

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

**UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA EM PACIENTES COM
LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA E SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

Autora: Flávia Favretto

Orientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino

Coorientador: Prof. Dr. Juliano Simões de Toledo

Belo Horizonte

2018

Flávia Favretto

**UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA EM PACIENTES COM
LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA E SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas

Orientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino

Coorientador: Prof. Dr. Juliano Simões de Toledo

Belo Horizonte

2018

F846a Favretto, Flávia.
Uma abordagem metabólica em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica e Síndrome Mielodisplásica / Flávia Favretto. – 2018.
169 f. : il.

Orientador: Adriano de Paula Sabino.
Coorientador: Juliano Simões de Toledo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Leucemia linfocítica crônica – Teses. 2. Neoplasias hematológicas – Teses. 3. Metabólica – Teses. 4. Biomarcadores – Teses. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Toledo, Juliano Simões de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.99419



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO


Uma abordagem metabolômica em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica e Síndrome Mielodisplásica

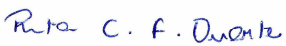
FLÁVIA FAVRETTO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 14 de junho de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Adriano de Paula Sabino - Orientador
UFMG


Prof. Fernando de Pilla Varotti
UFSJ- Campus Centro-Oeste. Laboratório de Protozoo


Prof. Rita Carolina Figueiredo Duarte
UFMG

Belo Horizonte, 14 de junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus, amparo e força diante dos desafios.

À Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG e ao programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, pela oportunidade de realização desse curso de mestrado.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Professor Dr. Adriano de Paula Sabino, por toda a confiança em abrir as portas e me acolher junto ao seu laboratório e ao grupo de pesquisa em Onco-Hematologia. Por toda a ajuda, orientação, ensinamentos, oportunidades e disponibilidade em todos os momentos.

Ao meu coorientador, Dr. Juliano Simões de Toledo, pela contribuição na construção desse estudo, por ter-me apresentado à metabolômica. Sou grata pelas sugestões, ideias e auxílio em todas as análises.

Aos médicos do Serviço de Hematologia do Hospital da Clínica da UFMG, em especial ao Dr. Sergio Schusterschitz da Silva Araujo, por terem colaborado na seleção dos pacientes para esse estudo.

Aos pacientes e aos indivíduos controles que tanto nos ensinam e que possibilitaram que esse estudo acontecesse.

Às meninas do grupo de pesquisa em Onco-Hematologia, em especial a Lorena Caixeta Gomes, Tâmara Dauare de Almeida e Fernanda Cristina Gontijo Evangelista, pela ajuda no laboratório, pelo conhecimento compartilhado, pela amizade e pelos momentos de descontração.

À Dra. Bruna Mattioly Valente e ao Dr. Frederico Crepaldi Nascimento pela ajuda e paciência na construção do heatmap.

A Vânia Goulart pelas análises e pelo auxílio nas dúvidas do experimento.

Ao Professor Dr. Rodrigo Ribeiro Rezende pelas contribuições e concessão do kit para realização desse estudo.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia e do Hospital das Clínicas por toda amizade e pelo apoio recebido.

Às bibliotecárias da Faculdade de Farmácia e da Faculdade de Medicina pelo auxílio nas estratégias de busca.

Agradeço a minha família, em especial meus pais, Alcides e Derci, por serem meu exemplo, incentivo e pela possibilidade de chegar até aqui, meu muito obrigada!

Ao meu enteado Davi por sua ajuda com as funções logarítmicas e programas computacionais.

Aos membros da banca pela disponibilidade, atenção e todas as contribuições.

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para conclusão desse trabalho.

E por último e tão especial ao meu marido Evandro por todo amor, incentivo e cumplicidade, que tão de perto me acompanhou e que tanto me entendeu nos momentos difíceis, preenchendo a nossa vida com mais alegria e tornando a nossa caminhada mais leve e feliz.

Ao CNPq, FAPEMIG e PRPq-UFMG pelo auxílio financeiro.

De tudo ficarão três coisas:
a certeza de estar sempre começando,
a certeza de que é preciso continuar
e a certeza de ser interrompido antes de terminar.

Fazer da queda um passo de dança,
do medo uma escada, do sonho uma ponte,
da procura um encontro."

Fernando Sabino

RESUMO

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) e a Síndrome Mielodisplásica (SMD) são neoplasias hematológicas que resultam em alterações quantitativas e qualitativas das células sanguíneas. Na LLC verifica-se o acúmulo de células neoplásicas (linfócitos B) em linfonodos, na medula óssea e no sangue periférico, enquanto que na SMD é observada uma medula óssea hipercelular e com pancitopenia no sangue periférico. Ambas as neoplasias hematológicas possuem limitações inerentes aos sistemas de estadiamento, favorecendo a busca por marcadores clínicos e biológicos que possam aprimorar a predição evolutiva dessas doenças. A metabolômica é uma abordagem analítica recente que busca a identificação e quantificação dos metabólitos presentes nas amostras biológicas e outras. As variações das concentrações plasmáticas apontadas por ela podem ser úteis para investigar possíveis biomarcadores. Contudo, ainda são incipientes as aplicações dessa análise em pacientes com leucemias. Foram analisadas amostras de plasma de 22 pacientes com LLC e 11 pacientes com SMD, provenientes da Unidade de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e de 19 indivíduos saudáveis que constituíram o grupo controle. Os metabólitos foram analisados por meio de uma abordagem metabolômica *targeted* quantitativa e controlada com base nas instruções do kit Absolute/DQ® p180 Kit (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria). Utilizou-se a técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) associada ao analisador de massa tandem quadrupolo. O ensaio validado permitiu a identificação abrangente e a quantificação de 186 metabólitos endógenos, incluindo 21 aminoácidos, 19 aminas biogênicas, 40 acilcarnitinas, 90 glicerofosfolipídeos, 15 esfingolipídeos e 01 soma das hexoses. Os dados foram analisados por métodos estatísticos multivariados (SIMCAP+ (14.0.1, MKS) e univariados (MATLAB). Foram utilizados os modelos estatísticos de PCA, PLS-DA e OPLS-DA para criar o ranqueamento de metabólitos (significância a partir de um $p < 0,05$). Analisou-se as rotas metabólicas através dos bancos de dados HMDB, KEGG e MBROLE. Foram selecionados alguns metabólitos que tiveram destaque pelo aumento ou pela diminuição da concentração na LLC e na SMD quando comparados ao grupo controle, pertencentes à classe química das acilcarnitinas, aminas biogênicas, aminoácidos e glicerofosfolipídeos. A análise preliminar do perfil metabólico desse experimento permitiu identificar metabólitos relacionados aos processos do metabolismo do câncer, os quais podem ser considerados possíveis alvos para futuras pesquisas de marcadores de diagnóstico e prognóstico bem como alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Leucemia linfocítica crônica. Síndrome Mielodisplásica. Metabolômica. Biomarcadores.

ABSTRACT

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) and Myelodysplastic Syndrome (MDS) are hematological malignancies that result in quantitative and qualitative changes in blood cells. In CLL, neoplastic cells (B lymphocytes) accumulation in lymph nodes, bone marrow and peripheral blood is observed, whereas in MDS a hypercellular bone marrow and peripheral blood pancytopenia are observed. Both hematological malignancies have staging systems limitations favoring the search for clinical and biological markers that can improve these diseases prediction. The metabolomics is a recent analytical approach that seeks the identification and quantification of the metabolites present in the biological samples and other. The variations in plasma concentrations indicated by it may be useful to investigate possible biomarkers. However, the applications of this analysis in patients with leukemias are still incipient. Plasma samples from 22 patients with CLL and 11 MDS patients from the Hematology and Oncology Unit of Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais and of 19 healthy individuals who constituted the control group were analyzed. Metabolites were analyzed using a quantitative and controlled metabolomic target based on Absolute / DQ® p180 Kit (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria) instructions. The Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) technique associated with the tandem quadrupole mass analyzer was used. The validated assay allowed a comprehensive identification and quantification of 186 endogenous metabolites, including 21 amino acids, 19 biogenic amines, 40 acylcarnitines, 90 glycerophospholipids, 15 sphingolipids and 1 sum of hexose. The data were based on multivariate statistical methods (SIMCAP + (14.0.1, MKS) and univariate (MATLAB). PCA, PLS-DA and OPLS-DA statistical models were used to create a metabolic ranking (significance from a $p < 0.05$). Metabolic routes were analyzed through HMDB, KEGG and MBROLE databases. Were selected some metabolites that were which were highlighted by an increase or decrease in concentration levels in CLL and SMD when compared to control group, belonging to acylcarnitines, biogenic amines, amino acids and glycerophospholipids chemical class. Metabolic profile preliminary analysis of this experiment allowed identification of metabolites related to cancer metabolism processes, which may be considered possible targets for future research of diagnostic and prognostic markers as well as therapeutic targets.

Keywords: Chronic lymphocytic leukemia. Myelodysplastic Syndrome. Metabolomics. Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Expressão do BCR durante desenvolvimento e maturação do linfócito B...	26
Figura 2 - Vias de sinalização do BCR nas células da LLC.....	28
Figura 3 - As células da LLC interagindo com elementos solúveis, estruturais e celulares no microambiente tissular.....	30
Figura 4 - Modelo de desenvolvimento das células na LLC.....	33
Figura 5 - Distensão sanguínea do sangue periférico de paciente com Leucemia Linfocítica Crônica.....	35
Figura 6 - Representação esquemática do fenótipo do linfócito B na LLC.....	36
Figura 7 - Vias de sinalização dos alvos terapêuticos no tratamento da LLC.....	42
Figura 8 - Modelo animal da patogênese da SMD.....	45
Figura 9 - Principais mecanismos patogênicos envolvidos na SMD.....	46
Figura 10 - Achados morfológicos no sangue periférico e na medula óssea encontrados na SMD.....	51
Figura 11 - Frequência das anormalidades citogenéticas e seu prognóstico nas SMD.....	52
Figura 12 - Abordagem terapêutica adaptada ao risco IPSS-R para o tratamento de pacientes com Síndrome Mielodisplásica.....	58
Figura 13 - O funcionamento celular.....	59
Figura 14 - Várias técnicas 'ômicas' e seu papel na biologia dos sistemas.....	60
Figura 15 - Diagrama ilustrando as tecnologias 'ômicas'.....	66
Figura 16 - Fluxo de análise em metabolômica.....	68
Figura 17 - Representação esquemática do funcionamento de Espectrômetro de Massas.....	70
Figura 18 - Gráfico com a evolução do número de publicações com a aplicação da metabolômica em estudos do câncer e leucemias.....	73
Figura 19 – Desenho da placa do kit Absolute/DQ® p180 Kit (Biocrates).....	83
Figura 20 - Gráfico de escores plots do modelo de PCA com as amostras de todos os pacientes da LLC, da SMD e dos indivíduos controle.....	91
Figura 21 - Modelos de PLS-DA construídos a partir da seleção dos grupos.....	95

Figura 22 - Modelos de OPLS-DA construídos a partir da seleção do grupo.....	97
Figura 23 - Representação da divisão das categorias químicas presentes em cada grupo.....	100
Figura 24 - Identidade dos metabólitos associados com a leucemia para cada grupo apontado pela análise no MBROLE.....	106
Figura 25 – Diagrama de Venn.....	108
Figura 26 – Mapa de calor (heatmap) para os 159 metabólitos mais relevantes estatisticamente gerados pelo modelo da classificação multivariada, segundo a análise realizada no SIMCA.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da OMS 2016 relativa às Neoplasias Mieloides e Leucemias Agudas.....	22
Tabela 2 - Classificação da OMS 2016 relativa às Neoplasias linfoides.....	23
Tabela 3 - Sistema de escore de Mautes para pontuação do diagnóstico da LLC.....	37
Tabela 4 - Sistema de estadiamento Binet e Rai.....	38
Tabela 5 - Lista dos ‘antigos’ e ‘atuais’ marcadores de prognóstico da LLC.....	40
Tabela 6 - Categoria das drogas e alvos terapêuticos usados na LLC.....	41
Tabela 7 - Frequência das mutações, localização e função relatadas na SMD.....	47
Tabela 8 - Classificação da SMD de acordo com OMS 2016.....	54
Tabela 9 - Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R): Grupo de risco citogenéticos.....	55
Tabela 10 - Sistema de pontuação Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R)	56
Tabela 11 - Classificação de risco e sobrevida média pelo IPSS-R.....	56
Tabela 12 - Técnicas analíticas mais empregadas em estudos metabolômicos: vantagens e desvantagens	72
Tabela 13 - Resumo da população estudada dos pacientes e indivíduos controles.....	79
Tabela 14 – Resultados dos parâmetros do hemograma.....	89
Tabela 15 - Resultados das estratégias estatísticas para os modelos de PCA, PLS-DA e OPLS-DA construídas para os três grupos.....	93
Tabela 16 - Resultado da seleção do melhor modelo estatístico na análise multivariada para cada um dos três grupos.....	94
Tabela 17 - Número de metabólitos selecionados para cada grupo na análise estatística multivariada e univariada.....	98

Tabela 18 - Lista dos metabólitos com índice VIP para cada um dos três grupos.....	102
Tabela 19 - Resultados para os três grupos das análises realizadas na base de dados MBROLE dos metabólitos associados com doenças.....	104
Tabela 20 - Principais vias biológicas dos metabólitos significativos dos três grupos apontadas pelo MBROLE.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASXL1	Gene additional sex combs like 1
ATP	Adenosina trifosfato
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BCOR	BCL6 corepressor
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
BRAF	B-Raf proto-oncogene
CBL	Cbl proto-oncogene
CD	Clusters of differentiation
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CTH	Células-tronco hematopoéticas
CTRL	Indivíduos Controles
Da	Dalton
DNMT3A	DNA Methyltransferase 3 alpha (DNMT3A)
ETV6	ETS translocation variant 6
EZH2	Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
FADH2	Flavina - adenina dinucleotídeo forma reduzida
FDA	Food and Drug Administration
FDR	False Discovery Rate
FGFR1	Receptor de fator de crescimento de fibroblastos
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GNAS	Guanine Nucleotide Regulatory Protein
HMDB	Human Metabolome Database
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrate Dehydrogenase 2
IPSS-R	Revised International Prognostic Scoring
JAK2	Gene Janus Kinase
JAK2	Gene Janus Kinase
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KRAS	KRAS proto-oncogene
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica

LMA	Leucemia Mieloide Aguda
MCL-1	Myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1
mM	Milimolar
MO	Medula óssea
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida denina dinucleótido fosfato reduzida
NOTCH1	Neurogenic locus notch homolog protein 1
NPM1	Nucleophosmin 1
NRAS	Neuroblastoma RAS viral(v-ras) oncogene homolog
NRAS	NRAS proto-oncogene
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPLS-DA	Análise discriminante com projeção ortogonal por mínimos quadrados parciais
PCA	Análise de componentes principais
PCM1	Pericentriolar material 1 (Gene PCM1)
PD-1	Receptor de Morte Celular Programada 1
PDGFRA	Platelet derived growth factor receptor alpha
PDGFRB	Platelet derived growth factor receptor beta
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase
RUNX1	Runt related transcription factor 1
SF3B1	Splicing Factor 3b Subunit 1
SIRT3	Sirtuínas localizada na mitocôndria
SIRT6	Sirtuínas localizada no núcleo
SRSF	Serine and arginine rich splicing factor 2
TET2	Tet methylcytosine dioxygenase 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TP53	Tumor protein p53
U.V.	Unit Variance
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
U2AF1U2	Small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (U2AF) 1
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
VIP	Variable Influence on Projection

Vs.

Versus

ZRSR2

Zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Leucemia Linfocítica Crônica	24
2.1.1 Definição.....	24
2.1.2 Epidemiologia.....	24
2.1.3 Fisiopatologia.....	25
2.1.4 Quadro clínico.....	33
2.1.5 Achados laboratoriais.....	34
2.1.6 Sistemas de Estadiamento.....	37
2.1.7 Fatores de prognóstico.....	38
2.1.8 Tratamento.....	40
2.2 Síndrome Mielodisplásica.....	43
2.2.1 Definição.....	43
2.2.2 Epidemiologia.....	43
2.2.3 Fisiopatologia	44
2.2.4 Quadro clínico.....	48
2.2.5 Achados laboratoriais.....	49
2.2.6 Classificação.....	53
2.2.7 Sistemas de estratificação de risco e fatores de prognóstico.....	55
2.2.8 Tratamento.....	56
2.3 Ciências ‘Ômicas’.....	59
2.4 Metabolismo.....	62
2.5 Metabolômica.....	64
2.6 Técnicas analíticas para análise metabolômica.....	68
2.7 Estudos metabolômicos na clínica e em leucemias.....	72
3 JUSTIFICATIVA.....	74
4 OBJETIVOS.....	75
4.1 Objetivo geral.....	75
4.1.1 Objetivos específicos.....	75

5 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
5.1 Delineamento do experimento.....	76
5.2 População estudada.....	78
5.2.1 Amostras biológicas da LLC	78
5.2.2 Amostras biológicas da SMD.....	78
5.2.3 Grupo Controle.....	79
5.3 Coleta das amostras	80
5.4 Análise por UPLC - MS/MS.....	80
5.5 Processamento dos dados e Análises Quimiométricas.....	83
5.5.1 Análise Estatística Multivariada.....	84
5.5.2 Análise Estatística Univariada	87
5.6 Biologia dos Sistemas.....	87
6 RESULTADOS	89
6.1 Análise estatística multivariada PCA, PLS-DA e OPLS-DA.....	89
6.2 Análise estatística Univariada.....	98
6.3 Metabólitos Significativos dos grupos.....	99
6.4 Divisão das categorias químicas	99
6.5 Metabólitos com índice VIP.....	101
6.6 Metabólitos associados com vias KEGG.....	102
6.7 Análise no MBROLE.....	103
6.8 Diagrama de Venn e Mapa de Calor.....	107
7 DISCUSSÃO.....	110
7.1 Acilcarnitinas, leucemias e câncer.....	111
7.2 Aminas biogênicas, leucemias e câncer.....	113
7.3 Aminoácidos, leucemias e câncer	115
7.4 Lipídeos, leucemia e câncer.....	119
8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

APÊNDICES	137
APENDICE A - Lista dos metabólitos medidos pelo kit (Biocrates Absolute IDQ® p180).....	137
APENDICE B - Importância biológica dos metabólitos medidos pelo kit.....	141
APENDICE C - Metabólitos significativos análise univariada do Grupo: LLC vs. CTRL.....	143
APENDICE D - Metabólitos significativos análise univariada do Grupo: SMD vs. CTRL.....	147
APENDICE E - Metabólitos significativos análise univariada do Grupo: LLC vs. SMD.....	153
APENDICE F - Metabólitos do grupo LLC vs. CTRL e suas respectivas ligações com as vias do metabolismo do câncer na base KEGG.....	157
APENDICE G - Metabólitos do grupo SMD vs. CTRL e suas respectivas ligações com as vias do metabolismo do câncer na base KEGG.....	158
APENDICE H - Metabólitos do grupo LLC vs. SMD e suas respectivas ligações com as vias do metabolismo do cancer na base KEGG.....	159
ANEXOS	160
ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes.....	160
ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – COEP.....	162
ANEXO C - Termo Livre e esclarecido indivíduos controles.....	164
ANEXO D - Aprovação do CEP – Indivíduos controles.....	166

INTRODUÇÃO

O câncer se refere a um grande número de doenças caracterizadas pelo desenvolvimento de células anormais que se dividem incontrolavelmente e têm a capacidade de se infiltrar e destruir o tecido corporal normal. O câncer pode se desenvolver praticamente em qualquer lugar do corpo. A maioria dos cânceres se insere em três principais grupos: carcinomas, sarcomas e leucemias ou linfomas. Os Carcinomas representam aproximadamente 90% dos casos de câncer em humanos e se mimetizam a linhagens epiteliais. Sarcomas são tumores sólidos, mais raros, do tecido conectivo (músculos, tendões e ossos). Leucemias e linfomas que correspondem aproximadamente 7% das doenças humanas malignas, são neoplasias hematológicas (COOPER *et.al.*, 2007).

As células do câncer diferem das células normais pela ausência de resposta aos mecanismos regulatórios da proliferação, apoptose e senescência celular. Esses mecanismos podem ser intracelulares, dependentes da interação entre a célula e o meio ambiente ou de interação célula-célula (ZAGO *et al.*, 2013). Leucemia é um tipo de câncer causada por uma alteração na proliferação anormal dos leucócitos e dos seus precursores no sangue e na medula óssea. É uma doença heterogênea com envolvimento de anormalidade genética e alterações cromossômicas. As leucemias são classificadas de acordo com o tipo celular envolvido (mieloide ou linfoide) e com o grau de maturação das células envolvidas (MANISHA, 2012). As leucemias são doenças progressivas, neoplasias malignas que acometem o sistema hematopoiético do homem, ocupando o 11º lugar na incidência de câncer mais comum em todo mundo (GLOBOCAN, 2012). Para o Brasil, estimam-se 5.940 casos novos de leucemia em homens e 4.860 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019, segundo as estimativas do INCA (Instituto Nacional de Câncer). Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,75 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 casos novos para cada 100 mil mulheres, ocupando a nona e a décima posições, respectivamente (INCA, 2018).

Dentre os vários subtipos de leucemias estas podem ser classificadas na forma “aguda” ou “crônica”. A determinação é baseada na fase da diferenciação celular, isto é, no momento de origem da neoplasia. Leucemias agudas se caracterizam pela

proliferação clonal acompanhada de bloqueio maturativo, o que possibilita a existência de diferentes subtipos de leucemias, caracterizam-se pela presença de células muito imaturas (denominadas blastos) e de evolução rapidamente fatal em pacientes não-tratados (LIESNER e GOLDSTONE, 1997). Enquanto que as leucemias crônicas também são procedentes de uma célula clonal imatura “defeituosa”, mas possuem a capacidade de se diferenciar em células que se assemelham a morfologia de células normais “maduras”. A diferenciação entre as formas agudas e crônicas geralmente podem ser feitas pela avaliação morfológica do sangue periférico e/ou da medula óssea. A distinção e subclassificação das leucemias são importantes em função dos diferentes tratamentos disponíveis bem como para o prognóstico da doença (GRIMWADE *et al.*, 2017). Até a década de 1970 as leucemias agudas eram divididas em leucemias linfoides, não linfoides e monocíticas. Em 1976, foi lançada a classificação FAB baseada na morfologia dos blastos e nas reações enzimático-citoquímicas. Na década de 90 surgiu uma classificação subsidiada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e atualizada em 2008 que estratificou as doenças em diferentes categorias e as definiu de acordo com a combinação da morfologia, imunofenótipo, aspectos genético-moleculares e síndromes clínicas (ZAGO *et al.*, 2013).

Recentemente em maio de 2016, foram apresentadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) novas atualizações para classificação dos tumores hematopoiéticos e linfoides. Na nova atualização da OMS relativa as Neoplasias Mieloides e Leucemias Agudas foram consideradas características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas citogenéticas e genética molecular que de são de grande importância para distinção dessas doenças (ARBBER *et al.*, 2016). Para as Neoplasias Linfoides a nova revisão esclarece e refina os critérios de diagnóstico e o gerenciamento das lesões nos estágios iniciais da linfomagênese, detalha a ampliação do cenário genético/molecular das numerosas neoplasias linfoides e seus correlatos clínicos, conduzindo a estratégias terapêuticas mais direcionadas (SWERDLOW *et al.*, 2016).

