase A2 enzymes studied by using a mammalian membrane as substrate*. Biochem J, 1994. 301 (Pt 3): p. 721-6.**
194. **Hazen, S.L., D.A. Ford, and R.W. Gross, *Activation of a membrane-associated phospholipase A2 during rabbit myocardial ischemia which is highly selective for plasmalogen substrate*. J Biol Chem, 1991. 266(9): p. 5629-33.**
195. **Pfohl, M., et al., *Upregulation of cholesterol synthesis after acute myocardial infarction--is cholesterol a positive acute phase reactant?* Atherosclerosis, 1999. 142(2): p. 389-93.**

196. Zhu, M., et al., *Metabolomics Study of the Biochemical Changes in the Plasma of Myocardial Infarction Patients*. *Front Physiol*, 2018. 9: p. 1017.
197. Radi, R., *Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects*. *Acc Chem Res*, 2013. 46(2): p. 550-9.
198. Tanabe, K., et al., *Increased levels of the oxidative stress marker, nitrotyrosine in patients with provocation test-induced coronary vasospasm*. *J Cardiol*, 2014. 64(2): p. 86-90.
199. Tandon, R., H.A. Nasrallah, and M.S. Keshavan, *Schizophrenia, "just the facts" 5. Treatment and prevention. Past, present, and future*. *Schizophr Res*, 2010. 122(1-3): p. 1-23.
200. Brown, A.S., *Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia*. *Schizophr Bull*, 2006. 32(2): p. 200-2.
201. Janoutova, J., et al., *Epidemiology and risk factors of schizophrenia*. *Neuro Endocrinol Lett*, 2016. 37(1): p. 1-8.
202. Lai, C.-Y., et al., *Biomarkers in schizophrenia: A focus on blood based diagnostics and theranostics*. *World journal of psychiatry*, 2016. 6(1): p. 102-117.
203. Sheehan, D.V., et al., *The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10*. *J Clin Psychiatry*, 1998. 59 Suppl 20: p. 22-33;quiz 34-57.
204. Sheehan, D.V., et al., *Reliability and validity of the Mini International Neuropsychiatric Interview for Children and Adolescents (MINI-KID)*. *J Clin Psychiatry*, 2010. 71(3): p. 313-26.
205. Li, P., G.L. Snyder, and K.E. Vanover, *Dopamine Targeting Drugs for the Treatment of Schizophrenia: Past, Present and Future*. *Current topics in medicinal chemistry*, 2016. 16(29): p. 3385-3403.
206. Dikec, G., et al., *Metabolic Side Effects in Patients Using Atypical Antipsychotic Medications During Hospitalization*. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv*, 2018. 56(4): p. 28-37.
207. Hennekens, C.H., et al., *Schizophrenia and increased risks of cardiovascular disease*. *Am Heart J*, 2005. 150(6): p. 1115-21.
208. Ringen, P.A., et al., *Increased mortality in schizophrenia due to cardiovascular disease - a non-systematic review of epidemiology, possible causes, and interventions*. *Front Psychiatry*, 2014. 5: p. 137.
209. Meyer, J.M. and C.E. Koro, *The effects of antipsychotic therapy on serum lipids: a comprehensive review*. *Schizophr Res*, 2004. 70(1): p. 1-17.
210. Bushe, C. and C. Paton, *The potential impact of antipsychotics on lipids in schizophrenia: is there enough evidence to confirm a link?* *Journal of Psychopharmacology*, 2005. 19(6_suppl): p. 76-83.
211. He, Y., et al., *Schizophrenia shows a unique metabolomics signature in plasma*. *Translational psychiatry*, 2012. 2(8): p. e149-e149.
212. Sugasini, D., et al., *Dietary docosahexaenoic acid (DHA) as lysophosphatidylcholine, but not as free acid, enriches brain DHA and improves memory in adult mice*. *Scientific Reports*, 2017. 7(1): p. 11263.
213. He, Y., et al., *Schizophrenia shows a unique metabolomics signature in plasma*. *Transl Psychiatry*, 2012. 2: p. e149.

214. Yao, J.K., S. Leonard, and R.D. Reddy, *Membrane phospholipid abnormalities in postmortem brains from schizophrenic patients*. Schizophr Res, 2000. 42(1): p. 7-17.
215. Smesny, S., et al., *Phospholipase A2 activity is associated with structural brain changes in schizophrenia*. Neuroimage, 2010. 52(4): p. 1314-27.
216. Law, M.H., R.G. Cotton, and G.E. Berger, *The role of phospholipases A2 in schizophrenia*. Mol Psychiatry, 2006. 11(6): p. 547-56.
217. Myers, C.S., et al., *Haloperidol downregulates phospholipase A2 signaling in rat basal ganglia circuits*. Brain Research, 2001. 896(1): p. 96-101.
218. Jones, L.L., D.A. McDonald, and P.R. Borum, *Acylcarnitines: role in brain*. Prog Lipid Res, 2010. 49(1): p. 61-75.
219. Pinto, M.C., et al., *Glycine transporters type 1 inhibitor promotes brain preconditioning against NMDA-induced excitotoxicity*. Neuropharmacology, 2015. 89: p. 274-81.
220. Stansley, B.J. and P.J. Conn, *The therapeutic potential of metabotropic glutamate receptor modulation for schizophrenia*. Curr Opin Pharmacol, 2018. 38: p. 31-36.