De uma maneira geral as neoplasias mieloides e leucemias agudas são divididas em nove grandes grupos (Tabela 1) e suas subdivisões: neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPC), neoplasias linfoides/mieloides com eosinofilia e anormalidades de PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 ou com PCM1-JAK2, neoplasias com feições intermediárias entre SMD/NMPC, Síndromes mielodisplásicas (SMD), o amplo

grupo das leucemias mieloides agudas (LMA), as leucemias agudas com linhagem ambígua (LALA), neoplasias de células dendríticas plasmocitóides blásticas, as leucemias / linfoma linfoblástico de células B e a leucemias / linfoma linfoblástico de células T (ARBBER *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Classificação da OMS 2016 relativa às Neoplasias Mieloides e Leucemias Agudas

Neoplasias mieloides e Leucemias agudas
Neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPC)
Neoplasias linfoides/mieloides com eosinofilia e anormalidades de PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 ou com PCM1-JAK2
Neoplasias com feições intermediárias entre SMD/NMPC
Síndromes mielodisplásicas (SMD)
Grupo das leucemias mieloides agudas (LMA)
Leucemias agudas com linhagem ambígua (LALA)
Neoplasias de células dendríticas plasmocitóides blásticas
Leucemias / linfoma linfoblástico de células B
Leucemias / linfoma linfoblástico de células T

Fonte: Adaptado (ARBBER *et al.*, 2016).

Para as neoplasias linfoides são cinco grandes grupos (Tabela 2) e seus subgrupos, sendo os principais: neoplasias linfoides B maduras (Leucemia linfoide crônica/linfoma linfocítico de células pequenas), neoplasias linfoides de células T e NK maduras, linfoma de Hodgkin, desordem linfoproliferativa pós-transplante, neoplasia das células dendrítica/ histiocítica (SWERDLOW *et al.*, 2016).

Perante o exposto acima, torna-se necessário a busca por marcadores que permitam auxiliar no diagnóstico e prognóstico das leucemias. O estudo do perfil metabólico tem sido utilizado para identificação de biomarcadores em diversas doenças. A caracterização dos tipos e diferentes proporções dos metabólitos são indicadas para essa pesquisa inicial de biomarcadores.

Tabela 2 - Classificação da OMS 2016 relativa às Neoplasias Linfoides

Neoplasias Linfoides
Neoplasias linfoides B maduras (Leucemia linfoide crônica/linfoma linfocítico de células pequenas)
Neoplasias linfoides de células T e NK maduras
Linfoma de Hodgkin
Desordem linfoproliferativa pós-transplante
Neoplasia da célula dendrítica/ histiocítica

Fonte: Adaptado (SWERDLOW *et al.*, 2016)

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leucemia Linfocítica Crônica

2.1.1 Definição

As doenças linfoproliferativas crônicas constituem um grupo heterogêneo de neoplasias, que têm em comum a origem a partir de células linfoides maduras (periféricas), que além de infiltrarem órgãos linfoides, como gânglios linfáticos e baço, também estão presentes na medula óssea e no sangue periférico. A Leucemia linfocítica crônica (LLC) é a mais comum das doenças linfoproliferativas crônicas (ZAGO *et al.*, 2013). A LLC é caracterizada por uma expansão clonal de linfócitos B, maduros, não funcionais que apresentam alta expressão para CD5+, CD19+, CD20+/- e CD23+ e com fraca expressão de imunoglobulinas IgM e IgD de superfície (SHAHJAHANI *et al.*, 2015). As células se acumulam no sangue periférico, na medula óssea, no fígado, no baço e nos linfonodos como resultado de sobrevida prolongada com diminuição da apoptose (HOFFBRAND e MOSS, 2012).

2.1.2 Epidemiologia

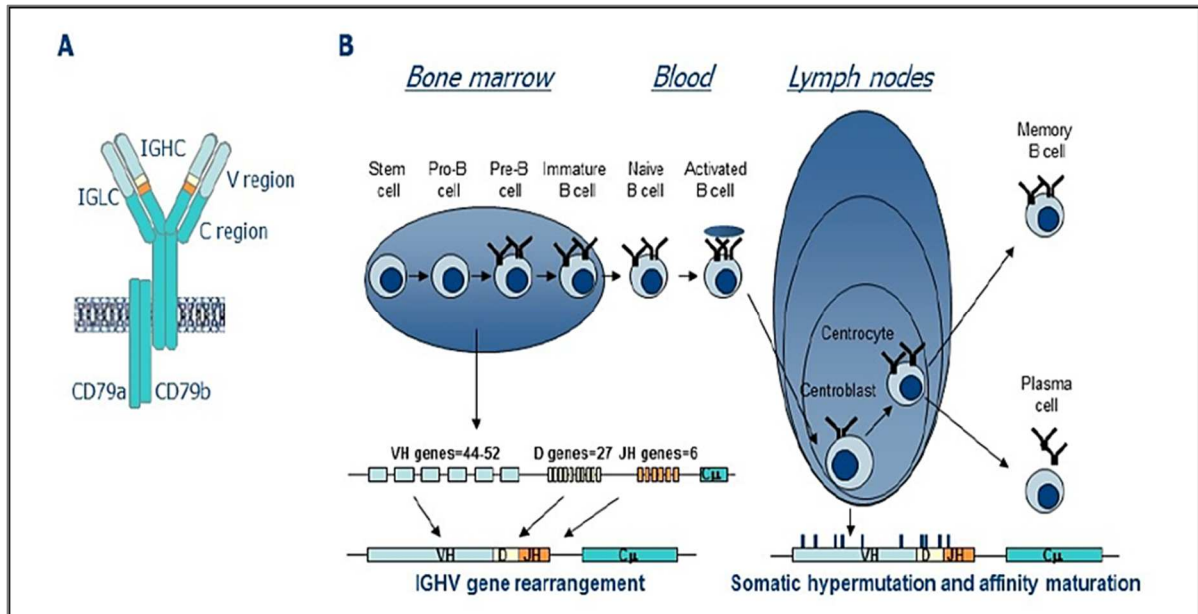
A LLC representa a leucemia mais comum entre adultos nos países ocidentais, representando aproximadamente 25% das leucemias e 25% dos linfomas *não-Hodgkin* (RAI e JAIN, 2016). A taxa de incidência é similar na Europa e EUA e varia entre 4 a 6 casos por 100.000 habitantes por ano. A idade média no diagnóstico situa-se entre 67 e 72 anos. É ligeiramente mais comum em homens do que em mulheres (proporção 1,7:1) e sua incidência aumenta com a idade, portanto a prevalência e a mortalidade da LLC provavelmente aumentarão ainda mais devido às mudanças demográficas na sociedade nas próximas décadas. Além disso, nas últimas décadas, a LLC tem sido frequentemente diagnosticada também em indivíduos jovens, com quase 15% dos pacientes com idade de até 55 anos (MILLER *et al.*, 2016; HALLEK, 2017). A LLC é menos frequente em indivíduos com origem asiática e de países do Oriente Médio (YAMAMOTO e GOODMAN, 2008).

2.1.3 Fisiopatologia

A etiologia da LLC ainda é desconhecida. Genética e fatores ambientais podem ter um papel importante. A baixa incidência de LLC em indivíduos com etnia oriental e a maior incidência (8-10%) nos indivíduos de famílias que possuem outras neoplasias de células B refletem a importância para um potencial fator genético (LANASA, 2010). O desenvolvimento normal do linfócito B engloba diferentes etapas que têm início nos órgãos linfoides primários (medula óssea e timo), com subsequente diferenciação nos tecidos linfoides secundários, tais como linfonodos e baço. Durante esses estágios de desenvolvimento, diversas modificações genéticas ocorrem a fim de formar os receptores e as imunoglobulinas essenciais para uma resposta imune normal. No entanto, essas modificações podem levar à ocorrência de anormalidades que podem originar uma neoplasia (NOGAI *et al.*, 2011). É na medula óssea que as células precursoras hematopoéticas (chamadas de células-tronco ou *stem cells*) recebem sinais de células estromais para que se inicie o desenvolvimento dos progenitores linfoides (CATELAN *et al.*, 2008).

Inicialmente, essas células-tronco programadas para a produção de linfócitos produzem um precursor denominado células pré-B que por indução de citocinas expressam os genes desoxinucleotidiltransferase terminal (TdT) e os genes ativadores da recombinação, *RAG1* e *RAG2*, que comandam a recombinação gênica necessária para a produção de imunoglobulinas. Outros antígenos de membrana como CD22, CD10, CD20 e CD21 e CD5, também aparecem durante a diferenciação do linfócito B (ZAGO *et al.*, 2013). Ainda na medula óssea, nas células pré-B, inicia-se a síntese do gene da cadeia pesada da Ig (μ -um) e dos genes da cadeia leve da Ig (κ , kappa, ou λ lambda). Para que o linfócito progrida para estágio posterior existe a necessidade de uma recombinação aleatória de genes que codifiquem as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas a fim de formar o receptor de células B (BCR) (Figura 1) mediado por um processo chamado recombinação V (D) J. Esse processo envolve quebra do ácido desoxirribonucléico (DNA) e recombinação dos genes *RAG1* e *RAG2* (NOGAI *et al.*, 2011).

Figura 1 - Expressão do BCR durante o desenvolvimento e maturação do linfócito B



Fonte: EFREMOV e LAURENTI, 2014.

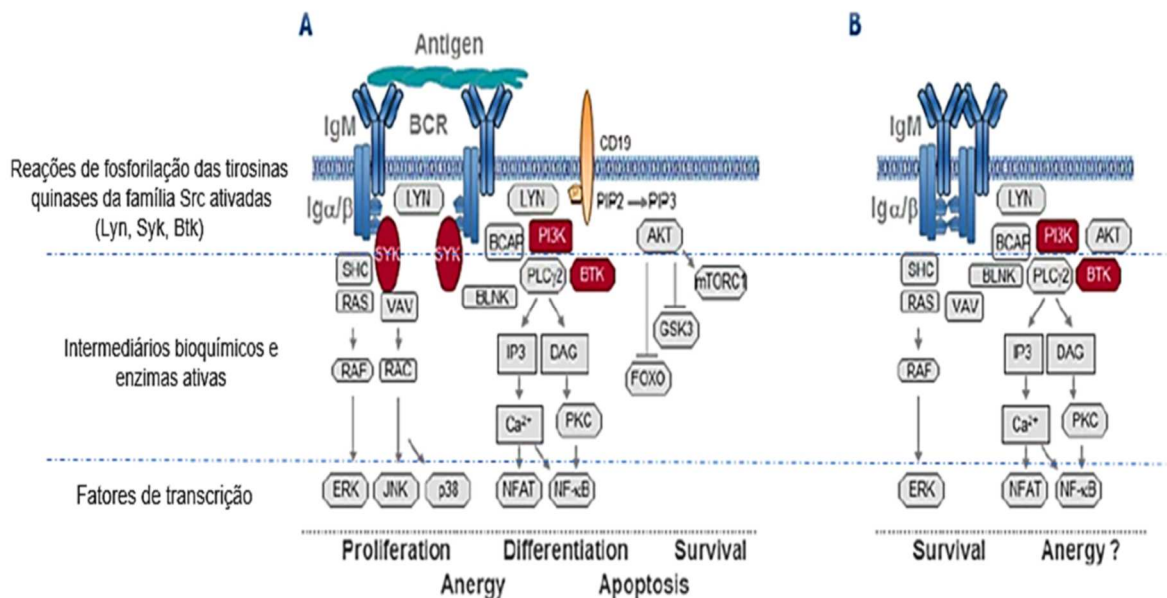
Legenda: A) Estrutura da imunoglobulina composta por: IgHC (cadeia pesada da imunoglobulina) IgLC (cadeia leve da imunoglobulina), região variável (azul claro) e região constante (verde claro) da imunoglobulina. B) Desenvolvimento das células B a partir de *stem cell* na medula óssea, seguido pelo sangue e órgãos linfoides secundários (linfonodos e baço). O rearranjo dos genes da IgVH (região variável da cadeia pesada da imunoglobulina) ocorre no estágio da célula pro-B e posteriormente seguido pelo rearranjo dos genes IgVL (região variável da cadeia leve da imunoglobulina). Após o encontro com antígenos, as células B se estabelecem nos centros germinativos (tecidos linfoides secundários, como linfonodos), onde ocorre a expansão clonal, hipermutação somática e maturação celular.

O rearranjo dos segmentos gênicos da região V (variável), D (diversidade) e J (junção) resulta em uma sequência única de aminoácidos que codifica o domínio de ligação do antígeno ao receptor da célula B (BCR ou IgM), sendo que essa produção do receptor é independente da presença ou influência do antígeno, mas depende do contato com células do estroma medular. O complexo do BCR inclui, além da imunoglobulina de membrana duas cadeias peptídicas, denominadas Iga (CD79a) e Igb (CD79b), que se associam de modo não covalente, e têm a função de dar início à sinalização intracelular após o encontro com o antígeno. O BCR é um regulador-chave do desenvolvimento de células B, sobrevivência, proliferação, diferenciação funcional e migração, além de desempenhar um papel importante na patogênese de várias malignidades da célula B (WIESTNER, 2015).

As células de LLC recebem dois tipos de sinais através do BCR (Figura 2): o primeiro tipo é desencadeado por ligação ao antígeno externo, o que resulta na agregação de BCRs vizinhos (como co-receptores) e subsequente formação de um complexo de sinalização que propaga sinais para o interior da célula, podendo induzir a uma variedade de respostas como proliferação, sobrevivência, diferenciação, anergia ou apoptose. O segundo tipo de sinalização, conhecido como BCR autônomo ocorre na ausência de um dos antígenos externos (EFREMOV e LAURENTI, 2014). A transdução de sinais do BCR envolve uma rede de quinases e moléculas que estimulam respostas intracelulares tais como, tirosina quinase esplênica (Spleen tyrosine kinase (SYK), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a tirosina quinase de Bruton (Btk) (WIESTNER, 2015). As vias de sinalização do BCR contêm vários alvos que estão sendo usados na intervenção terapêutica (RAMSAY e RODRIGUEZ-JUSTO, 2013). Em teoria é possível uma diversidade enorme de combinações diferentes das regiões variáveis das cadeias pesadas e leves, gerando um vasto repertório de possíveis locais de ligação ao antígeno. No entanto, as células da LLC exibem um repertório restrito de possibilidades dessas combinações para a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (IgVH), sugerindo que as células da LLC possuem antígenos distintos de especificidades (WIESTNER, 2015).

Durante este processo, apenas as células que adquiriram genes de regiões variáveis de cadeia leve e pesada que podem ser traduzidas em proteínas sobreviverão, enquanto todas as outras entram em apoptose. Uma vez que o BCR é expresso, os linfócitos deixam a medula óssea e se tornam maduros, denominando-se células B maduras ou linfócito B *naïve* (NOGAI *et al.*, 2011), conforme mostrado na Figura 1. Essas células B que deixaram a medula óssea completam sua maturação nos órgãos linfoides secundários (linfonodos e baço), podendo ser encontradas no sangue e órgãos linfoides periféricos de indivíduos normais, nesse estágio co-expressam as imunoglobulinas de classe IgM e IgD, que são acompanhadas de competência funcional. Por essa razão, essas células são chamadas de células B maduras (CATELAN *et al.*, 2008).

Figura 2 – Vias de sinalização do BCR nas células da LLC



Fonte: Adaptado de EFREMOV e LAURENTI, 2014.

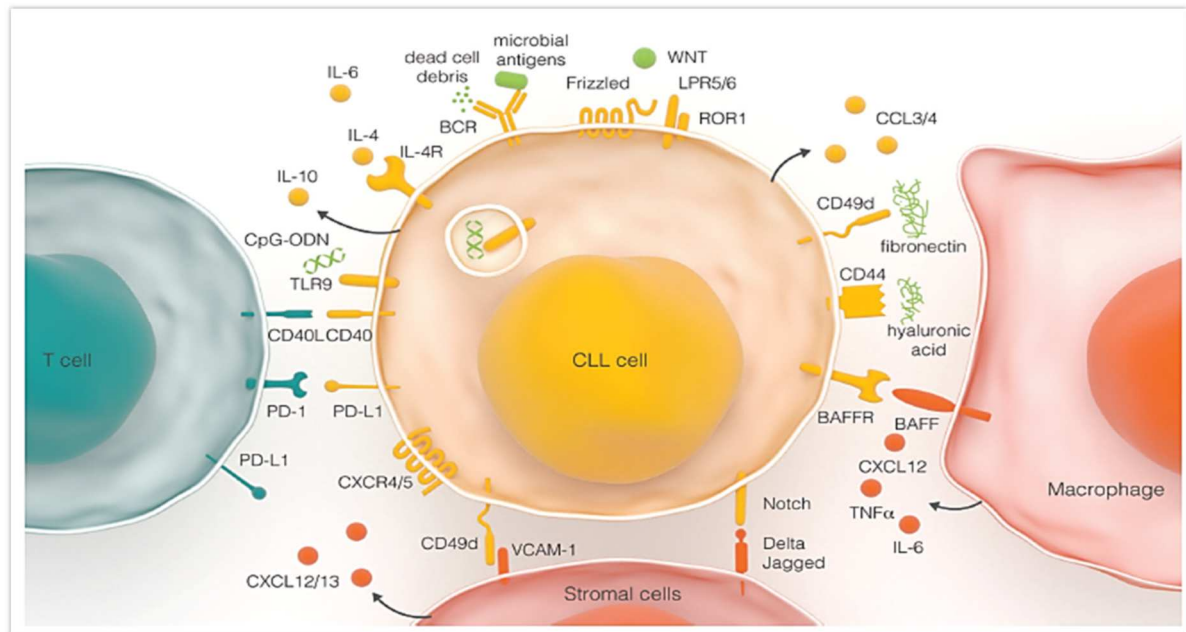
Legenda: A) A agregação do BCR com antígeno externo induz a fosforilação de imunoreceptor baseado em tirosina (ITAM: *Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif*). A fosforilação desses imunoreceptores é mediada por proteínas quinases, como Lyn, Syk e Btk. Os ITAMs possuem resíduos de tirosina que são fosforilados por tirosina quinases, dando início a uma cascata de eventos bioquímicos no citoplasma, que por sua vez, ativa os fatores de transcrição que estimulam a expressão dos genes necessários culminando na ativação da resposta biológica da célula. B) As interações intermoleculares BCR-BCR geram um segundo tipo de sinal em células de LLC. Essa via de transdução ainda não totalmente caracterizada, muitas das moléculas das vias induzidas pelo antígeno externo parecem estar envolvidas. A principal consequência celular desta via parece ser o aumento da sobrevivência das células leucêmicas e uma provável anergia celular. As formas em vermelho das vias são alvos terapêuticos.

Devido a sua progressão clínica relativamente lenta, a LLC é classicamente descrita como uma doença de acumulação e não como de proliferação. As células da LLC “escapam” dos mecanismos apoptóticos, o que representa um obstáculo significativo na superação da resistência clínica para terapias. Dessa forma, há uma acumulação de células B malignas no sangue, na medula óssea, linfonodos e no baço, e a principal causa desse acúmulo pode ser mais atribuída à desregulação da apoptose do que a um aumento na taxa de proliferação, o que parece desempenhar um papel crucial na progressão da doença. No entanto, evidências recentes sugerem que a LLC pode ser mais dinâmica do que se supunha anteriormente, e que a proliferação também pode ser um fator contribuinte para o crescimento dessa neoplasia. As taxas de proliferação e de morte celular (apoptose) diferem consideravelmente entre os pacientes com LLC, sendo o nível do *turnover* celular

importante para a caracterização e progressão da doença nos pacientes com LLC (PODHORECKA *et al.*, 2016).

Células estromais da medula óssea, células derivadas dos monócitos, designadas “*nurse-like cells*” e células T podem regular vias de sobrevivência através da produção de várias quimiocinas ou citocinas, o que pode aumentar a sobrevivência das células na LLC (Figura 3). A proliferação celular é mantida pelo tecido do microambiente tumoral que pode induzir a regulação positiva de proteínas anti-apoptóticas, aumentando desse modo a sobrevivência das células na LLC (TEN HACKEN e BURGER, 2014; SHAHJAHANI *et al.*, 2015). Os linfonodos parecem ser o principal sítio da proliferação da LLC, devido à ativação das vias como o NF- κ B (*factor nuclear kappa B*) e do receptor BCR dessas células comparado com o observado na medula óssea e sangue periférico. As células estromais da medula óssea criam um nicho que protegem as células LLC contra apoptose espontânea e a induzida por drogas. A interação das células da LLC com as *nurse-like cells* é através de vários mecanismos incluindo a secreção de fatores como as quimiocinas CXCL12 e CXCL13 e a expressão de moléculas que protegem as células da LLC da apoptose (FABBRI e DALLA-FAVERA, 2016). Um avanço significativo na compreensão da patogênese molecular da LLC levou a um renovado destaque no papel do microambiente tumoral e do receptor das células B (BCR) (RAMSAY e RODRIGUEZ-JUSTO, 2013). Componentes solúveis, estruturais e celulares do microambiente tissular podem cooperar com o BCR para influenciar a resposta celular (WIESTNER, 2015).

Figura 3 - As células da LLC interagindo com elementos solúveis, estruturais e celulares no microambiente tissular



Fonte: WIESTNER, 2015.

Legenda: Modelo *in vitro*, mostrando possíveis interações entre as células LLC e os componentes do microambiente.

Anormalidades nas vias de apoptose ainda são consideradas como mecanismo crítico do desenvolvimento da doença, além disso, muitas terapias anticancerosas, em particular a quimioterapia, têm a capacidade de induzir apoptose em células-alvo da LLC. Resumidamente oito mecanismos, descritos abaixo, são os responsáveis pela desregulação da apoptose das células na LLC, conforme descrito por Podhorecka *et al.* (PODHORECKA *et al.*, 2016).

1) Interação entre os sinais do microambiente e o receptor de células B: As últimas décadas, apontam que a interação entre receptor células B e microambiente tem importante papel na patogênese da LLC. A evidência do BCR na patogênese da doença é demonstrada pelo fato que o seu estado mutacional é forte fator preditivo do desfecho da doença. O microambiente medular também é muito importante, sendo que a maioria dos eventos proliferativos ocorrem nos gânglios linfáticos e na medula óssea, onde as células neoplásicas recebem sinais por meio de interações com o microambiente que permitem a evasão da apoptose e a aquisição de melhores condições de crescimento (RAMSAY e RODRIGUEZ-JUSTO, 2013). Esses sinais são mediados por uma série de quinases (PODHORECKA *et al.*, 2016) enzimas que catalisam a transferência de um grupo fosfato de um composto de alta energia (em

geral do ATP) para um receptor, moléculas-alvo específicas (substratos), processo esse denominado fosforilação (SILVA *et al.*, 2009).

2) Desregulação da família BCL-2: considerando que a apoptose tem duas vias de ativação a via extrínseca (mediado por receptor) e a via intrínseca (mediada pela mitocôndria) e ambas levam à ativação das caspases, que, por sua vez, leva à morte celular. A via intrínseca é regulada pelas proteínas da família BCL-2 (BILLARD, C. 2014). Essas proteínas regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e podem ter funções pró-apoptóticas (BAX, BAD, BAK e BIM entre outros) e anti-apoptóticas (BCL-2 propriamente dita, BCL-XL, MCL-1) (MURRAY, F.; INSEL, P. A., 2013). A ativação da BCL-2 está correlacionada com a perda de função reguladora dos microRNAs mirR-15a e miR-16-1, bem como a hipometilação do gene promotor BCL-2 (CIMMINO *et al.*, 2005; HANADA *et al.*, 1993). A indução da apoptose é dependente da razão entre BCL-2/BAX, sendo, já bem estabelecido os altos níveis de proteínas anti-apoptóticas BCL-2 nas células da LLC. Além disso, a elevação da BCL-2 está associada a um ineficiente manejo clínico, resistência à quimioterapia e a remissão da doença (TZIFI *et al.*, 2012).

3) Desregulação das proteínas da família TNF: pesquisadores destacaram a importância das proteínas membros da família TNF (Família dos Fatores de Necrose Tumoral), como BAFF (fator ativador de célula B - *B-cell activation factor*), APRIL (ligante indutor de proliferação - *A Proliferation Inducing Ligand*), TACI (*transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand-interactor*) e BAFF-R (receptor BAFF) na inibição da apoptose das células na LLC. As proteínas da família TNF são ativadoras das vias do receptor das células B, sendo moléculas críticas para sobrevivência e proliferação das células B (KERN *et al.*, 2004).

4) Desregulação das proteínas da família NF- κ B: a capacidade do NF- κ B (fator nuclear kappa B) de inibir a apoptose e induzir a proliferação celular sugere que ele pode ser um fator muito importante na oncogênese e progressão tumoral em numerosas doenças neoplásicas como a LLC. O NF- κ B está associado com a transcrição de vários genes anti-apoptóticos, como a família BCL-2. Nas células da LLC altos níveis de NF- κ B têm sido encontrados em comparação com as células normais (TZIFI *et al.*, 2012; BILLARD, C. 2014).

5) Vias PI3K-PKC-AKT: As isoenzimas da PKC (proteína quinase C) desempenham um papel na proliferação celular, sobrevivência, apoptose, angiogênese e também na resistência ao tratamento usado na LLC. Tem sido descrito que PI3K (fosfatidilinositol-

3-quinase) e PKC podem ativar AKT (serina-treonina quinase) contribuindo para o aumento da sobrevivência e redução do apoptose nas células da LLC (BARRAGÁN, *et al.*, 2002).

6) Desregulação da função da proteína p53: Entre as anormalidades citogenéticas das células da LLC, uma das mais importantes para a inibição da apoptose parece ser aquela que afeta a função do regulador do ciclo celular p53 (fosfoproteína nuclear de 53 kD). O gene supressor de tumor *TP53* (tumor protein 53), que codifica a proteína p53, está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1). Pacientes com LLC em curso de diagnóstico mostram aproximadamente cerca de 5-7% dessa supressão da TP53 e aqueles com doença progressiva e refratária possuem esta eliminação em torno de 25-40% (LE GARFF-TAVERNIER, M. *et al.*, 2011).

7) PD-1 e seus ligantes: A proteína de morte celular programada 1, também conhecida como PD-1, é um imunoreceptor expresso pelas células T e atua como um regulador negativo do sistema imunológico através de uma interação com o seu ligante (PD-L1). Esta proteína possui função inibitória em linfócitos T e linfócitos B, sendo importante na tolerância periférica. PD-1 é expresso na maioria dos linfócitos T e num pequeno subconjunto de linfócitos B. O PD-1 encontrado em células da LLC pode representar uma nova molécula envolvida no mecanismo da doença e poderá fornecer um novo alvo para a terapia como também marcador de prognóstico. Suprimindo a função das células T, a interação PD-1 e PD-L1 pode diminuir a apoptose das células leucêmicas, eliminando um mecanismo de defesa contra desordens neoplásicas (MUENST, S. *et al.*, 2010).

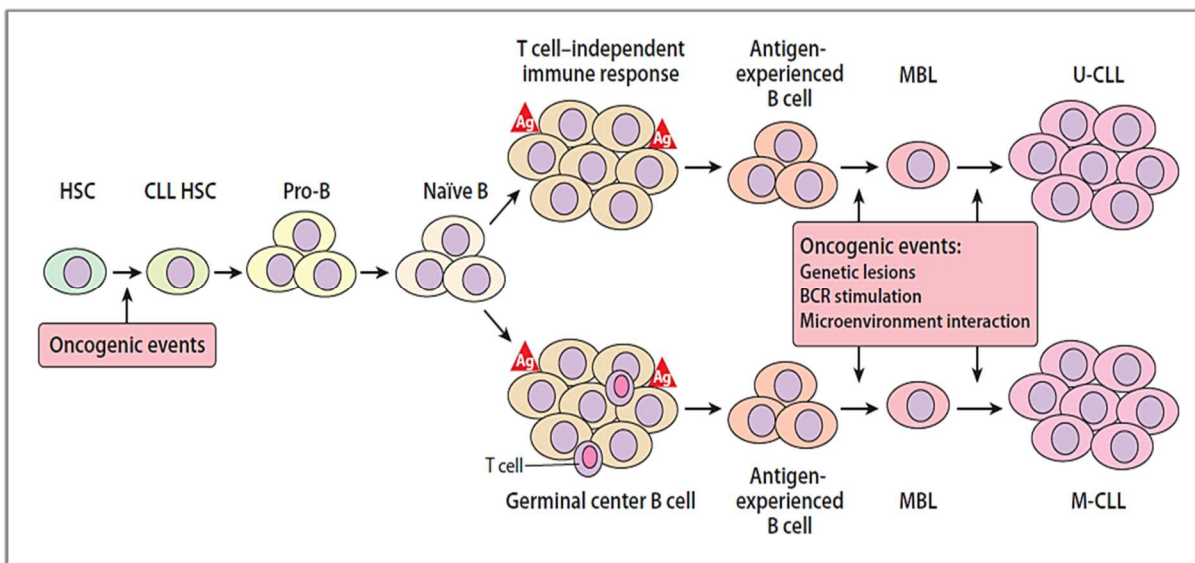
8) Via AMPc: O AMPc (3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico) é um segundo mensageiro intracelular importante em muitos processos biológicos. O nível aumentado de AMPc induz a apoptose em vários casos de células malignas, tais como as células de LLC (GRZYWNOWICZ *et al.*, 2012)

Como os níveis de AMPc em células normais do sangue periférico são mais elevados do que nas células da LLC, estudos sugerem um defeito nessa via, embora mais pesquisas ainda sejam necessárias para o seu entendimento. Por outro lado, agentes terapêuticos como glicorticóides e clorambucil matam as células de LLC por aumento intracelular de AMPc (MURRAY, F. & INSEL, P.A., 2013).

Conforme apresentado anteriormente a patogênese da LLC é um processo de múltiplas etapas, que consiste em várias fases distintas que se caracterizam pela aquisição de defeitos genéticos específicos, que cooperam com diversos sinais

microambientais para impulsionar a expansão dos clones leucêmicos, conforme demonstrado na Figura 4. O defeito genético primário provavelmente reside no nível da célula-tronco hematopoiética (*stem cell*) e representa uma predisposição genética hereditária ou uma lesão genética adquirida, com ganho em seguida de mais de lesões genéticas como deleção do del13q14 e mutações em NOTCH1, SF3B1, BIRC3, TP53 e ATM favorecem para a progressão da LLC (EFREMOV e LAURENTI, 2014).

Figura 4 - Modelo de desenvolvimento das células na LLC



Fonte: ZHANG e KIPPS, 2014.

Legenda: Mutações que contribuem para o desenvolvimento da LLC podem ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento de células B, incluindo as células hematopoiéticas *stem cells*. *Stem cells* portadoras de mutações oncogênicas podem dar origem a células B com algumas vantagens no seu crescimento e sobrevivência. As células B (precursor *naïve*) entrarão no centro germinativo no nódulo linfático onde serão submetidas à apresentação do antígeno dependente das células T, ou entrarão na zona marginal do centro germinativo onde se submetem à apresentação de antígenos independente de células T. As células de LLC que têm mutações na cadeia pesada da imunoglobulina são definidas como LLC-mutadas enquanto que as células B que não sofreram mutações somáticas na região variável da cadeia pesada da imunoglobulina são definidas com LLC não-mutadas. A expansão do clone LLC (ou MBL) está associada à acumulação de lesões genéticas adicionais assim como interações contínuas com células e antígenos do microambiente. Abreviações: HSC: célula-tronco hematopoiética; Ag: Antígeno; MBL: linfocitose B monoclonal; U-CCL: IgVH não mutado; M-CCL: IgVH mutado

2.1.4 Quadro clínico

A LLC é identificada em um exame de sangue (hemograma) de rotina e sua apresentação clínica no diagnóstico é bastante variável, com aproximadamente 60% dos pacientes são assintomáticos. Nos pacientes sintomáticos, os achados mais comuns são a linfadenopatia generalizada, perda de peso e cansaço. Os gânglios são geralmente pequenos, mas podem ser muito volumosos (ZAGO *et al.*, 2013;

RODRIGUES *et al.*, 2016). A esplenomegalia e, menos frequente, a hepatomegalia são usuais em estágios tardios. A imunossupressão, resultante de hipogamaglobulinemia e disfunção da imunidade celular, é um problema significativo na LLC existindo uma maior vulnerabilidade para infecções, explicada por defeitos imunológicos na imunidade humoral e mediada por células. No início da doença predominam infecções bacterianas; na doença avançada, surgem infecções fúngicas e virais, como herpes-zóster (HOFFBRAND E MOSS, 2012). O avanço da doença é frequentemente caracterizado por complicações infecciosas, representando a principal causa de mortalidade. As infecções bacterianas são comuns, mesmo antes do tratamento e os agentes mais frequentes são *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. Sintomas e sinais de anemia podem estar presentes, já petéquias e quimoses por trombocitopenia são poucos frequentes. A LLC é associada com manifestações autoimunes, na maioria dos casos diretamente direcionadas às células hematopoéticas. Anemia e trombocitopenia podem ser observada em 15-30% dos pacientes. A anemia hemolítica autoimune é a mais frequente seguida pela trombocitopenia imune. Deve-se notar que autoanticorpos contra glóbulos vermelhos ou antígenos das plaquetas são sintetizados por clones não-malignos de células B, e têm sido relacionados a uma profunda desregulação do sistema imunológico devido à LLC (RODRIGUES *et al.*, 2016; SCARFO *et al.*, 2016). Durante a evolução da doença, de 3% a 15% dos casos podem ocasionar a Síndrome de Richter, caracterizada, na maioria das vezes, pelo aparecimento de um linfoma difuso de grandes células, podendo manifestar-se por febre, emagrecimento, sudorese, aumento de linfadenopatia, anemia, trombocitopenia e gamopatia monoclonal. O prognóstico da Síndrome de Richter é pessimista, com sobrevida mediana de seis meses. Em 1% dos casos ocorre evolução para linfoma de Hodgkin. Em 1% das LLC, ocorre o aparecimento de leucemias agudas, mieloides ou linfoides, que parecem estar associadas ao tratamento (ZAGO *et al.*, 2013).

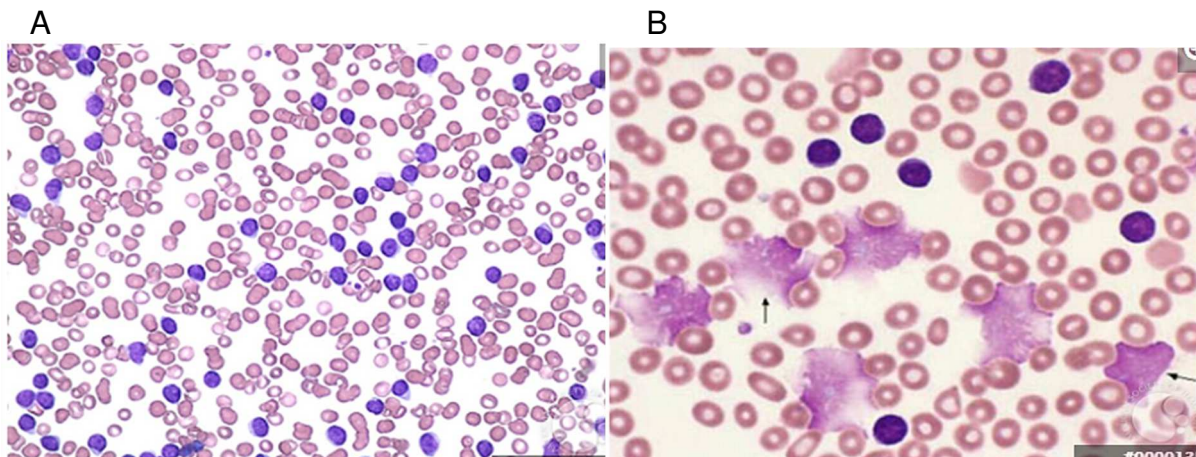
2.1.5 Achados Laboratoriais

O achado hematológico característico da LLC é a linfocitose persistente, detectada no exame de hemograma. São linfócitos pequenos, com núcleo redondo, cromatina densa e citoplasma escasso. É frequente a presença no hemograma de

restos nucleares (também chamados de manchas de *Gumprecht*), que ocorrem devido à fragilidade da membrana celular levando à ruptura da célula durante a execução do esfregaço sanguíneo (ZAGO *et al.*, 2013; SCARFO *et al.*, 2016). De acordo com *International Working Group of CLL* (IWCLL) o critério para diagnóstico da LLC é a contagem de linfócitos no sangue periférico $\geq 5000/\text{mm}^3$ por mais de três meses e $\leq 55\%$ de prolinfócitos (RAI e JAIN, 2016). Na revisão da classificação das leucemias (OMS-2016), foi recomendada uma distinção entre linfocitose monoclonal B com baixa contagem de linfócitos no sangue periférico ($< 0,5 \times 10^9/\text{L}$) e da alta contagem ($> 0,5 \times 10^9/\text{L}$), porque a baixa contagem tem pouca probabilidade de progredir para LLC, enquanto que a alta contagem pode progredir em uma taxa de 1-2% por ano. A incidência de linfocitose monoclonal B pode atingir até 12% na população saudável, podendo variar dependendo da sensibilidade do método de diagnóstico (RODRIGUES *et al.*, 2016).

A presença maciça de linfócitos maduros no sangue periférico pode ser facilmente visualizada em esfregaços sanguíneos (Figura 5).

Figura 5 - Distensão sanguínea do sangue periférico de paciente com Leucemia Linfocítica Crônica



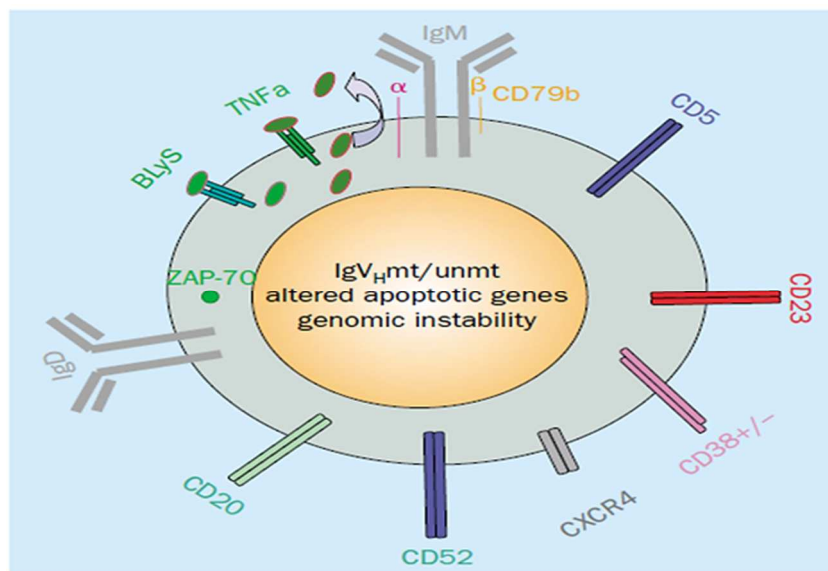
Fonte: ASH Image Bank, American Society of Hematology. Disponível em: <http://imagebank.hematology.org/>. Acesso em: 14 de janeiro de 2018.

Legenda: A) Mostrando vários linfócitos maduros. B) Presença de Manchas de *Gumprecht*.

A imunofenotipagem dos linfócitos por citometria de fluxo mostra que as células leucêmicas de LLC apresentam co-expressão de antígenos de células T (CD5), e células B (CD19, CD20 e CD23) em sua superfície, baixos níveis de imunoglobulinas de superfície (slg) e CD79b e restrição para cadeias leves, com baixo nível de

expressão para cadeia Kappa e Lambda (Figura 6). O uso desses marcadores (CD5, CD19, CD20, CD23) é necessário para o diagnóstico diferencial com outros distúrbios linfoproliferativos de células B, em particular para excluir o diagnóstico de linfoma de células do manto, que é positivo para CD5, mas negativo para CD23. Recentemente, o CD200 também tem sido usado para diagnóstico diferencial entre LLC e outras doenças linfoproliferativas como a Linfoma de Células do Manto (LCM), sendo expresso na LLC e ausente na LCM. As células LLC usualmente são negativas para FMC7 (SCARFO *et al.*, 2016).

Figura 6 - Representação esquemática do fenótipo do linfócito B na LLC



Fonte: (GUIPAUD *et al.*, 2003).

Legenda: As células leucêmicas expressam CD5, CD52, CD20 e CD23. IgM e IgD são fracamente expressas e nenhuma expressão de CD79b. Na maioria dos casos a ZAP-70 é expressa de forma mais intensa na maioria dos linfócitos na LLC em que a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (IgVH) não está mutada. Paciente com alta expressão de CD38 ($\geq 30\%$) e imunoglobulina (IgVH) não mutada respondem pior a regime contínuo de tratamento e com curso clínico mais agressivo da doença.

A avaliação diagnóstica através da imunofenotipagem é de fundamental importância para o diagnóstico laboratorial diferencial entre a LLC e outras neoplasias linfoproliferativas. Matutes *et al.* 1994, propuseram um sistema de pontuação (escore de Matutes) para diagnóstico da LLC baseado na avaliação de cinco parâmetros: CD5+(1 ponto), CD23+(1 ponto), FMC7 negativo (1ponto), fraca intensidade cadeias kappa/lambda (1 ponto) e fraca ou negativo CD22/CD79b (1 ponto). E correspondente a zero (pontos) se for CD5 negativo, CD23 negativo, CD22

moderado ou forte e FMC7 negativo (Tabela 3). O escore varia entre 5 (caso típico de LLC) e 3 (caso menos típico de LLC), escores entre 0-2 excluem diagnóstico de LLC (MATUTES *et al.*, 1994; RODRIGUES *et al.*, 2016; KOHNKE *et al.*, 2017).

Tabela 3 - Sistema de escore de Matutes para pontuação do diagnóstico da LLC

Antígenos/ Pontuação	0	1
CD5	Negativo	Positivo
CD23	Negativo	Positivo
CD79b/ CD22	Positivo	Fraco/Negativo
FMC7	Negativo	Negativo
Igs	Positivo	Fraco/Negativo

Fonte: Adaptado MATUTES *et al.*, 1994; RODRIGUES *et al.*, 2016.

Legenda: O escore total é obtido pela soma dos pontos e varia de zero a 5.

Além da citometria de fluxo, a investigação laboratorial inicial dos pacientes pode incluir a avaliação do estado mutacional dos genes de região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (IgVH), ZAP-70 (*Zeta-Associated Protein 70*), CD38, beta-2-microglobulina, níveis séricos de imunoglobulinas, *coombs* direto e análise de FISH (Hibridação *in situ* por Fluorescência) no sangue periférico ou na medula óssea (RAI e JAIN, 2016). A medula óssea está infiltrada por mais de 30% de linfócitos maduros, não sendo este exame requisito para diagnóstico, mas é importante para casos com citopenias persistentes (HALLEK *et al.*, 2008). Técnicas de imagem como ultrassom, tomografia e ressonância magnética não são recomendadas como rotina para diagnóstico ou estadiamento clínico da LLC (RODRIGUES *et al.*, 2016).

2.1.6 Sistemas de estadiamento

Os sistemas de estadiamento baseiam-se nas características clínicas e hematológicas e levam em conta a história natural da doença, que é resultante do acúmulo progressivo de células leucêmicas nos gânglios, medula óssea, baço e fígado. Esses sistemas definem subgrupos de doentes que apresentam sobrevidas diferentes e são fundamentais para as decisões terapêuticas. Dois sistemas de estadiamento clínico Rai (Americano) e Binet (Europeu) foram introduzidos na década de 1970 e ainda são amplamente utilizados (Tabela 4). Estes sistemas definem estágios precoce (Rai 0, Binet A), intermediário (Rai I/II, Binet B) e avançado (Rai III/IV, Binet C), com sobrevida, respectivamente: > 10 anos, 5-7 anos e 1-3 anos (GONÇALVES *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2016).

Tabela 4 - Sistema de estadiamento Binet e Rai

	Estádios de Binet	Estádios de Rai	Sobrevivência média
Baixo Risco	A Hb \geq 10 g/dL Plaquetas \geq 100X10 ³ / μ L \leq 2 áreas envolvidas ^a	0 Linfocitose no sangue e medula óssea	> 10 anos
Risco Intermediário	B Hb \geq 10 g/dL Plaquetas \geq 100X10 ³ / μ L \geq 3 áreas envolvidas	I Linfocitose + linfadenopatia II Linfocitose + esplenomegalia e/ou hepatomegalia	5 a 7 anos
Alto Risco	C Hb < 10 g/dL Plaquetas < 100 x 10 ³ / μ L	III Linfocitose + Hb < 11 g/dL IV Linfocitose + Plaquetas < 100X10 ³ / μ L	1 a 3 anos

Fonte: GONÇALVES *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2016.

Legenda: ^a Áreas envolvidas são fígado, baço e gânglios linfáticos (unilateral ou bilateral) nas regiões inguinal, axilar e cervical.

2.1.7 Fatores de prognóstico

O curso clínico dos pacientes com LLC é extremamente heterogêneo porque os dados para definição da sobrevivência média dos pacientes, não conseguem capturar a variedade clínica da doença, pois a sobrevivência de cada paciente pode variar de alguns meses a décadas. Alguns pacientes do grupo de baixo risco (Rai 0 e Binet A) podem, no entanto, apresentar progressão rápida da doença, enquanto outros permanecem em condição de doença estável por muitos anos. Dessa forma, além do estadiamento clínico, fatores prognósticos foram pesquisados na tentativa de

prever a evolução da doença. Os fatores de prognóstico tradicionais incluem estágio clínico do paciente, contagem de linfócitos, o padrão de infiltração da medula óssea, tempo de duplicação do número de linfócitos no sangue periférico. Marcadores séricos, como beta 2-microglobulina, CD23, desidrogenase láctica, estado mutacional do IgVH, expressão da ZAP-70 e CD38, também têm valor prognóstico (CHIORAZZI *et al.*, 2005; STILGENBAUER, 2015).

A ausência de mutações genéticas nas regiões variáveis da cadeia pesada da imunoglobulina (LLC- não mutada, em torno de 40% dos pacientes) está relacionada a um curso clínico mais agressivo (pior prognóstico) e a presença de mutações na (LLC-mutada em torno de 60% dos pacientes) está relacionada a um curso clínico indolente (bom prognóstico). As células mutadas (LLC-mutadas) parecem ficar anérgicas, hiporresponsivas à ativação do BCR, ao contrário das células não mutadas (LLC-não mutadas) que possivelmente ficam mais responsivas ao estímulo do BCR e expressando níveis mais altos de ZAP70 e CD38 (TEN HACKEN e BURGER, 2014; WIESTNER, 2015; FABBRI e DALLA-FAVERA, 2016).

Nos últimos anos, novos fatores de prognóstico foram identificados, sendo marcadores biológicos que permitem a estratificação de risco dos pacientes no diagnóstico e atualmente são utilizados na prática clínica. Através da técnica de FISH alterações citogenéticas foram encontradas em 80% dos casos de LLC, sendo as mais comuns: deleção 13q (del(13q14)) em 55% dos casos, deleção do 11q em torno de 25% dos casos, trissomia do 12 (10-20 % casos) e deleção 17p (incluindo a banda 17p13, onde gene supressor TP53 está localizado) em torno de 10% dos casos. Essas anormalidades podem coexistir ou ocorrer sozinhas no momento do diagnóstico e estão associadas ao curso clínico da doença (RAI e JAIN, 2016; HALLEK, 2017).

Mutações da TP53 são encontradas em 4-37% dos pacientes com LLC, e no grupo dos pacientes não tratados podem ser esperados mutações TP53 em torno de 10%, lembrando que a presença da mutação tem sido associada com pior prognóstico bem como uma maior resistência ao tratamento. O TP53 é um gene supressor tumoral localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e codifica uma proteína (p53) com papel importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução da apoptose (Zenz *et al.*, 2010). Nos últimos anos, as melhorias nas tecnologias como o sequenciamento de nova geração (NGS) permitiu uma inovadora abordagem para examinar o genoma da LLC e identificar alterações genômicas que estão envolvidas em vias celulares críticas tais como: danos ao DNA e controle do ciclo celular (TP53,

ATM, BIRC3); processamento do mRNA (SF3B1); sinalização NOTCH (NOTCH1) e vias inflamatórias (MYD88) (SCARFO *et al.*, 2016).

O campo de estudo sobre a Leucemia Linfocítica Crônica tem testemunhado mudanças consideráveis desde o momento em que o estadiamento clínico foi introduzido na prática clínica em 1975. Em recente revisão sobre a LLC *Rai e Jain*, 2016 (RAI e JAIN, 2016) descreveram uma lista de marcadores para o prognóstico da doença como os “antigos marcadores” e a expansão para os “atuais marcadores” (Tabela 5).

Tabela 5 - Lista dos ‘antigos’ e ‘atuais’ marcadores de prognóstico da LLC

‘Antigos marcadores’	Predição para pior prognóstico
Estadiamento clínico –Rai ou Binet	Estágio clínico avançado
Tempo duplicação linfócitos	Curto < 6 meses
Infiltração da medula óssea	Padrão difuso de infiltração
Expressão CD38	Alta expressão ≥ 30%
Expressão ZAP70	Alta expressão ≥ 20%
Mutação da IgVH	Estado “não mutado” curso agressivo doença
B2 microglobulina sérica	Elevada (≥ 3,5 mg/L)
Timidina quinase sérica	Elevada (>10 U/ L)
Citogenética (FISH)	Del17p, del11q
‘Atuais marcadores’	
Padrão do BCR ou Estereótipo do BCR	Subconjuntos específicos de mutações região variável cadeia pesada (gene VH4-39)
Mutações genes	TP53, NOTCH1, BIRC3, SF3B1 ou ATM
microRNA (miR) 155	Pior resposta e progressão da doença
Expressão de CD49d	Alta (≥ 30%)
Níveis séricos de CCL3 e CCL4	Níveis elevados com avanço da doença
Avaliação da doença residual mínima (DRM)	Presença da doença

Fonte: Adaptado RAI e JAIN, 2016.

2.1.8 Tratamento

A decisão de iniciar o tratamento depende da presença ativa dos sintomas da doença. Pacientes assintomáticos (Rai 0, Binet A), poderão apenas ser observados sem intervenção terapêutica a menos que tenham evidências de progressão rápida da doença. Quando os pacientes apresentam progressão da doença e manifestações clínicas importantes (anemia, trombocitopenia, linfocitose progressiva, perda peso, fadiga, febre, sudorese noturna e infecções) o tratamento deve ser iniciado (HALLEK, 2017). Além do estágio clínico, há outros parâmetros que devem ser observados antes de se iniciar o tratamento como: saúde geral do paciente, fatores genéticos e situação do tratamento (primeira linha vs. segunda linha, resposta vs. não resposta) (GHIA

HALLEK, 2014). A LLC é uma doença incurável quando tratada por imunoterapia e o transplante alogênico é a única alternativa de cura, mas está associado a alta mortalidade (GRIBBEN, 2008). Várias opções terapêuticas são utilizadas como os corticóides, agentes alquilantes; análogos das purinas, quimioterapia combinada, anticorpos monoclonais e transplante de medula (Tabela 6). Como a LLC geralmente não é considerada uma doença curável, novos estudos e novas combinações de drogas são necessários para individualizar o tratamento de pacientes com comorbidades específicas ou leucemia refratária (GOMES *et al.*, 2018).

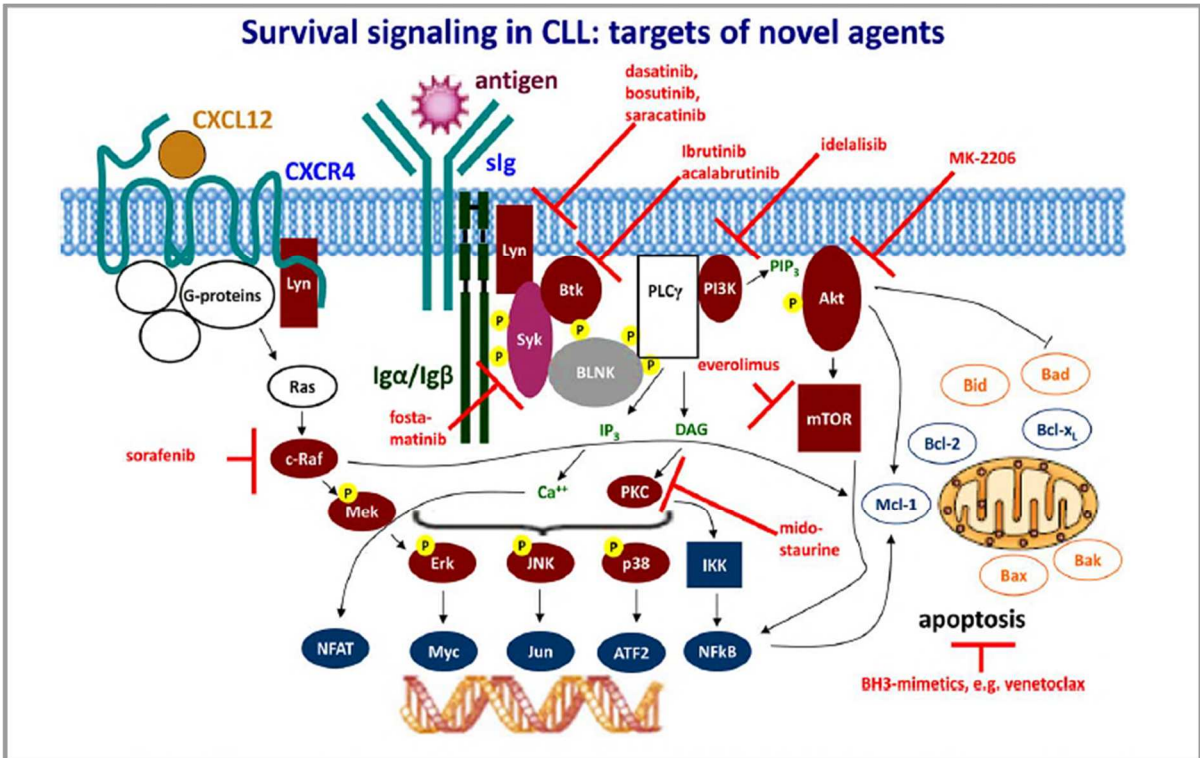
Nos últimos anos com uma melhor compreensão da biologia da LLC, houve um progresso considerável no tratamento. Vários novos medicamentos foram aprovados com diferentes mecanismos de ação (Figura 7) e alguns avanços mais relevantes no tratamento da LLC tem sido alcançados pelo uso combinado de diferentes quimioterápicos (GHIA e HALLEK, 2014; HALLEK, 2017).

Tabela 6 - Categoria das drogas e alvos terapêuticos usados na LLC

Droga	Categoria	Alvo
Clorambucil	Agente alquilante	Citotoxicidade celular
Ciclofosfamida	Agente alquilante	Citotoxicidade celular
Bendamustina	Agente alquilante	Danos no DNA e ponto de checagem da mitose
Fludarabina	Análogos de purinas	Inibição da síntese de DNA
Rituximabe	Anticorpo monoclonal	Anti-CD20
Ofatumumabe	Anticorpo monoclonal	Anti-CD20
Obinutuzumabe	Anticorpo monoclonal	Anti-CD20
Alemtuzumabe	Anticorpo monoclonal	Anti-CD20
Ibrutinibe	Inibidor de sinalização do BCR	Inibição da enzima Tirosina Quinase de Bruton (Btk)
Idelalisib	Inibidor de sinalização do BCR	Inibição da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)
Duvelisibe	Inibidor de sinalização do BCR	Inibição da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)
Fostamatinib	Inibidor de sinalização do BCR	Inibição da tirosina quinase esplênica (SYK)
Gefitinibe	Inibidor de sinalização do BCR	Inibição da tirosina quinase esplênica (SYK)
Danazol	Inibidor de Bcl-2	Inibição da Bcl-2 e Bcl-xL
Obatoclax	Inibidor de Bcl-2	Atividade anti-apoptótica da família Bcl-2
Venetoclax	Inibidor de Bcl-2	Inibição da Bcl-2 e Bcl-xL

Fonte: Adaptado de GOMES *et al.*, 2018.

Figura 7 - Vias de sinalização dos alvos terapêuticos no tratamento da LLC



Fonte: HALLEK, 2017.

Legenda: Os símbolos vermelhos indicam alvo terapêutico.

2.2 Síndrome Mielodisplásica

2.2.1 Definição

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) representam a mais comum classe de síndromes de falência da medula óssea presente em adultos (BEJAR e STEENSMA, 2014). As SMD compreendem uma desordem clonal neoplásica das células precursoras hematopoéticas (*stem cell*, células-tronco) que retêm a capacidade de se diferenciar em células maduras, mas o fazem de forma desordenada e ineficaz. Uma característica fundamental da doença é a proliferação e apoptose simultâneas de células hematopoéticas (hematopoese ineficaz), provocando o paradoxo de medula óssea hiperclular com pancitopenia no sangue periférico. A hematopoese é ineficaz devido a alterações de proliferação, maturação e apoptose das células hematopoéticas, causadas por variadas alterações genéticas e epigenéticas. As características das SMD são hematopoese displásica, citopenias periféricas e risco de progressão para leucemia aguda. Na maioria dos casos, a doença é primária (de novo), mas em alguns pacientes é secundária à quimioterapia e/ou radioterapia anteriormente utilizadas no tratamento de outra doença maligna (HOFFBRAND e MOSS, 2012; MAIOLI e DE SOUZA, 2012; CARVALHOSA e KILLICK, 2017).

2.2.2 Epidemiologia

A Síndrome Mielodisplásica ocorre geralmente em idosos, 85% dos casos são diagnosticados após 60 anos de idade, sendo que a idade média do diagnóstico é de 76 anos. A SMD também é reconhecida como causa da insuficiência da medula óssea em paciente pediátricos (NYBAKKEN e BAGG, 2014). Nos Estados Unidos a incidência é de aproximadamente 3-4 casos por 100.000 habitantes por ano, aumentando para cerca de 30 casos por 100.000 habitantes / ano em pacientes acima dos 70 anos de idade (GANGAT *et al.*, 2016). No Brasil não há registros muito abrangentes, mas é seguro que a incidência também aumenta com a idade. Assim, o aumento da expectativa de vida, inclusive no Brasil, tem levado a um aumento da incidência de SMD (FRIZZO *et al.*, 2016). Contudo, um estudo realizado na América do Sul em pacientes com SMD, Argentina (n=635), Brasil (n=345) e Chile (n=100),

determinou uma mediana de idade de 68 anos e com discreto predomínio no sexo masculino para os pacientes brasileiros (BELLI *et al.*, 2015).

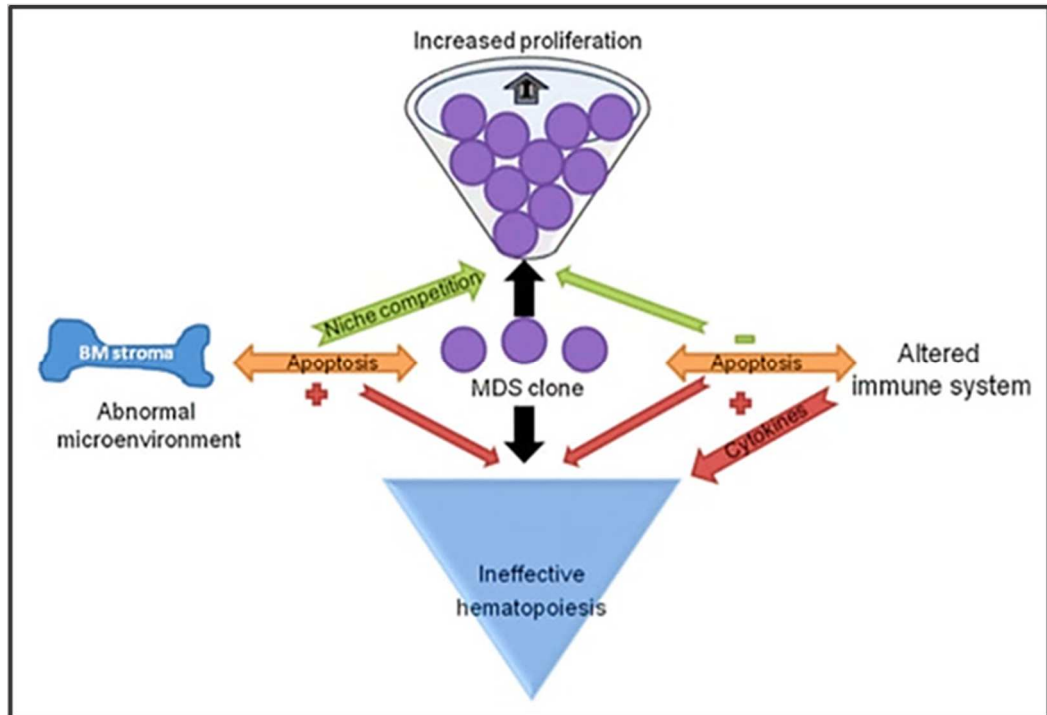
A taxa de incidência em homens é maior do que em mulheres (4.5 vs 2.7 por 100.000/ ano), e os indivíduos brancos têm uma taxa de incidência maior do que outros grupos raciais / étnicos (MA *et al.*, 2007). A Síndrome Mielodisplásica é extremamente rara na infância e representa menos de 5% de todas as neoplasias hematopoiéticas em crianças menores de 14 anos de idade, ainda que tenha incidência maior em crianças com Síndrome de Down (CHATTERJEE e CHOUDHRY, 2013). Pacientes com SMD mostram frequente progressão (aproximadamente 40% dos casos) à leucemia mieloide aguda (PELLAGATTI e BOULTWOOD, 2015).

De acordo com a revisão da OMS em 2016 para a classificação das neoplasias mieloide e leucemias agudas, os termos como "anemia refratária" e "citopenia refratária foram substituídos por "Síndrome Mielodisplásica - displasia de uma única/múltipla linhagem em adultos (LIANG *et al.*, 2018).

2.2.3 Fisiopatologia

A patogênese das SMD ainda é pouco compreendida, uma vez que há participação de um complexo de eventos anormais. Mas presume-se que se inicie com a ocorrência de dano genético na célula-tronco hematopoiética primitiva. A iniciação da mutação ou da via molecular ainda são desconhecidas. Uma sequência de alterações genéticas adquiridas resulta no desenvolvimento de um clone anômalo e geneticamente instável de *stem cells*. Este clone anômalo apresenta alterações de proliferação e maturação, com aumento da apoptose, responsável pelas citopenias nos estágios iniciais da doença. A apoptose decresce e a proliferação aumenta, à medida que a SMD evolui para fases mais avançadas e para a transformação leucêmica devido à instabilidade genômica e lesões genéticas adicionais, Figura 8. A hematopoese ineficaz na SMD tem sido atribuída a uma susceptibilidade anormal a apoptose das células progenitoras e a uma capacidade limitada de resposta dessas células aos fatores de crescimento. Acredita-se que resultam a partir da sinalização anormal dos sinais pró-apoptóticos, de um excesso de citocinas pró-inflamatórias e de alterações na resposta imune das células T (TEFFERI e VARDIMAN, 2009; VASSALLO e MAGALHÃES, 2009).

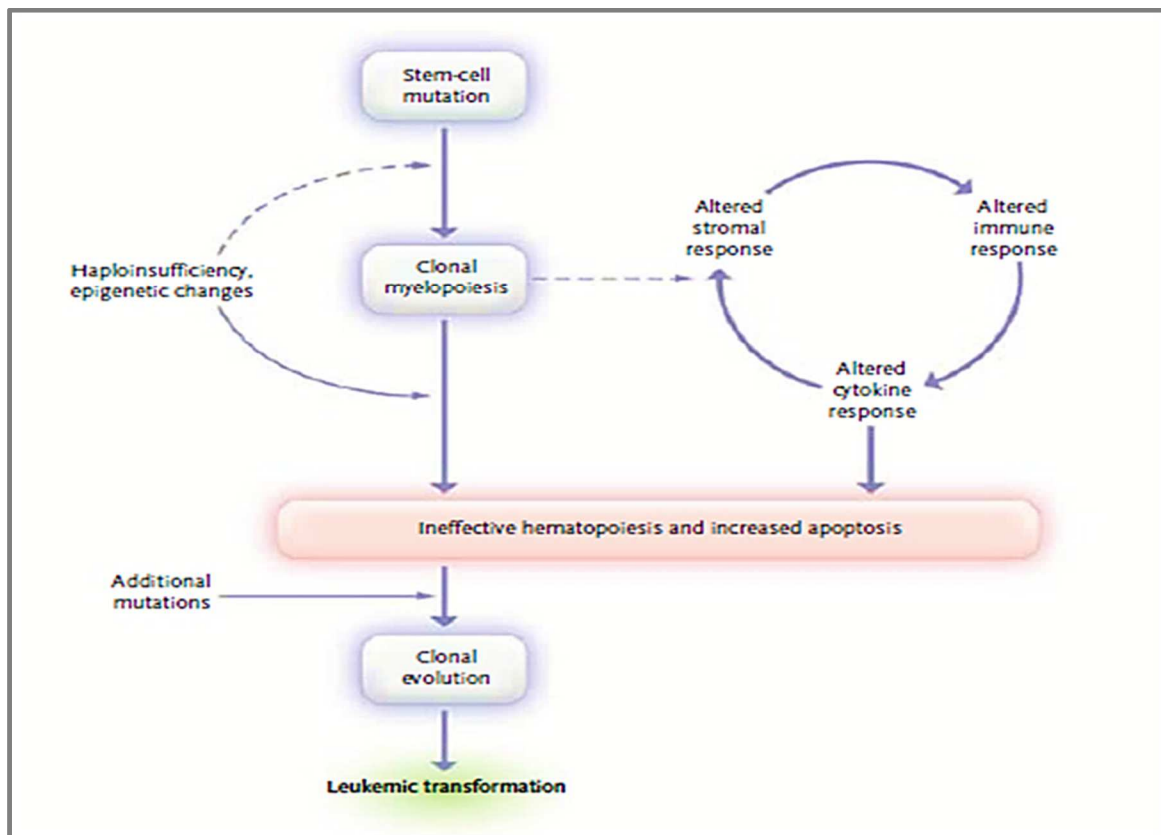
Figura 8 - Modelo animal da patogênese da SMD



Fonte: <https://www.creative-animodel.com/Animal-Model-Development>. Acesso em: 04 janeiro de 2018.

Além das anormalidades genéticas com a célula progenitora, mutações secundárias, mudanças epigenéticas, alterações na resposta de citocinas, sistema imunológico e estroma medular também contribuem para fenótipo da doença, figura 9. A falência medular e citopenias periféricas comuns nas diversas formas de SMD, a proliferação clonal de progenitores hematopoiéticos associada a mutações genéticas hereditárias ou adquiridas e o silenciamento de genes por modificações epigenéticas também podem estar presente.

Figura 9 - Principais mecanismos patogênicos envolvidos na SMD



Fonte: TEFFERI e VARDIMAN, 2009.

Legenda: As Síndromes Mielodisplásicas provavelmente têm origem *na stem cell* transformada geneticamente. No entanto, subsequentes mudanças genéticas e epigenéticas contribuem para a diversidade fenotípica, ineficiência hematopoiética e susceptibilidade à transformação leucêmica. O tipo de resposta envolvendo o sistema imune, estroma e citocinas contribui para fenótipo da doença.

Com os avanços no sequenciamento do DNA têm sido descobertos uma grande quantidade (mais de 40 conhecidos) de genes mutados em pacientes com SMD. Os genes alterados por mutação estão envolvidos com oncogenes em uma ampla gama de vias biologicamente importantes. As mutações recorrentes alteram muitos processos celulares essenciais, tais como RNA *splicing*, regulação epigenética da expressão gênica, danos no DNA e mutações em genes que ativam vias de sinalização da tirosina quinase (NRAS, KRAS, BRAF, CBL e JAK2). Mutações específicas nestas vias são, em alguns casos, fortemente associadas às características morfológicas das células e aos fenótipos clínicos distintos (TEFFERI e VARDIMAN, 2009; VASSALLO e MAGALHÃES, 2009; LINDSLEY e EBERT, 2013; BEJAR e STEENSMA, 2014). Aproximadamente 80% dos pacientes com SMD têm mutações somáticas em suas *stem cells* (RANKIN *et al.*, 2015). As mutações mais

comuns encontradas na SMD ocorrem em genes envolvidos no RNA *splicing* (incluindo *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* e *ZRSR2*), regulação epigenéticas (*TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*), reparo no DNA (*TP53*), regulação transcricional (*RUNX1*, *BCOR*, *ETV6*), transdução de sinais (*CBL*, *NRAS*, *JAK2*) são frequentemente mutados na SMD (PELLAGATTI e BOULTWOOD, 2015; GANGAT et al., 2016). A frequência das mutações mais comuns, localização e função na SMD são mostradas no Tabela 7.

Tabela 7- Frequência das mutações, localização e função relatadas na SMD

Gene	%	Localização	Função
SF3B1	28	2q33	Splicing factor
TET2	21	4q24	Controle da hidroximetilação da citosina
ASXL1	14	20q11	Regulador epigenético
SRSF2	12	17q25	Splicing factor
RUNX1	9	21q22	Fator de transcrição
TP53	8	17p13	Fator de transcrição
U2AF1	7	21q22	Splicing factor
EZH2	6	7q36	Proteína do Grupo Polycomb
NRAS	4	1p13	Transdução de sinal
JAK2	3	9p24	Tirosina quinase
ETV6	3	12p13	Fator de transcrição
CBL	2	11q23	Transdução de sinal
IDH2	2	15q26	Metabolismo celular, regulação epigenética
NPM1	2	5q35	Fosfoproteína
IDH1	1	2q33	Metabolismo celular, regulação epigenética
KRAS	<1	12p12	Transdução de sinal
GNAS	<1	20q13	Proteína G
PTPN11	<1	12q24	Proteína fosfatase
BRAF	<1	7q34	Raf quinase
PTEN	<1	10q23	Fosfatase
CDKN2A	<1	9q121	Controle do ciclo celular

Fonte: MONTALBAN-BRAVO e GARCIA-MANERO, 2018.

As anormalidades citogenéticas encontradas na SMD são caracterizadas pela perda de material genético, enquanto que as translocações são raras. Anormalidades epigenéticas são frequentemente observadas na SMD incluindo a hipermetilação dos genes que controlam a proliferação, adesão e outras características dessa desordem hematológica. Várias terapias são utilizadas visando aumentar a expressão de genes silenciados pela hipermetilação. Vários estudos demonstraram que a presença de mutações somáticas em genes específicos está associada a efeitos distintos sobre citopenias e proporção de blastos na SMD (PELLAGATTI e BOULTWOOD, 2015). As anormalidades citogenéticas estão presentes em 50% dos casos na SMD primária (de novo) e em 80% dos casos SMD relacionadas com terapêutica prévia. Pode haver perda ou ganho de material genético com deleções, monossomias e trissomias, podendo ocorrer alterações complexas. A deleção do cromossoma 5 [del(5q)] e monossomia do cromossoma 7 ou sua deleção del(7q) [-7/del(7q)] são as mais frequentes na SMD. Outras deleções recorrentes que ocorrem são deleção do del(20q), deleção do 17p, del(12p), del(11q), e perdas do cromossomo X ou Y. Ganhos cromossômicos como trissomia 8, trissomia 11 também são encontrados na SMD (HOFFBRAND e MOSS, 2012; LINDSLEY e EBERT, 2013; FAILACE, 2015; PELLAGATTI e BOULTWOOD, 2015).

2.2.4 Quadro clínico

A maioria dos pacientes é assintomática e a evolução da doença, que pode ser descoberta por acaso quando o paciente faz o hemograma por motivo não relacionado, quase sempre é lenta. Alguns pacientes apresentam sintomas de anemia (cansaço, falta de ar, fadiga), trombocitopenia (hematomas, sangramento) ou neutropenia (infecções recorrentes, úlceras na boca). Por se tratar de uma doença oligossintomática, a combinação de várias outras causas de anemia ou plaquetopenia dificultam o diagnóstico diferencial. Estas causas podem ser vistas em ampla variedade condições, como abuso de álcool, anemia megaloblástica, deficiência de B12 e ácido fólico, infecções (HIV, Epstein-Barr vírus, hepatite C, parvovirus, *Leishmania*) doenças metabólicas (insuficiência hepática, insuficiência renal), hipotireoidismo, anemia de doença crônica, recuperação após quimioterapia citotóxica e outras desordens hematológicas e constitucionais como anemia aplástica, hemoglobinúria paroxística noturna, anemia de Fanconi e síndrome de

Down. Condições estas que devem ser excluídas antes de ser feito o diagnóstico de SMD ao passo que testes diagnósticos podem necessitar ser repetidos em alguns pacientes para que a interpretação seja feita pela evolução do quadro clínico. Assim, poderão ocorrer moderada hepatoesplenomegalia, hipertrofia de gengiva, derrame pleural e do pericárdico. Articulações dolorosas também poderão ser encontradas (HOFFBRAND e MOSS, 2012; INVERNIZZI *et al.*, 2015; CARVALHOSA e KILLICK, 2017). Muitos pacientes com SMD também têm distúrbios imunológicos, tais como policondrite recidivante, vasculite, artrite soronegativa (ADÈS *et al.*, 2014).

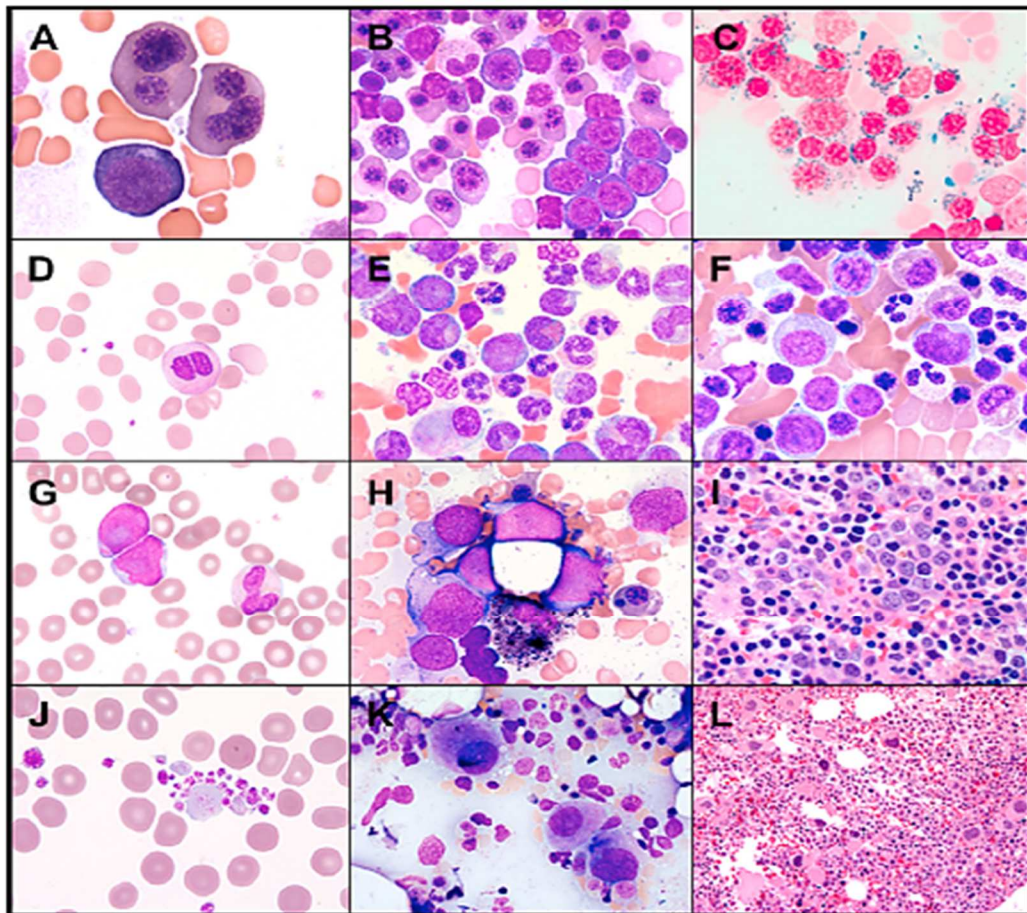
2.2.5 Achados laboratoriais

O diagnóstico da Síndrome Mielodisplásica (SMD) é determinado através de parâmetros clínicos, dados do hemograma, da citologia da medula óssea e do cariótipo. O exame histológico e imuno-histoquímico completo da medula óssea é muitas vezes necessário para um diagnóstico final e classificação exata da doença (VALENT *et al.*, 2010). Atualmente o diagnóstico é estabelecido com base na presença de: citopenia persistente (> 6 meses duração) e significativa; hemoglobina <10 g/dL; contagem absoluta de neutrófilos < $1.8 \times 10^9/L$, contagem de plaquetas < $100 \times 10^9/L$, displasia significativa na medula óssea (excesso de blastos) ou anormalidades citogenéticas (GANGAT *et al.*, 2016). No hemograma observamos anormalidades numéricas e morfológicas características. Pancitopenia é um achado frequente. As anormalidades displásicas da série eritroide, caracterizam-se por um padrão dismórfico constituído por hemácias normocrômicas e hipocrômicas. Anisocitose e poiquilocitose podem estar presentes, assim como macrocitose, ponteados basofílicos com ou sem a presença de eritroblastos. Os granulócitos estão diminuídos e podem mostrar diminuição ou ausência de granulação. As funções quimiotáticas, fagocítica e de adesividade estão diminuídas. Hiposegmentação dos neutrófilos (*pseudo Pelger-Huet*), monócitos anormais, vacuolizados ou imaturos podem ser encontrados na SMD. A presença de células mieloides imaturas e o número de mieloblastos, com ou sem bastões de Auer, quando presente, não deve ser maior que 20%, o que configuraria um quadro de LMA. As plaquetas se apresentam com formas gigantes podendo ser hipogranulares (VERBURGH *et al.*, 2007; MAIOLI e DE SOUZA, 2012; GANGAT *et al.*, 2016). Na medula óssea (MO) a celularidade geralmente está aumentada, mas também pode ser hipocelular.

Quanto à série eritroide na MO, ela se apresenta com uma hipoplasia eritroide, eritroblastos binucleados, mitoses anormais, apoptose (cariorrhexis), sideroblastos em anel (depósito de ferro nas mitocôndrias dos eritroblastos), assincronismo maturativo entre núcleo-citoplasma. Na série granulocítica da MO são observados retardo maturativo, disgranulações (hipogranularidade e/ou distribuição heterogênea) formas pelgeróides (hiposegmentação, hipogranulação), fragmentos nucleares, formas imaturas bizarras, atípicas, aberrantes, mieloblastos com ou sem bastonete de Auer. Os megacariócitos podem ter núcleos hipolobulados ou hiperlobulados, com os lóbulos aparentemente desconectados entre si, assemelhando-se aos osteoclastos. Também é característica a presença de microformas, os micromegacariócitos (NIERO-MELO *et al.*, 2006; MAIOLI e DE SOUZA, 2012). Embora o limiar para definir a displasia permaneça como 10% de células displásicas em qualquer linhagem hematopoiética, reconhece-se que a displasia em excesso de 10% pode ocorrer em alguns indivíduos normais, por esta razão, possíveis etiologias reativas de displasia devem sempre ser cuidadosamente consideradas antes de fazer diagnóstico de SMD (ARBER *et al.*, 2016).

Na Figura 10 são mostrados os achados morfológicos encontrados na SMD no sangue periférico e na medula óssea.

Figura 10 - Achados morfológicos no sangue periférico e na medula óssea encontrados na SMD



Fonte: KOMROKJI *et al.*, 2010.

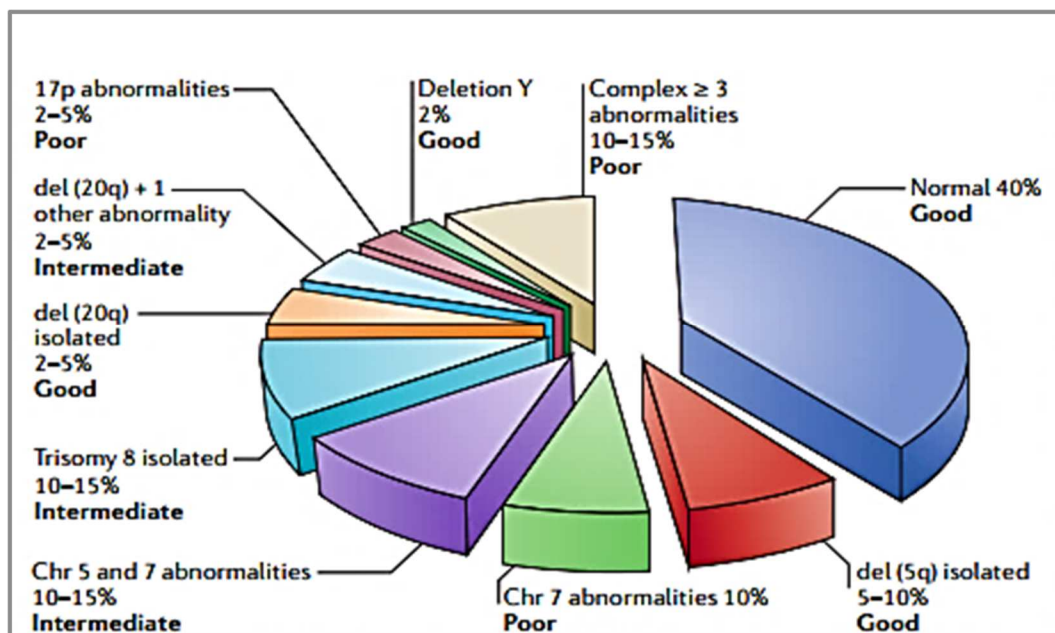
Legenda: A) Precursor eritróide com assincronismo maturativo entre núcleo-citoplasma e multinucleação. B) hiperplasia eritróide, megaloblastos e binucleação. C) Numerosos sideroblastos em anel. D) Hipogranulação e hipossegmentação, pseudo-Pelger-Huët. E) Presença de disgranulocitopoese, com hipossegmentação e hipogranulação. F) Displasia da série mielóide com hipogranulação, assincronismo maturativo entre núcleo-citoplasma. G) Blastos com núcleo redondo e oval, nucléolos evidentes. H) Vários Blastos com cromatina fina, nucléolos proeminentes e citoplasma escasso. I) Biópsia mostrando precursores mielóides imaturos. J) Displasia plaquetária, apresentando tamanho e forma variáveis, incluindo plaquetas hipogranuladas e gigantes. K) Megacariócitos de tamanho médio com núcleo monolobado. L) Biópsia mostrando aumento de megacariócitos. Achados no aspirado medular: imagens letras: A, B, C, E, F, H, K, L. Achados no sangue periférico: imagens letras: D, G, J.

As anormalidades citogenéticas são encontradas em 40-50% de casos com SMD e as implicações clínicas de cada cariótipo desempenham um papel crucial no curso da doença. As anormalidades mais comuns são: deleção do cromossomo 5 (5q), monossomia 7 ou deleção do 7q, trissomia 8, anormalidades com cromossomo sexual (-Y, em homens; -X em mulheres); anormalidades como deleções,

translocações e as inversões no 3q, trissomia 13 ou deleção (13q), trissomia 21, monossomia 21, isocromossomo 17q e Del(20q), del(12p), del(11q) (ZAHID *et al.*, 2017). A frequência das anormalidades citogenéticas nas SMD e seu valor prognóstico estão demonstrados na Figura 11.

A imunofenotipagem também tem sido utilizada nos casos de citopenias periféricas em que as atipias celulares na medula óssea não são exuberantes e o cariótipo é normal, ou não revelou mitoses. Neste contexto, a imunofenotipagem tem sido usada no sentido de (1) detectar expressões anormais de antígenos celulares relacionados a linhagem e maturação das diversas séries hemopoiéticas; (2) detectar aumento de células CD34+ (correlatos dos blastos no mielograma); (3) verificar aumento de marcadores pró-apoptóticos ou mesmo células em apoptose na medula óssea (LORAND-METZE, 2006).

Figura 11 - Frequência das anormalidades citogenéticas e seu prognóstico nas SMD



Fonte: RAZA e GALILI, 2012.

Legenda: As anormalidades cromossômicas mais comuns são mostradas na figura como também os percentuais e seu valor prognóstico (*good* = bom prognóstico; *intermediate* = intermediário prognóstico; *poor* = mau prognóstico)

2.2.6 Classificação

A primeira classificação das SMD ocorreu apenas em 1976, quando o Grupo Cooperativo Francês-Americano-Britânico (FAB) se reuniu para sistematizar a classificação das leucemias agudas, e foi baseada em parâmetros morfológicos observados no sangue periférico e da medula óssea. Em 1982 a classificação FAB foi revisada e foram definidos cinco subtipos de SMD: 1) anemia refratária (AR); 2) anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA); 3) anemia refratária com excesso de blastos (AREB); 4) anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t) e 5) leucemia mielomonocítica crônica (LMMC). A classificação FAB para SMD dominou o cenário acadêmico até os anos 2000 e permanece sendo utilizada para o monitoramento de estudos quanto à elegibilidade clínica, critérios de resposta e nos códigos e listas das agências reguladoras. Em 2001 foi substituída por classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), melhorada em 2008 (MAIOLI e DE SOUZA, 2012) e atualizada recentemente em 2016. A revisão da classificação pela OMS 2016 introduziu refinamentos na interpretação morfológica e avaliação da citopenias e aborda a importância das mutações genéticas para melhorar o diagnóstico e classificação da SMD. Os principais subtipos pela classificação da OMS 2016 para SMD são: SMD com displasia em linhagem única; SMD com sideroblastos de anel (MDS-RS); MDS-RS e displasia em linhagem única; MDS-RS e displasia em linhagem múltipla; MSD com displasia em múltiplas linhagens; SMD com excesso de blastos; SMD com deleção isolada do 5q; SMD inclassificável; citopenia refratária da infância; neoplasias mieloides com predisposição da linha germinativa (ARBBER *et al.*, 2016). Os achados no sangue periférico e medula óssea para classificação da SMD de acordo com OMS 2016 estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Classificação da SMD de acordo com OMS 2016

Subgrupo	Linhagem com displasia	Citopenia**	Sideroblasto em anel na MO	% Blastos na MO e SP	Citogenética
SMD com displasia única linhagem	1	1 ou 2	< 15% < 5%†	MO < 5% SP < 1%	Qualquer alteração desde que não associada a SMD com del (5q) isolada
SMD com displasia em múltiplas linhagens	2 ou 3	1-3	< 15% < 5%†	MO < 5% SP < 1%	Qualquer alteração desde que não associada a SMD com del (5q) isolada
SMD com sideroblastos em anel (SA)					
SMD-SA com displasia em única linhagem	1	1 ou 2	≥ 15% ≥ 5%†	MO < 5% SP < 1%	Qualquer alteração desde que não associada a SMD com del (5q) isolada
SMD-SA com displasia em múltiplas linhagens	2 ou 3	1-3	≥ 15% ≥ 5%†	MO < 5% SP < 1%	Qualquer alteração desde que não associada a SMD com del (5q) isolada
SMD com del(5q) isolada	1-3	1-2	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO < 5% SP < 1%	del (5q) isolada ou 1 anormalidade adicional, exceto -7 ou del (7q)
SMD com excesso de blastos					
SMD com excesso de blastos -1	0-3	1-3	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO 5%-9% SP 2%-4%	Qualquer anormalidade
SMD com excesso de blastos-2			Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO 10%-19% SP 5%-19%	Qualquer anormalidade
SMD inclassificável					
Com 1% de blastos	1-3	1-3	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO <5% SP = 1%‡,	Qualquer anormalidade
Com displasia em única linhagem e citopenia	1	3	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO < 5% SP < 1%	Qualquer anormalidade
Baseada na definição da anormalidade citogenética	0	1-3	< 15 §	MO < 5% SP < 1%	Anormalidade que define o subtipo de SMD
Citopenia refratária da infância	1-3	1-3	Nenhuma	MO <5% SP < 2%	Qualquer anormalidade

Fonte: ARBER et al., 2016.

Legenda: **Citopenias definidas como: hemoglobina < 10 g/dL; contagem de plaquetas < 100 x 10⁹ /L e contagem absoluta de neutrófilos < 1.8 3 10⁹/L. Raramente na SMD pode apresentar anemia leve

ou trombocitopenia acima desses níveis. A contagem absoluta de monócitos no sangue periférico deve ser $< 1 \times 10^9/L$.

† Se a mutação SF3B1 estiver presente.

‡ 1% de blastos no SP deve ser registrado em, pelo menos, duas ocasiões distintas.

§ Casos $\geq 15\%$ de sideroblastos em anel, por definição, tem significativa displasia eritróide e são classificados como SMD-SA com displasia em única linhagem.

Ausência de bastonete de Auer em todos os subgrupos

MO= Medula óssea

SP= Sangue Periférico

2.2.7 Sistemas de estratificação de risco e fatores de prognóstico

A ferramenta prognóstica mais usada na avaliação de pacientes com mielodisplasia é o IPSS (*International Prognostic Score System*- Sistema Internacional de Escore Prognóstico), proposto em 1997. O escore proposto considera o percentual de blastos, a presença e tipo de anomalia citogenética e o número e magnitude das citopenias, estratificando quatro subgrupos de risco com relação à sobrevida global e transformação leucêmica. De acordo com IPSS os pacientes podem ser estratificados em: baixo risco (bom prognóstico), risco intermediário-1 e risco intermediário-2 (prognóstico intermediário) e alto risco (prognóstico desfavorável) (TEFFERI e VARDIMAN, 2009; VASSALLO e MAGALHÃES, 2009).

Em 2012 o sistema de escore foi revisado (IPSS-R-*Revised International Prognostic Scoring* - Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado) com maior refinamento sendo considerado o percentual de blastos na medula óssea, citogenética e a presença e grau de citopenias como formas de estabelecer a sobrevida e o risco de transformação em leucemia (GREENBERG *et al.*, 2012). As Tabelas 9,10 e 11 ilustram essa classificação.

**Tabela 9 - Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R):
Grupo de risco citogenéticos**

Subgrupos prognósticos citogenéticos	Anormalidades citogenéticas
Muito bom	Y, del (11q)
Bom	Normal, del (5q), del (12q), del (20q), outras incluindo del (5q)
Intermediário	del(7q), +8, +19, (17q), qualquer outra ou dupla anormalidade
Ruim	-7, inv (3) / t(3q) / del(3q), dupla anormalidade com -7/del(7q), complexo: 3 anormalidades
Muito ruim	Complexo: > 3 anormalidades

Fonte: Adaptado de GREENBERG *et al.*, 2012.

Tabela 10 - Sistema de pontuação: Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R)

Prognóstico	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Citogenética	Muito bom		Bom		Intermediário	Ruim	Muito ruim
Blastos na MO (%)	≤ 2		>2 ≤ 5%		5- 10%	> 10%	
Hemoglobina (g/dL)	≥ 10		8 ≤ 10	< 8			
Plaquetas (mm ³)	≥ 100	50 ≤ 100	< 50				
Neutrófilos (mm ³)	≥ 800	< 800					

Fonte: GREENBERG *et al.*, 2012.

Tabela 11 - Classificação de risco e sobrevida média pelo IPSS-R

Classificação	Pontuação	Sobrevida média (anos)
Muito baixo	≤ 1,5	8,8
Baixo	> 1,5 -3	5,3
Intermediário	> 3 - 4,5	3,0
Alto	> 4,5 - 6	1,6
Muito alto	> 6	0,8

Fonte: GREENBERG *et al.*, 2012.

2.2.8 Tratamento

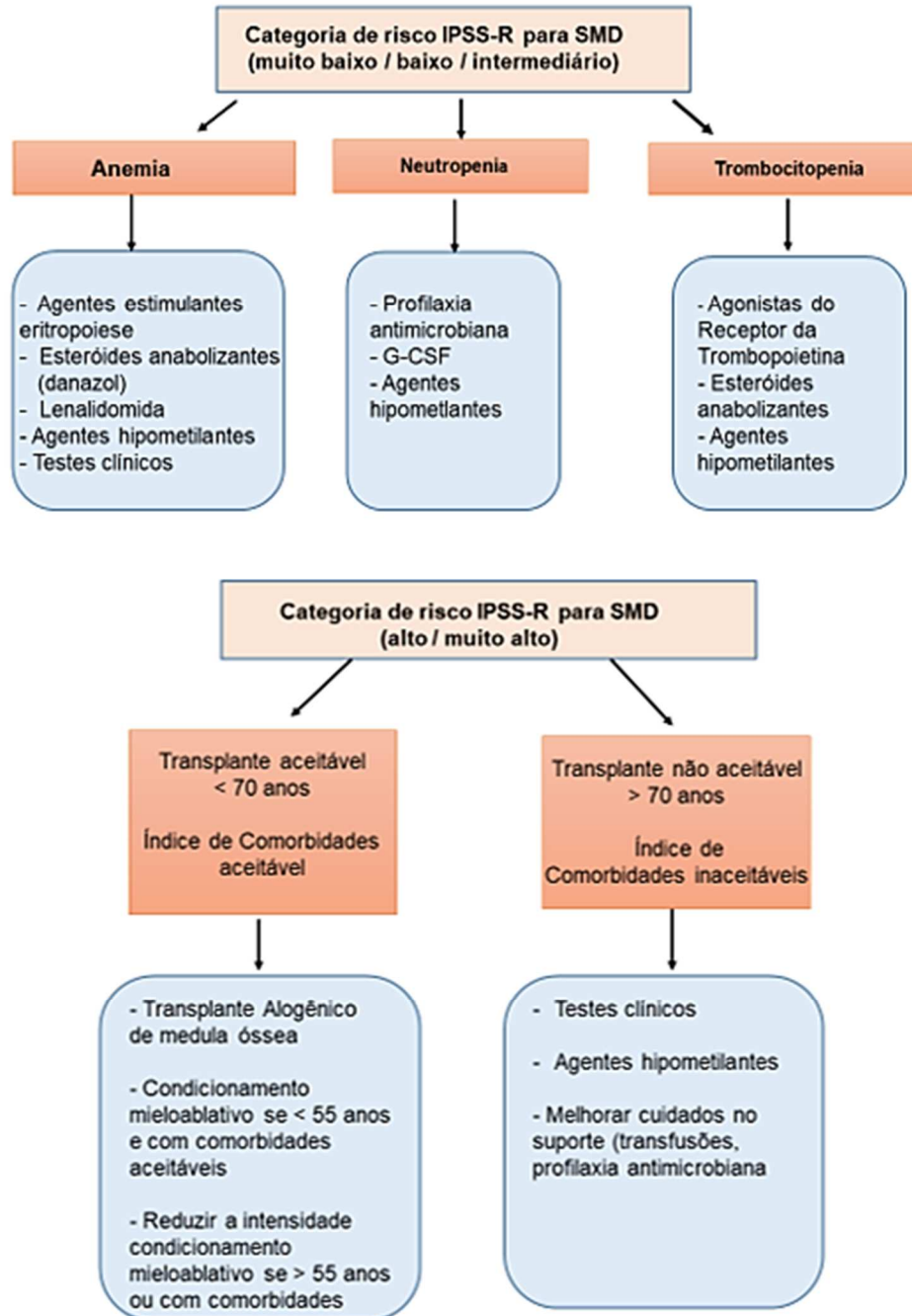
O tratamento para SMD deve considerar comorbidades, grupo de risco do paciente, idade, bem como tipo de alterações citogenéticas. Abordagens terapêuticas estabelecidas para pacientes com SMD incluem tratamento de suporte, quimioterapia e transplante alogênico de medula óssea (CANDELARIA e DUENAS-GONZALEZ, 2015). Pacientes com doença de baixo risco são tratados inicialmente com agentes estimulantes da eritropoese e terapias imunomoduladoras. Pacientes com prognóstico intermediário e alto risco recebem agentes hipometilantes e/ou transplante de medula óssea (SEITER, 2013).

Os agentes estimulantes da eritropoese, como eritropoietina são utilizados para diminuir a anemia, fadiga e a necessidade transfusões de hemácias. Os agentes imunomoduladores são utilizados em situações que as citocinas alteradas são causa significativa de citopenias. Na SMD são usados a lenalidomida, a globulina antitimocítica (GAT) ou antilinfocítica (GAL) e a ciclosporina A (CsA) são utilizados nas

SMD, visando a melhora da pancitopenia, que decorre da supressão da hematopoese por clones de células T autorreativos (VELLOSO, 2006; SEITER, 2013).

Os genes supressores de tumor estão geralmente hipermetilados na mielodisplasia e este mecanismo pode ser suprimido com os chamados agentes hipometilantes, como as drogas azacitina (Vidaza®) e decitabina (Dacogen®). Com a introdução e melhorias nas técnicas HLA (*Human leukocyte antigen*, antígeno leucocitário humano) e cuidados no suporte ao paciente, o transplante alogênico agora também é uma opção para muitos pacientes idosos. A sobrecarga de ferro continua a ser uma causa significativa de morbidade e mortalidade para pacientes com SMD cronicamente transfundidos. A sobrecarga de ferro resulta em danos ao fígado, coração e órgãos endócrinos, por isso o uso de quelantes de ferro como deferasirox (Exjade®). Novas terapias incluem combinações de agentes aprovados para SMD e agentes aprovados para outras doenças (SEITER, 2013). O transplante de medula óssea é a única modalidade terapêutica que pode curar um paciente com SMD (HOFFBRAND e MOSS, 2012). As questões clínicas frequentemente encontradas ao tratar os pacientes com SMD incluem: anemia com dependência de transfusão; sobrecarga de ferro e a aloimunização eritrocitária devido às transfusões; trombocitopenia e desordens qualitativas das plaquetas; defeitos quantitativos e qualitativos de neutrófilos resultando em infecções recorrentes e progressão da doença para a transformação leucêmica (GANGAT *et al.*, 2016). A abordagem do tratamento adaptada ao risco IPSS-R para o tratamento de pacientes com síndromes mielodisplásicas está ilustrada na Figura 12.

Figura 12 - Abordagem terapêutica adaptada ao risco IPSS-R para o tratamento de pacientes com Síndromes Mielodisplásicas

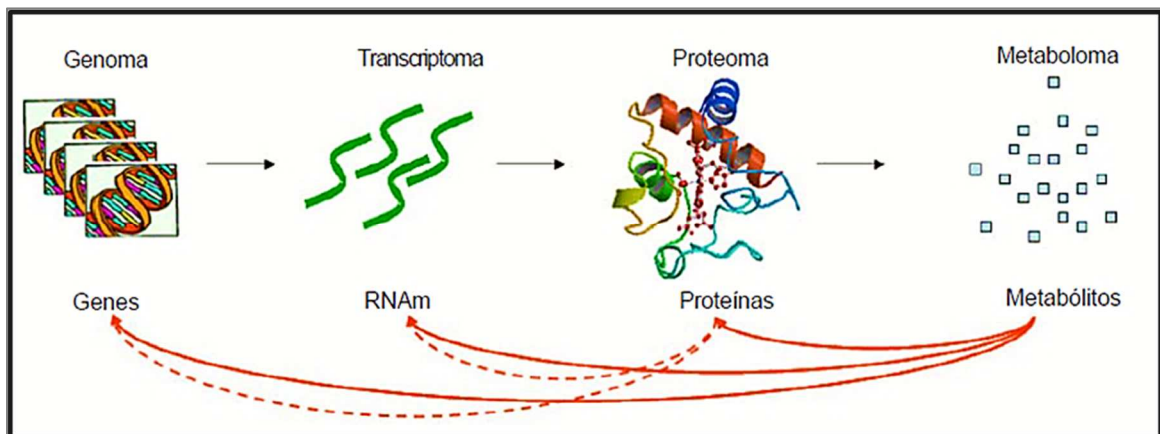


Fonte: Adaptado (GANGAT *et al.*, 2016).

2.3 Ciências ‘ômicas’

No início desta década com o advento do genoma humano também se iniciava as discussões e as ações para uma nova era da biologia, a “era pós-genômica”. Neste contexto, promoveu-se o desenvolvimento e o aperfeiçoamento das técnicas que permitiram os avanços destas novas ciências ‘ômicas’ (Figura 13), como a transcriptômica, proteômica e metabolômica, com o objetivo de isolar e caracterizar o RNA, as proteínas e os metabólitos, respectivamente. É preciso destacar que este avanço das ciências ‘ômicas’ se deveu em grande parte devido ao desenvolvimento da bioinformática.

Figura 13 - O funcionamento celular



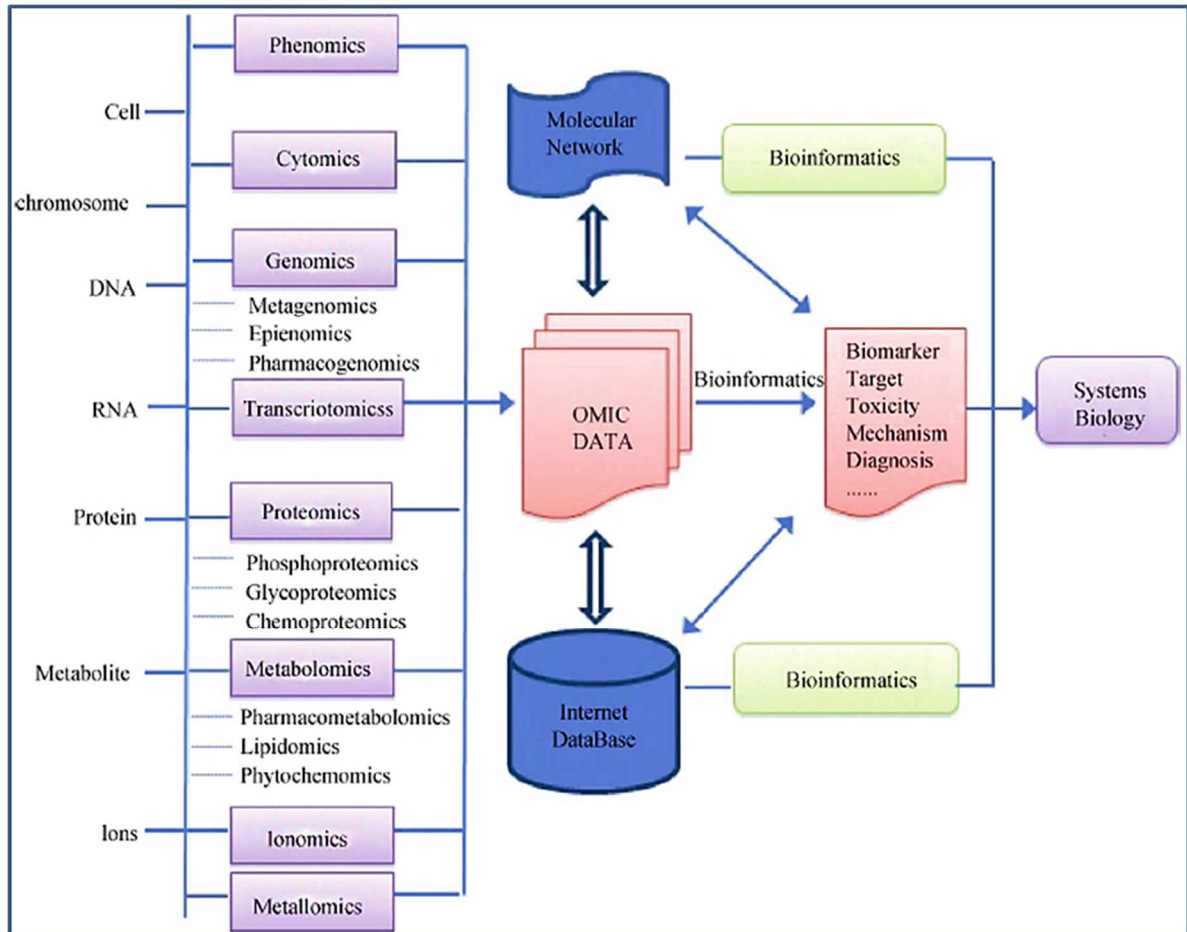
Fonte: VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006.

Legenda: A informação codificada no DNA é transcrita em uma molécula de RNA mensageiro que é traduzida em uma molécula de proteína que, quando não exercendo um papel estrutural, irá catalisar uma ou mais reações químicas dentro e/ou fora da célula, sendo, portanto, responsável pela transformação de pequenas moléculas químicas chamadas de metabólitos. Os metabólitos por sua vez, regulam as atividades das proteínas, o processo de transcrição e tradução, além de servirem de substratos para modificação e síntese de proteínas e lipídeos, além da síntese de DNA e RNA. Portanto os metabólitos são os produtos finais do metabolismo celular.

O termo ‘ômicas’ refere-se à análise global do conteúdo de moléculas dos sistemas biológicos. Além das citadas anteriormente, uma variedade de subdisciplinas ‘ômicas’ têm surgido (Figura 14), cada uma com seu próprio conjunto de instrumentos, técnicas, *softwares* e base de dados (ESPINDOLA *et al.*, 2010). Tem ocorrido um crescimento substancial em outros ramos das ‘ômicas’ como, por exemplo, a análise lipidômica (alterações nos lípidos plasmáticos e celulares), citômica (análise celular que integra os conhecimentos da genômica e da proteômica), fenômica (estudo do

fenótipo), ionoma (estudo da medida e papel dos íons nos processos biológicos) (YAN *et al.*, 2015).

Figura 14 - Várias técnicas ‘ômicas’ e seu papel na biologia dos sistemas



Fonte: YAN *et al.*, 2015.

Legenda: Com base nos dados ômicos, bancos de dados públicos e rede molecular, é possível visualizar os processos biológicos nas vias dos mapas biológicos, interações protéicas, associações gene-doença, mecanismos de ação de drogas, medicina personalizada e assim por diante que também é um objetivo da biologia dos sistemas. As associações entre as ‘ômicas’, bioinformática, biologia dos sistemas e outras metodologias de pesquisa estão demonstradas na figura acima.

A ciência biológica moderna frequentemente envolve a análise de populações de biomoléculas dentro de um organismo definido (célula, tecido ou compartimento subcelular). Como as novas abordagens ‘ômicas’ geram grandes quantidades de dados, foi necessário o desenvolvimento em tecnologias da bioinformática e estatística para processar esses dados de forma econômica, de maneira oportuna e biologicamente útil (WOOD *et al.*, 2014).

As novas disciplinas ‘ômicas’ estão ganhando um interesse crescente na comunidade científica devido à disponibilidade experimental em plataformas com alto desempenho técnico *high throughput*, como, por exemplo, o sequenciamento de nova geração, *microarrays* e espectrometria de massa, que permitem o estudo da célula. Por outro lado, essas plataformas estão produzindo uma grande quantidade de dados experimentais e, para que seja realizada uma análise eficiente dos dados ‘ômicos’, elas requerem soluções da bioinformática (AGAPITO *et al.*, 2017). Atualmente, a bioinformática é imprescindível para a manipulação de qualquer tipo de dado biológico, principalmente os “megadados” oriundos das ‘ômicas’. A bioinformática pode ser definida como uma modalidade que abrange todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica. Por meio da combinação de procedimentos e técnicas de matemática, estatística e ciência da computação, são elaboradas várias ferramentas que nos auxiliam a compreender o significado biológico representado nos dados gerados pelas ‘ômicas’ (SANTOS e ORTEGA, 2003).

Medidas em grande escala de genes, proteínas e metabólitos conduziram a resolução da biologia a uma extraordinária alta definição, passando do reducionismo para um sistema orientado de perspectiva. A capacidade dos diferentes níveis ‘ômicos’ nos permitem estratificar fenômenos biológicos complexos para a compreensão de patologias. Conseqüentemente, os pacientes podem ser monitorados regularmente através dos perfis pessoais das múltiplas ‘ômicas’ representando o seu estado fisiológico ou patológico no momento específico em que a amostra é coletada. Essas ‘assinaturas’ podem permitir que os médicos individualizem a avaliação de riscos, prevenção de doenças, diagnóstico e as intervenções terapêuticas, que é o objetivo da medicina personalizada (ROSENBLUM e PEER, 2014).

Graças a essas tecnologias agora é possível detectar não só qualitativa, mas também níveis quantitativos de múltiplos genes, transcritos e proteínas simultaneamente. Além disso, devido a melhor sensibilidade, especificidade e precisão dessas tecnologias, podem ser identificados biomarcadores para a previsão de doenças (KIM *et al.*, 2017).

No entanto, uma única estratégia ‘ômica’ pode fornecer informações limitadas sobre os mecanismos biológicos de uma doença devido às redes complexas e dinâmicas de moléculas que estão envolvidas nas doenças humanas. Como no caso

das variantes genômicas que, sozinhas, não são capazes de explicar a mudança do risco para a doença ao longo da vida. DNA, RNA, proteínas e metabólitos muitas vezes têm funções complementares para desempenhar conjuntamente uma determinada função biológica. Efeitos complementares e interações sinérgicas entre as 'ômicas' podem ser capturados pelo estudo integrativo. As abordagens múltiplas das 'ômicas' integram dados obtidos de diferentes níveis para entender sua interação e combinada influência sobre os processos das doenças (SUN e HU, 2016).

2.4 Metabolismo

Todas as células vivas precisam de energia para o seu crescimento, manutenção e conversão de pequenos compostos químicos em outro conjunto de substâncias químicas com menor teor de energia livre. Esta conversão ou transformação de produtos químicos envolve um grande número de reações químicas com muitos intermediários químicos. A completude dessas reações é chamada de metabolismo e os produtos químicos envolvidos no metabolismo são chamados de metabólitos. O metabolismo é mantido e regulado para garantir o fornecimento constante de recursos para a sobrevivência da célula e isto é, altamente dependente do meio ambiente. Os metabólitos são os produtos de reações catalisadas por enzimas que ocorrem naturalmente nas células vivas ou cuja expressão é induzida por fatores externos. Várias reações diferentes ocorrem dentro de uma célula e são normalmente organizadas em uma série de eventos que atendem uma função intracelular coordenada. Estas reações são chamadas de vias metabólicas (VILLAS-BOAS *et al.*, 2007).

As vias metabólicas consistem em uma série de reações enzimáticas conectadas e que produzem produtos específicos. Os reagentes, os intermediários e os produtos são igualmente denominados metabólitos (VOET *et al.*, 2014). Uma molécula deve atender a certas propriedades e características antes de ser chamada de metabólito. As propriedades e a química dos metabólitos e a sua ocorrência no metabolismo são determinadas por duas propriedades principais: as propriedades químicas e físicas (peso molecular, tamanho da molécula, polaridade, volatilidade, solubilidade, pka e estabilidade química) e a dinâmica através da qual o metabólito

é convertido, ambas fortemente dependentes do ambiente do momento (VILLAS-BOAS *et al.*, 2007).

O metabolismo por meio do qual os sistemas vivos adquirem e usam energia livre para realizarem suas funções é dividido em duas partes: 1) catabolismo, ou degradação, no qual os nutrientes e os constituintes celulares são degradados para geração de energia 2) anabolismo, no qual as biomoléculas são sintetizadas a partir de componentes mais simples (VOET *et al.*, 2014).

Metabólitos podem ser divididos em primários ou secundários. Os metabólitos primários fazem parte das vias anabólicas e catabólicas comuns a muitos organismos. Apesar de comuns a muitos organismos, os metabólitos primários são muito diversos quanto a sua estrutura, pois não são simples polímeros lineares de unidades repetitivas como os ácidos nucleicos ou as proteínas. A análise destes metabólitos é útil para detectar distúrbios no metabolismo e assim entender melhor, por exemplo, patologias. Atualmente, isto é feito rotineiramente em exames médicos como os de sangue. Nesses exames, a comparação da concentração de metabólitos como a glicose, colesterol, triglicérides e ácido úrico no sangue do paciente com os valores normalmente encontrados na população auxilia o médico a estabelecer o diagnóstico. Fica claro então, que o nível de certos metabólitos reflete o estado metabólico do organismo. Metabólitos secundários são compostos formados a partir de vias biossintéticas de distribuição relativamente restrita e os precursores destas vias derivam do metabolismo primário. O termo metabolismo secundário é mais frequentemente usado para vias metabólicas específicas de diversos organismos como bactérias, fungos e plantas, sendo raramente utilizado para compostos do metabolismo animal. Exemplos de metabólitos secundários, produzidos por plantas e micro-organismos, são os alcalóides e muitos medicamentos são metabólitos secundários extraídos de plantas ou micro-organismos (MOREIRA, 2015).

Os metabólitos, como substratos, produtos ou cofatores nas reações bioquímicas, desempenham um papel muito importante na conexão das diferentes vias metabólicas que operam dentro de uma célula viva. O nível dos metabólitos de uma célula ou tecido é determinado pela concentração e propriedades das enzimas, sendo, portanto, função de um complexo regulatório operante dentro das células tais como, regulação da transcrição e tradução, regulação das interações proteína-

proteína e regulação alostérica das enzimas através de suas interações com os metabólitos (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006).

Conseqüentemente, o nível dos metabólitos representa uma informação integrativa da função celular em nível molecular, definindo assim o fenótipo de uma célula ou tecido em resposta a alterações ambientais ou genéticas. A identificação do nível dos metabólitos é, desse modo, um complemento fundamental na determinação da função gênica. Muitos metabólitos participam de diversas reações bioquímicas diferentes, amarrando as diferentes partes do metabolismo celular a uma rede metabólica altamente controlada. Desse modo, a alteração do nível de um único metabólito numa célula resulta na alteração do nível de diversos outros que estão direta e indiretamente conectados ao primeiro, demonstrando assim que o metaboloma de uma célula ou tecido tem a capacidade de responder rapidamente a qualquer alteração ambiental e/ou genética, sendo inclusive capaz de caracterizar mutações ditas silenciosas (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006).

2.5 Metabolômica

Com o objetivo de investigar todo o conjunto de metabólitos presentes em um sistema biológico, a metabolômica é uma nova e promissora disciplina do campo 'das ômicas' e na biologia dos sistemas. Consiste numa abordagem analítica para detectar metabólitos e determinar suas concentrações. A metabolômica é interdisciplinar, conduzida pelas ciências básicas (química analítica e bioquímica), pela estatística, quimiometria e bioinformática juntamente com epidemiologia e pesquisa clínica. (LIESENFELD *et al.*, 2013). Muitas áreas podem ser beneficiadas com a pesquisa metabolômica, como as aplicações na saúde, incluindo farmacologia, toxicologia, erros inatos do metabolismo, pesquisa clínica, câncer, agricultura e a nutrição (LINDON *et al.*, 2011). A metabolômica tem sido aplicada para definir metabólitos relacionados ao prognóstico ou diagnóstico de doenças e pode proporcionar maior compreensão fisiopatológica das doenças (ZHANG *et al.*, 2012). O termo 'metaboloma' foi introduzido em 1998 em um artigo de *Oliver et al.* (1998) para indicar o conjunto dos metabólitos de um organismo. São entendidos como metabólitos as micromoléculas orgânicas do sistema biológico. Estes metabólitos derivam da interação do genoma, do transcriptoma e do proteoma do organismo com o meio ambiente, dando origem ao seu fenótipo (MOREIRA, 2015). O termo metabolômica

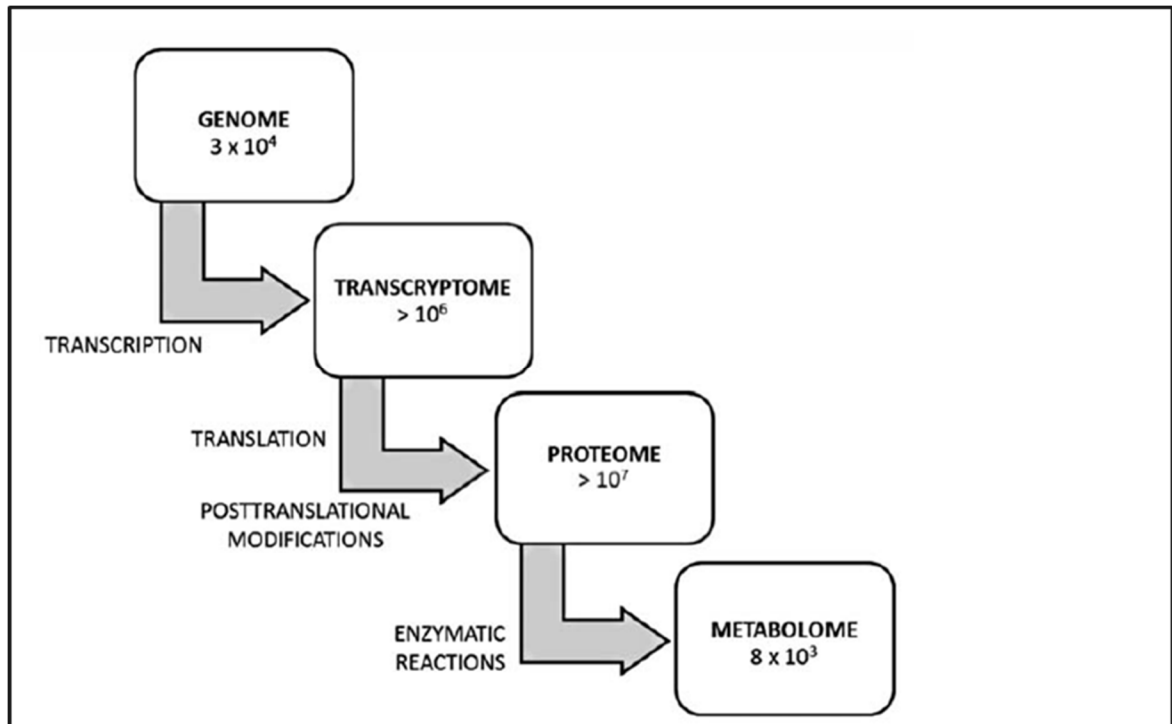
(do inglês, *metabolomics*) é recente, introduzido nos anos 2.000 por Dr. Oliver Fiehn e colaboradores (FIEHN *et al.*, 2000). Embora ocorram pequenas diferenças conceituais os dois termos metabólômica (do inglês “*metabolomics*”) e metabonômica (do inglês “*metabonomics*”) são usados frequentemente por cientistas e organizações devido à sobreposição nas concepções teóricas e metodológicas (LINDON *et al.*, 2011).

A análise do metaboloma abrange a identificação e quantificação de metabólitos intracelulares e extracelulares com baixa massa molecular inferior a 1500 Da, usando diferentes técnicas analíticas. Dentro do metaboloma, existe, no entanto, uma grande variação nas estruturas e propriedades químicas, compreendendo desde espécies iônicas até carboidratos hidrofílicos, álcoois e cetonas voláteis, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos e produtos naturais complexos (VILLAS-BOAS *et al.*, 2007). O metaboloma humano representa a coleção completa de pequenas moléculas encontradas no corpo humano, incluindo peptídeos, lipídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos orgânicos, aminas biogênicas, vitaminas, minerais, aditivos alimentares, drogas, cosméticos, contaminantes, poluentes ou outras coisas que ingerimos, metabolizamos, catabolizamos ou entramos em contato (WISHART *et al.*, 2018). Ao contrário do genoma e do proteoma, o próprio metaboloma não é facilmente definido. Isso ocorre porque o metaboloma humano não é exclusivamente ditado por nossos genes. O nosso ambiente (o que comemos, respiramos e bebemos) e a nossa microflora do trato intestinal contribuem para o metaboloma. Em outras palavras, o metaboloma humano consiste em uma mistura de compostos endógenos e exógenos. Os metabólitos endógenos são pequenas moléculas sintetizadas pelas enzimas codificadas pelo nosso genoma e os metabólitos exógenos são produtos químicos "estranhos" ou xenobióticos consumidos como alimentos, bebidas, drogas ou outros consumíveis (WISHART *et al.*, 2013).

O número de metabólitos no corpo humano é relativamente pequeno em comparação com o número de genes, transcritos ou proteínas (Figura 15), contudo, o número de fatores que influenciam os níveis de metabólitos em fluidos e tecidos biológicos é muito amplo. Os níveis de metabólitos podem ser considerados como a resposta final de um organismo aos fatores do meio ambiente, modificações genéticas, alterações da microflora intestinal e alterações na atividade de enzimas.

Portanto, esta nova plataforma de pesquisa é mais intimamente relacionada ao fenótipo observado (KLUPCZYNSKA *et al.*, 2015).

Figura 15 - Diagrama ilustrando as tecnologias ‘ômicas’



Fonte: KLUPCZYNSKA *et al.*, 2015.

Legenda: Número de metabólitos no corpo humano em comparação com o genoma, transcriptoma, proteoma e o metaboloma. O fluxo de informação no organismo humano começa com genes (3×10^4) e termina com metabólitos (8×10^3).

Usando abordagens *in silico*, juntamente com as laboratoriais, foi possível expandir o número de metabólitos (conhecidos, esperados e previstos) e agrupá-los em um banco de dados denominado *Human Metabolome Database* (HMDB) onde se encontram mais de 114 mil entradas (incluindo metabólitos endógenos, farmacometabólitos, compostos alimentares, corantes, pesticidas, poluentes, drogas, etc. (WISHART, *et al.*, 2018).

Duas abordagens analíticas podem ser utilizadas na análise metabolômica: a metabolômica alvo (do inglês, *targeted metabolomics*) e a metabolômica global (do inglês, *untargeted metabolomics*). A metabolômica *targeted*, refere-se à detecção e quantificação precisa de um pequeno conjunto de compostos conhecidos. É direcionada para um conjunto específico de metabólitos. Uma limitação da abordagem *targeted* exige que os compostos de interesse sejam conhecidos, ou seja, uso de padrões purificados que foram claramente identificados e estão disponíveis para um

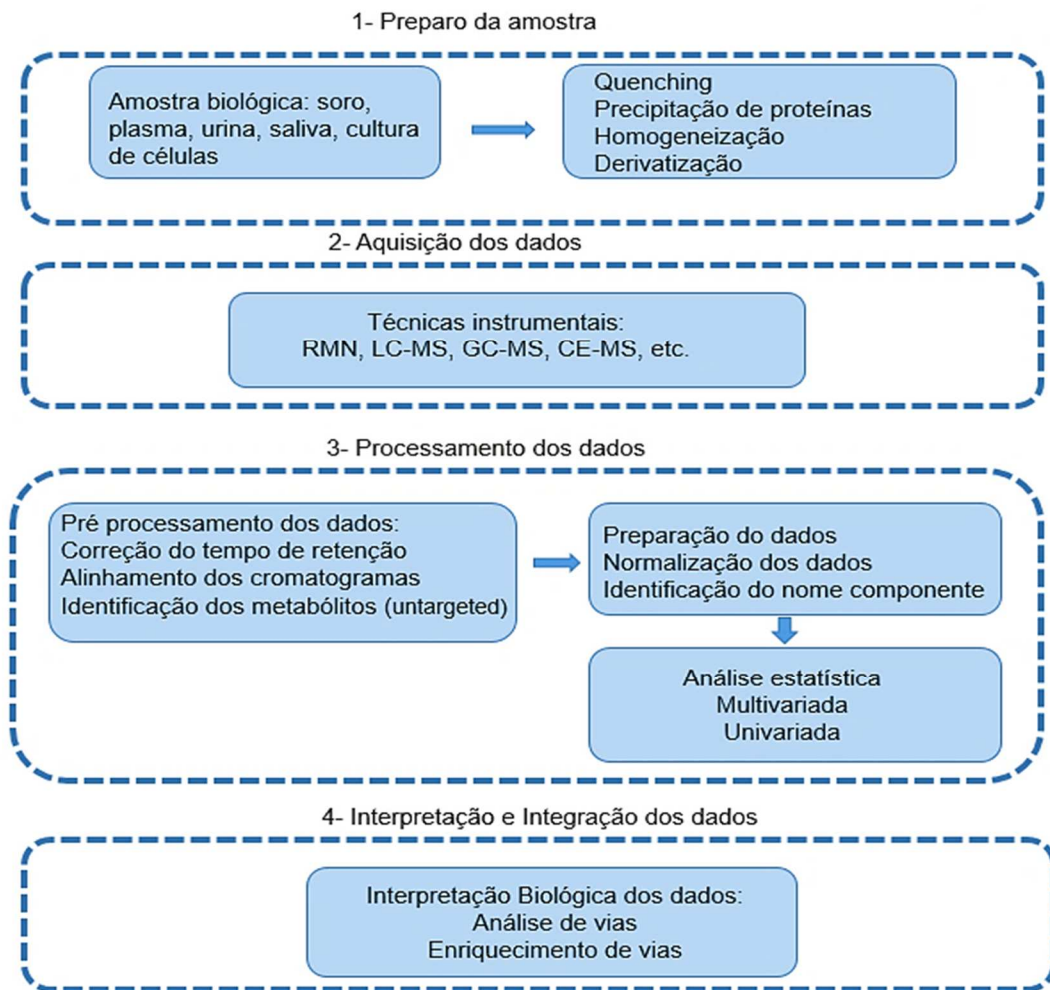
processo de calibração. A abordagem analítica *untargeted* é uma análise geral de metabólitos, não direcionada, para classificar amostras, determinar e quantificar uma ampla gama de metabólitos, sem requerer conhecimento prévio dos compostos da investigação (CAMBIAGHI *et al.*, 2017). Assim, do ponto vista analítico, há basicamente duas abordagens principais para se analisar o metaboloma: a) análise direcionada e b) perfil metabólico, sendo que esse último pode ser subdividido em “*fingerprinting*” metabólico, quando se refere ao perfil de metabólitos intracelulares, e “*footprinting*” metabólico, quando se refere ao perfil de metabólitos extracelulares (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006).

Conforme uma revisão de literatura realizada por Liesenfeld *et al.* (n= 106 estudos revisados) os tipos de amostras mais comumente utilizadas na análise metabolômica para pesquisa do câncer são soro, plasma, urina, líquido, tecidos tumorais, saliva, fezes, ar expirado e amostras de pele (LIESENFELD *et al.*, 2013).

A preparação da amostra é uma das etapas cruciais na análise do metaboloma. O primeiro passo é a interrupção rápida do metabolismo celular, o que no inglês é chamado de “*quenching*” metabólico. Embora a meia vida dos metabólitos extracelulares seja maior do que a metabólitos intracelulares, é importante interromper qualquer atividade bioquímica das amostras para se evitar qualquer variação nos níveis dos metabólitos. O “*quenching*” metabólico é obtido através de alteração drástica de temperatura ou *pH* (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006).

Resumidamente, o fluxo de análise da metabolômica pode ser agrupada em quatro etapas (Figura 16) sendo elas: 1) preparação da amostra, 2) aquisição dos dados (diferentes técnicas podem ser usadas para separar e caracterizar grupos de metabólitos quimicamente diversos), como a cromatografia líquida combinada com espectro de massas ou ressonância magnética nuclear (RMN), 3) processamento dos dados (utilização de *software* específicos para interpretação dos cromatograma, sua deconvolução e identificação, alinhamento e análise estatística 4) Integração e interpretação biológica.

Figura 16 - Fluxo de análise em metabolômica



Fonte: Adaptado de CAMBIAGHI *et al.*, 2017.

Legenda: O fluxo de trabalho pode variar dependendo da abordagem (*targeted* ou *untargeted*), mas sempre apresentando etapas de preparo da amostra, aquisição dos dados, processamento dos dados e interpretação biológica.

2.6 Técnicas analíticas para análise metabolômica

Diante da grande diversidade química dos metabólitos, encontrar uma única técnica analítica capaz de cobrir todo o metaboloma de organismo biológico não é uma tarefa fácil. Desse modo, existe a necessidade de se utilizar e combinar diferentes técnicas analíticas. A aquisição dos dados dos estudos metabolômicos vem sendo realizada com o uso de multiplataformas de análise que proporcionam maior cobertura em termos de substâncias químicas detectadas e, conseqüentemente, proporcionam

um maior entendimento biológico do organismo estudado. Ferramentas poderosas de análise como a ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês, *nuclear magnetic resonance*) e a espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*), que fornecem informações estruturais de diversas classes químicas, são as técnicas analíticas mais empregadas nos estudos metabolômicos. Menos frequentemente, podem ser encontradas aplicações utilizando a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR, do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*), que demonstra grande potencial por ser uma técnica de elucidação estrutural de baixo custo, simples e não destrutiva (CANUTO *et al.*, 2018).

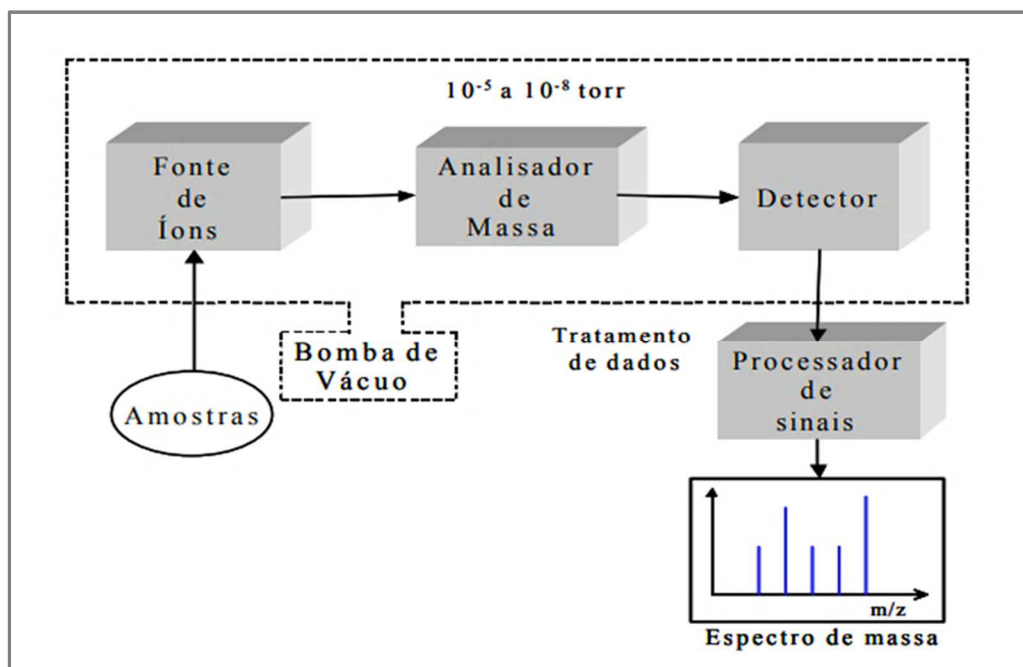
A propriedade da ressonância magnética nuclear (RMN) é a de que o núcleo de alguns átomos possui a capacidade de absorver e reemitir radiação eletromagnética em uma frequência específica na presença de um campo magnético. É uma técnica que identifica e quantifica simultaneamente uma ampla gama de compostos orgânicos na faixa de micromolar. A RMN é uma técnica amplamente automatizada e não destrutiva de amostras, ou seja, permitindo a preservação das amostras escassas ou raras. A principal limitação da RMN é apresentar baixa sensibilidade, tornando-a inadequada para a análise de um grande número de metabólitos que possuem baixa concentração (ZHANG *et al.*, 2012).

A espectrometria de massas (MS) é a técnica de análise mais usada na metabolômica, uma vez que proporciona análises rápidas, com alta sensibilidade e seletividade. As vantagens mais importantes da MS são a sua alta sensibilidade e alto rendimento, em combinação com a possibilidade para confirmar a identidade dos componentes presentes em amostras biológicas complexas, bem como a detecção e identificação dos compostos desconhecidos. A espectrometria de massas pode ser usada diretamente ou acoplada a técnicas de separação como a cromatografia gasosa (GC-MS), cromatografia líquida (LC-MS) e a eletroforese capilar (CE-MS) e UPLC-MS (Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas) (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2012). Cada técnica apresenta suas particularidades, vantagens e desvantagens que devem ser levadas em consideração em cada estudo metabolômico, Tabela 12 (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005).

De uma forma simplificada um espectrômetro de massas tem cinco componentes (Figura 17). O primeiro componente é unidade de entrada da amostra, que leva até a fonte de íons, onde as moléculas da amostra são ionizadas. Os íons,

então, são acelerados por um campo eletromagnético. Em seguida o analisador de massa separa os íons da amostra baseado em sua razão massa/carga (m/z). Os íons são, então, contados pelo detector, e o sinal é registrado e processado pelo sistema de dados (PAVIA *et al.*, 2010).

Figura 17 - Representação esquemática do funcionamento de Espectrômetro de Massas



Fonte: <https://pt.slideshare.net/lhaisleal/espectrometria-de-massas-principios-e-aplicacoes>. Acesso em: 10 de janeiro de 2018.

Algumas opções de fonte de ionização incluem a ionização por eletrospray (ESI - do inglês *Electrospray Ionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI - do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), ionização química (CI do inglês *Chemical Ionization*) (Villas-Boas *et al.*, 2005) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI - do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*) (ROBB *et al.*, 2000), dentre outras.

O método de ionização ESI é o método de escolha para os estudos metabolômicos por MS, devido a sua "ionização branda", que gera pouquíssima fragmentação decorrente do processo de ionização. A ESI é bastante eficiente para moléculas polares e pode ser acoplada facilmente aos sistemas de cromatografia líquida ou eletroforese capilar. A determinação da relação massa / carga (m/z) é feita

pelos analisadores de massa e os mais utilizados são: quadrupolo, triplo quadrupolo, ion trap e tempo de voo TOF (do inglês, *Time of Flight*) (VILLAS-BOAS *et al.*, 2005; VILLAS-BOAS *et al.*, 2007).

A recente introdução da UPLC associada com a espectrometria de massas resulta em maior definição de picos, análises de execução mais rápidas sem perda de resolução e capacidade de alto rendimento comparadas às colunas convencionais do HPLC, tornando-se ainda mais adequado para uma abordagem metabolômica. A combinação de UPLC com MS abrange uma série de metabólitos polares aumentando o número de analitos detectados. Ela possui melhor separação dos picos no cromatograma, como também melhora a resolução na identificação dos metabólitos e a precisão nas medidas de massa. Dado ao poder da tecnologia UPLC-MS esta técnica representa uma plataforma promissora de microseparação do metaboloma. (ZHANG *et al.*, 2012).

As análises desse experimento foram feitas através da técnica UPLC acoplada ao analisador de massa tandem quadrupolo (Xevo TQ-S da Waters®) com o método ESI de ionização. A técnica conhecida como espectrometria de massas tandem é o acoplamento de dois ou mais analisadores de massa em conjunto. Quando se combina UPLC com espectrometria de massas tandem, o instrumento recebe o nome de UPLC-MS / MS (SKOOG *et al.*, 2006).

**Tabela 12 - Técnicas analíticas mais empregadas em estudo metabólico
suas vantagens e desvantagens**

Técnica analítica	Vantagens	Desvantagens
NMR (Adequada para inúmeros compostos)	Pouco preparo da amostra Robustez e rapidez Repetibilidade Preservação da amostra	Menor sensibilidade Complexidade espectral
CG-MS (Separação simultânea identificação, e quantificação de diferentes classes de metabólitos (voláteis e não-voláteis))	Ideal para amostras biológicas complexas Capacidade de analisar diferentes classes de metabólitos Alta sensibilidade Alta resolução	Metabólitos não voláteis devem ser derivatizados antes da análise Dificuldade para identificar componentes desconhecidos
LC-MS (Adequada para separação, quantificação e identificação de ampla gama de metabólitos)	Alta sensibilidade Boa resolução Permite análise de metabólitos termolábeis	Identificação dos compostos depende de MS/MS Efeito matriz estrições com eluentes
CE-MS (Separação, identificação e quantificação dos metabólitos polares)	Volume pequeno de amostras Útil para amostras biológicas complexas Alta resolução	Limite para quantificação Menor sensibilidade Menor Repetibilidade Identificação dos compostos depende de padrões e de MS/MS

Fonte: Adaptado de VILLAS-BOAS *et al.*, 2005.

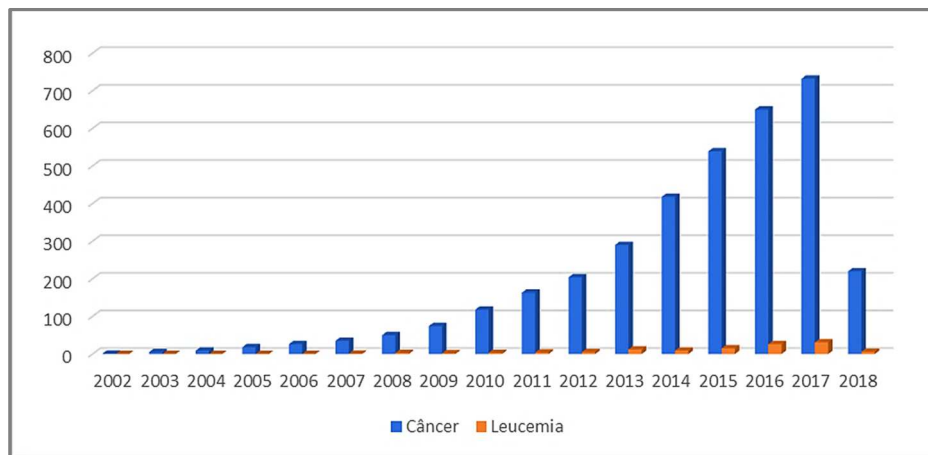
2.7 Estudos metabólicos na clínica e em leucemias

A metabolômica emergiu recentemente como uma ferramenta útil com amplas aplicações na pesquisa clínica, como a descoberta de biomarcadores para doenças, avaliação da segurança clínica para uso de drogas e na medicina de precisão (LI *et al.*, 2017). Várias especialidades médicas começam a revisar suas patologias e condições clínicas a partir de uma perspectiva da análise metabolômica, como por exemplo, na oncologia (LIESENFELD *et al.*, 2013; GUNTHER, 2015; KNIFIC *et al.*, 2018), na cardiologia (SABATINE *et al.*, 2005), na endocrinologia (HOU *et al.*, 2018; PIENING *et al.*, 2018), na neurologia (GILL *et al.*, 2018; VARMA *et al.*, 2018), na nefrologia (RHEE, 2018), no transplante de órgãos (WISHART, 2005), na infectologia (EVANGELATOS *et al.*, 2018; ZURFLUH *et al.*, 2018), na reumatologia (MCGRATH e YOUNG, 2015), nas doenças hematológicas (ZHONG *et al.*, 2015; ALLEGRA *et al.*,

2016; PISZCZ *et al.*, 2016) dentre outras áreas da saúde. Um dos estudos pioneiros de metabolômica em leucemias foi realizado por *Blankenberg et al. 1997*, quando foi estimado o percentual de apoptose de linfoblastos na leucemia linfoblástica aguda por meio da técnica de RMN (*BLANKENBERG et al.*, 1997).

Ainda que incipientes, as publicações que tratam da ligação entre metabolômica e leucemias (Figura 18), especificamente as leucemias estudadas, LLC e SMD, os estudos metabolômicos já trazem resultados promissores na acumulação contínua de conhecimento, aumentando as esperanças de que o entendimento do metabolismo do tumor ofereça novas maneiras de prever, diagnosticar e até mesmo tratar (*ALLEGRA et al.*, 2016). O primeiro artigo que apresentou a investigação de metabólitos no contexto da LLC foi de *Macintyre et al. (2010)*.

Figura 18 - Gráfico com a evolução do número de publicações com a aplicação da metabolômica em estudos do câncer e em leucemias



Fonte: Gráfico produzido mediante consulta dos trabalhos publicados no Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) com as estratégias de busca: *(metabolomics OR metabonomics) AND (leukemia OR leukaemia) AND cancer*. Acesso em: 26 de março de 2018.

3 JUSTIFICATIVA

O fornecimento de nutrientes e oxigênio para uma célula influencia as vias metabólicas comprometidas para a produção de energia. Em resposta a essas modificações, as células se adaptam ou morrem. Muitos sinais metabólicos controlam a propensão das células para iniciar programas autodestrutivos, em parte operando em sensores de nutrientes. Isso sugere que a presença de “metabólitos *checkpoints*” determinam o destino das células em resposta a variações metabólicas. No entanto, é sabido que a capacidade das células cancerosas para ajustar seu metabolismo em resposta a situações desafiadoras é um evento muito mais geral e complexo do que se supunha anteriormente (ALLEGRA *et al.*, 2016).

As razões para este estudo foram:

- A utilização de uma metodologia inovadora como a metabolômica, baseada na determinação do perfil metabólico, pode ser útil para compreensão das vias bioquímicas relacionadas às leucemias.
- Recentes estudos utilizaram a análise metabolômica para explorar biomarcadores nas leucemias (MACINTYRE *et al.*, 2010; PISZCZ *et al.*, 2016; MUSHARRAF *et al.*, 2017).
- Caracterização metabólica pode auxiliar no diagnóstico e nos fatores de prognóstico dos pacientes com LLC e SMD.
- Até momento, ainda são poucos os estudos metabolômicos relacionados com a Leucemia Linfocítica Crônica e com a Síndrome Mielodisplásica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo foi investigar por meio de uma abordagem metabolômica as variações das concentrações plasmáticas de metabólitos em pacientes com LLC e SMD, que poderiam ser apontados como possíveis candidatos a biomarcadores para o diagnóstico e/ou no prognóstico dessas doenças.

4.1.1 Objetivos específicos

- I) Empregar o Absolute/DQ® p180 Kit (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria) e UPLC-MS/MS para determinar a concentração plasmática absoluta de 186 metabólitos no plasma de pacientes com LLC e SMD.
- II) Estabelecer estratégias quimiométricas baseadas em análises estatísticas univariada e multivariada para tratamento dos dados a fim de revelar potenciais candidatos a biomarcadores.
- III) Identificar padrões metabólicos diferenciadores entre o grupo doente *versus* grupo controle (LLC vs. CTRL e SMD vs. CTRL), bem como entre os dois grupos doentes (LLC vs. SMD).
- IV) Formular uma interpretação biológica para os resultados obtidos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

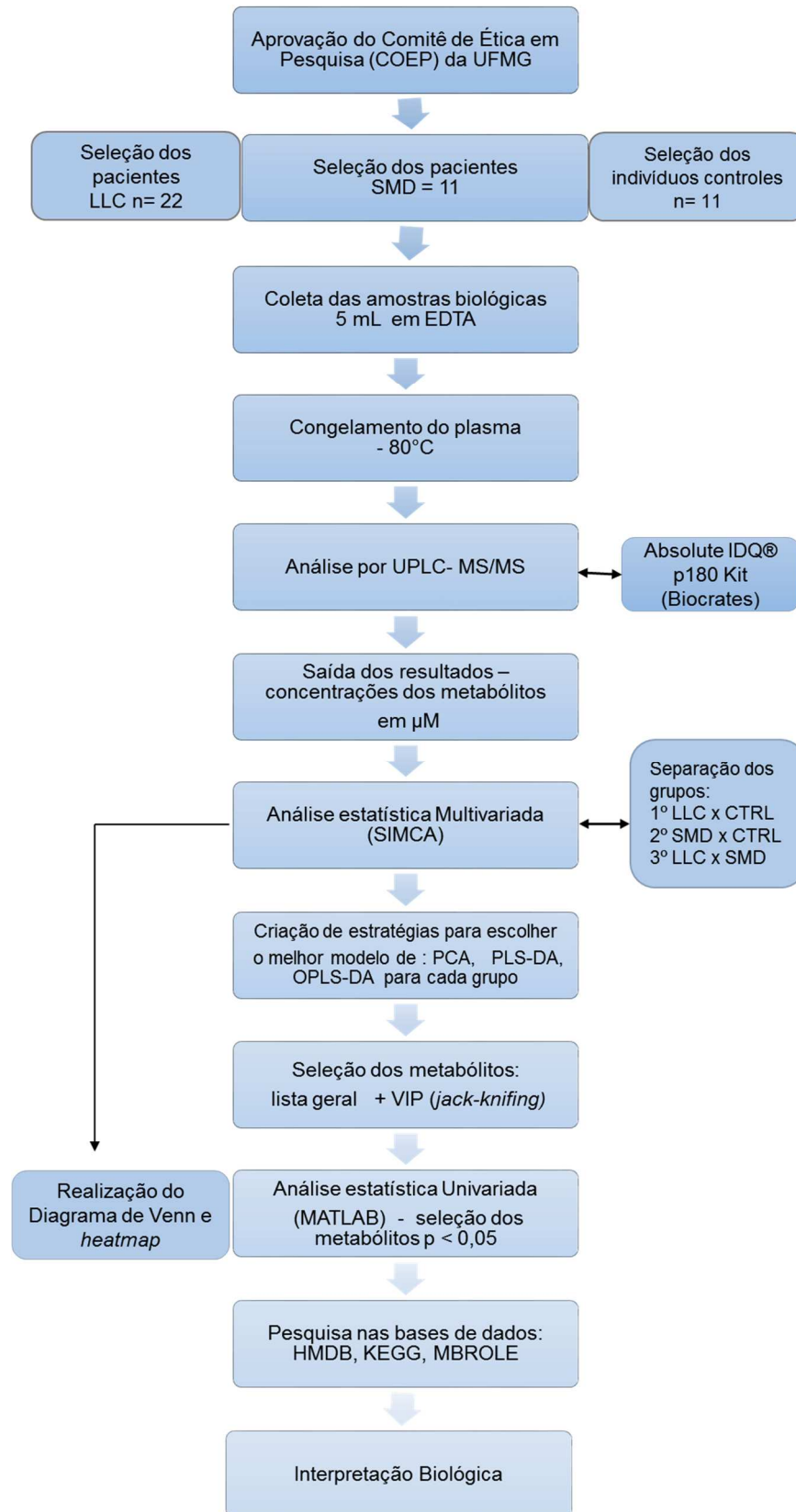
Este estudo está vinculado ao projeto de pesquisa intitulado “Análise celular, molecular e plasmática, de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação em vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mieloides, linfoides e mielodisplasia”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - COEP, Projeto CAAE Nº 02177612.0.0000.5149 bem como à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos participantes do estudo. A participação dos indivíduos controles foi aprovada pelo Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte Parecer Nº 315.034, CAAE: 15097113.3.0000.5149 e todos eles assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Esse estudo é do tipo caso-controle, no qual a comparação se faz entre um grupo de doentes (LLC e SMD) e um grupo de indivíduos sem as doenças estudadas.

As análises experimentais desse estudo foram realizadas no laboratório do Professor Dr. Luiz Cláudio Cameron da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

5.1 Delineamento Experimental

Para um melhor entendimento do delineamento experimental, encontra-se abaixo um fluxograma com todas as etapas do presente estudo.



Fonte: O autor, 2018.

5.2 População Estudada

Os pacientes participantes do estudo foram selecionados pelos médicos hematologistas do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, que se localiza no Ambulatório Borges da Costa, sendo que o critério de diagnóstico utilizado pelos médicos hematologistas para os pacientes com LLC foi realizado através de avaliação clínica, hemograma e imunofenotipagem (escore de Matutes).

Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a classificação de Binet baseados nos critérios de classificação estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como: Estadiamento da Leucemia Linfocítica Crônica (RAI *et al.*, 1975) e Classificação do Grupo de Trabalho Internacional (BINET *et al.*, 1981). Esses critérios possibilitam que o médico classifique o paciente como sendo de baixo, médio ou alto risco, sendo essa informação registrada no prontuário do paciente. Para os pacientes com SMD os critérios de diagnóstico utilizados pelos médicos hematologistas foi o IPSS-R.

As coletas das amostras foram realizadas no período de agosto de 2014 a setembro de 2015.

5.2.1 Amostras biológicas da LLC:

Amostras de plasma em EDTA foram coletadas de 22 pacientes diagnosticados com LLC em diferentes graus de estadiamento da doença atendidos no Serviço de Hematologia/Oncologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

As amostras foram divididas em dois grupos: 10 pacientes classificados como Binet A (baixo risco) e 12 pacientes classificados como Binet B/C (médio e alto risco) conforme registro em prontuário consultado. O grupo dos pacientes LLC incluiu 10 mulheres e 12 homens. A faixa etária dos pacientes foi entre 46 e 87 anos (média 69 anos e mediana 74 anos).

5.2.2 Amostras biológicas da SMD

Foram analisadas 11 amostras de plasma em EDTA de pacientes com SMD atendidos no Serviço de Hematologia/Oncologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

O grupo SMD abrangeu 04 mulheres e 07 homens. A faixa etária dos pacientes foi entre 34 e 89 anos (média 65 anos e mediana 71 anos).

Os critérios de inclusão dos pacientes com LLC e SMD neste estudo foram: ter diagnósticos confirmados para as respectivas doenças e seleção feita pelos médicos hematologistas pelo Serviço Hematológico do Hospital das Clínicas da UFMG, além de ter idade igual ou superior a 18 anos.

Foram excluídos do estudo pacientes com diagnóstico de outros distúrbios linfoproliferativos como leucemia prolinfocítica, leucemia de células pilosas, linfoma esplênico com linfócitos pilosos, leucemia plasmocítica, além dos linfomas Hodgkin e não-Hodgkin. Estes dados foram obtidos a partir das análises dos prontuários dos pacientes.

5.2.3 Grupo controle:

O grupo controle foi constituído de 19 indivíduos sem LLC, SMD e qualquer outro tipo de câncer, sendo 10 mulheres e 09 homens, recrutados no ambulatório da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, sendo todos eles acompanhantes de pacientes desse hospital. A faixa etária dos indivíduos controle foi de 36 a 74 anos (média e mediana = 57 anos). Os critérios de inclusão dos indivíduos controles foram: ausência de câncer (qualquer tipo), ausência de acidente vascular cerebral (isquêmico ou hemorrágico), ausência de infarto do miocárdio, ausência de doença de Chagas, doenças neurodegenerativas, doença tireoidiana, doença renal crônica, traumas e alcoolismo. A tabela 13 apresenta resumo da população estudada.

Tabela 13 - Resumo da população estudada dos pacientes e indivíduos controles

Grupo	<i>n</i>	Sexo	Faixa etária (anos)	Média (anos)	Mediana (anos)
LLC 10 pacientes Binet A 12 pacientes Binet B/C	22	10 Mulheres 12 Homens (P = 0,662)	46 - 87	69 (P = 0,002)	74
SMD	11	4 Mulheres 7 Homens (P = 0,411)	34 - 89	65 (P = 0,097).	71
Indivíduos Controles	19	10 Mulheres 9 Homens	36 - 74	57	57

Fonte: O autor, 2018.

5.3 Coleta das amostras:

Coleta do Sangue:

Amostras de sangue periférico foram coletadas com sistema Vacutainer (BD Vacutainer®), sendo 5,0 mL em EDTA K2. O mesmo procedimento foi realizado para pacientes SMD e indivíduos controles. As amostras foram transportadas em maleta apropriada para transporte de material biológico, tendo sido as amostras processadas o mais rápido possível no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG.

As amostras de plasma em EDTA foram coletadas em tempo de jejum variado, mas os alimentos ingeridos pelos participantes não foram avaliados em função da dinâmica do horário de atendimento do serviço hematológico. As amostras foram centrifugadas (400 × g, 30 minutos), observando que o tempo entre coleta e centrifugação não excedesse de 2 horas e a fase plasmática foi imediatamente congelada a -80°C até momento do seu processamento.

5.4 Análise por UPLC - MS/MS

Os metabólitos foram extraídos das amostras de plasma humano usando um sistema de placas com 96 microtubos específicos, um modelo exclusivo e patenteado pelo fabricante, projetado para remoção de proteínas, normalização e derivatização com padrão interno, presente no kit Absolute/DQ® p180 Kit (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria). O método do kit Absolute/DQ® p180 foi comprovado em conformidade com a Diretriz da *Food and Drug Administration* FDA (Orientação para a Indústria - Validação do Método Bioanalítico (BREIER *et al.*, 2014).

O ensaio específico permite a detecção e quantificação simultânea de 186 metabólitos endógenos divididos em seis classes bioquímicas sendo: 21 aminoácidos, 19 aminas biogênicas, 40 acilcarnitinas, 90 glicerofosfolídeos, 15 esfingolípídeos e 01 soma das hexoses (glicose, galactose e frutose). A lista dos metabólitos medidos pelo kit (abreviatura do metabólito, nome completo e importância biológica) estão descritos nos Apêndice A e Apêndice B. O kit pode ser utilizado em várias matrizes biológicas com alto rendimento e totalmente validado para plasma humano. A preparação foi realizada de acordo com o Manual do Usuário disponível no kit

(BIOCRATES, 2017). As amostras de plasma foram descongeladas gradualmente em banho de gelo, depois submetidas a vórtex e centrifugadas antes de serem adicionadas à placa.

Resumidamente, um volume de 10µL de amostras de plasma foram adicionados no centro do filtro, na parte superior de cada microtubo da placa e secas usando um evaporador de nitrogênio. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de uma solução de fenil-isotiocianato a 5% para derivatização dos aminoácidos e das aminas biogênicas. Após a incubação (20 minutos) os filtros foram secos novamente usando um evaporador de nitrogênio por 60 minutos. Os metabólitos foram extraídos usando 300 µL de uma solução de acetato de amônio em metanol a 5 mM e transferidos por centrifugação (30 minutos a 450 rpm) para o fundo de cada microtubo da placa. Os extratos foram diluídos com 600 µL de solvente de corrida para MS para posterior análise usando o espectrômetro de massa com analisador do tipo quadrupolo Xevo-TQ-S® (*Waters Technologies, Massachusetts, EUA*).

Uma amostra em branco (sem padrões internos e sem amostra adicionada), três amostras zero baseadas em água (solução salina tamponada com fosfato) e três amostras de controle de qualidade também foram adicionadas à placa do kit. Os controles de qualidade são compostos por liofilizados de plasma humano contendo níveis baixos, médio e alto de concentração dos metabólitos, utilizados para verificar o desempenho do ensaio e do espectrômetro de massa. Os resultados dos controles são exibidos e avaliados num módulo do software Met/DQ® (*Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria*). O critério da precisão, recomendado pela diretriz do FDA para validação de análise bioanalítica usando método LC-MS é ter um coeficiente de variação (CV) que não exceda 15% (*TIWARI e TIWARI, 2010*).

Uma diluição em série com sete pontos de calibradores foi adicionada à placa de 96 microtubos do kit para gerar curvas de calibração para a quantificação de aminas biogênicas e aminoácidos.

O kit incluiu uma mistura de padrões internos para a quantificação dos metabólitos endógenos, conforme segue: padrões internos quimicamente homólogos foram utilizados para a quantificação das classes de glicerofosfolípídeos e esfingolípídios enquanto que os padrões internos marcados com isótopos estáveis foram utilizados para quantificar as outras classes de compostos.

A quantidade de padrões internos foi idêntica para cada poço, e as intensidades do padrão interno, da amostra zero e das amostras foram comparadas para permitir conclusões sobre os efeitos de supressão de íons.

As acilcarnitinas, glicerofosfolipídeos e esfingolipídios foram analisadas usando espectrometria de massas tandem quadrupolo da Waters (Xevo TQ-S®) por meio da análise por injeção de fluxo FIA (*Flow injection analysis*- Análise por Injeção em Fluxo) no modo positivo. Hexoses foram analisadas por subsequente aquisição em FIA no modo negativo.

Os aminoácidos e as aminas biogênicas foram analisados usando Cromatografia líquida de Ultra Eficiência (UPLC), modelo Waters sistema UPLC® ACQUITY com coluna cromatográfica, Acquity BEH C18 1.7 µm, 2.1 x 50 mm (Waters *Chromatography*, Dublin, Irlanda) conectadas ao espectro de massas Xevo TQ-S® no modo positivo. A identificação e quantificação dos metabólitos foi realizada utilizando padrões internos e por detecção por monitoração de reações múltiplas (MRM).

A análise dos dados e o cálculo das concentrações de metabólitos analisados por FIA (acilcarnitinas, glicerofosfolipídeos, esfingolipídios e hexoses) é automatizada usando o software Met/DQ® (*Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria*), uma parte integrante do kit que importa os arquivos de dados brutos da Waters®. Ainda em termos de quantificação, para os lipídeos e acilcarnitinas sua quantificação é chamada “semi-quantitativa”, pois algumas concentrações dessas classes podem corresponder a concentração de componentes isobáricos /isoméricos. A composição da cadeia de lipídeos é abreviada como Cx:y, onde “x” é o número de carbonos da cadeia do ácido graxo e o “y” é o número de ligações duplas.

A análise dos picos obtidos por UPLC (aminoácidos e aminas biogênicas) foi realizada usando o *software* TargetLynx Application Manager® (*Waters Technologies, Massachusetts, EUA*). Todas as concentrações foram medidas em µM (micromolar).

O desenho da placa é mostrado na Figura 19.

Figura 19 – Desenho da placa do kit Absolute/DQ® p180 Kit (Biocrates)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Legenda: 1 Branco ○; 3 Amostras zero ●; 7 pontos calibração ●; 3 Controles Qualidade (baixo, médio, alto) ● ● ●; 22 LLC, 11 SMD, 11 Indivíduos controles ●.

5.5 Processamento dos dados e Análises Quimiométricas

Devido à complexidade das amostras biológicas e a alta sensibilidade das técnicas de separação utilizadas nos experimentos metabolômicos, tais como CE, GC, LC e UPLC acoplados à espectrometria de massas (MS), fazem com que os experimentos em metabolômica possam gerar tabelas de dados usualmente na ordem de centenas à milhares de variáveis em uma única amostra. Nesse seguimento, os dados devem ser avaliados por métodos estatísticos multivariados e univariados.

A Quimiometria é a aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas à química (FERREIRA, 2015) sendo um campo estabelecido na análise de dados e provou ser valiosa ferramenta na análise dos dados ‘ômicos’ em muitas aplicações (LINDON *et al.*, 2011).

Diferente da análise univariada, que avalia as variáveis separadamente e despreza as relações entre as variáveis a análise multivariada tem sido amplamente utilizada nessa área de pesquisa, pois, além de facilitar a visualização de dados complexos, apresenta capacidade de predição a partir de um treinamento com uma matriz complexa de dados, como por exemplo, um conjunto de metabólitos responsáveis pela diferenciação entre grupos (COOK e RUTAN, 2014). A etapa de análise dos dados metabolômicos é muito importante, e a estratégia utilizada nessa

etapa tem um impacto direto na seleção dos candidatos a biomarcadores (HENDRIKS *et al.*, 2011).

A análise metabolômica gera tabelas de dados complexas que são difíceis de resumir e interpretar sem estatística apropriada e ferramentas de visualização. O uso de ferramentas quimiométricas como, por exemplo, a análise de componentes principais (PCA), a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e a PLS ortogonal (OPLS-DA) é de grande importância, pois inclui métodos eficientes e robustos para modelagem, análise e interpretação de complexos químicos e dados biológicos (WIKLUND *et al.*, 2008).

5.5.1 - Análise Estatística Multivariada

Os dados brutos dos metabólitos identificados (concentrações dos metabólitos) foram importados do *software* Met/DQ® e convertidos para o formato de arquivo específico. Em seguida, a matriz de dados com os resultados dos grupos dos pacientes com LLC, SMD e dos indivíduos controles, contendo a concentração (em micromolar) de cada cromatograma de íon extraído (EIC – do inglês *Extracted Ion Chromatogram*) foi submetida às análises estatísticas multivariadas com o auxílio do *software* SIMCA-P (+) (versão 14, *Soft Independent Modeling of Class Analogy - SIMCA*, Umetrics, Suécia). O *software* SIMCA permite a interpretação multivariada de conjuntos de dados complexos por meio de gráficos bi ou tridimensionais (SOUZA e POPPI, 2012). Antes das análises estatísticas multivariadas os dados foram escalonados utilizando o escalonamento UV (*Unit Variance*), escalonamento do tipo variância única que dá a variável uma variação igual ao seu desvio padrão. O pré-processamento dos dados torna-se necessário nos dados metabolômicos devido a concentração dos metabólitos variarem em grande magnitude entre si. Dessa forma o escalonamento visa garantir que todas as variáveis sejam significativas para as análises posteriores (VAN DEN BERG *et al.*, 2006). Isso equivale a fazer com que todos os eixos das variáveis tenham o mesmo comprimento, isto é, dar a todas as variáveis igual importância (UMETRICS, 2015).

Os dados escalonados foram inicialmente submetidos à análise exploratória de dados utilizando os métodos não supervisionados de Análise de Componentes Principais (PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*). O PCA é uma análise

multivariada não supervisionada, sendo útil para reconhecimento de padrões, tendências e agrupamentos não direcionados das amostras. Os gráficos de PCA fornecem um resumo, ou visão geral, de todas as observações ou amostras da tabela de dados. Além disso, agrupamentos, tendências e *outliers* também podem ser visualizados nos gráficos de *score plot*, ao passo que os gráficos de *loading plot* descrevem a influência das variáveis e relação entre elas (TRYGG *et al.*, 2007).

Normalmente, o PCA é utilizado com o objetivo de visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridades entre amostras, detectar amostras anômalas (*outliers*) e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados (SOUZA e POPPI, 2012; LEVER *et al.*, 2017). Métodos não supervisionados servem para fornecer uma visão geral dos dados em estudos de metabolômica. De longe, a mais comum é a análise de componentes principais. O PCA é um método baseado em uma projeção que reduz a dimensionalidade dos dados criando componentes principais. Nessa análise as variáveis são reduzidas a componentes principais que são combinações lineares das variáveis iniciais, e são ortogonais, ou seja, não se correlacionam entre si (SOUZA e POPPI, 2012). O primeiro componente representa a maior variação nos dados; o segundo componente representa a segunda maior variação, e assim por diante. Para estudos com duas classes distintas, como a análise de doentes *versus* indivíduos saudáveis, a análise discriminante (DA) é a utilizada mais frequentemente (COOK e RUTAN, 2014).

Em seguida foi empregada a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA – do inglês, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*). O PLS-DA é um método de classificação supervisionado usado para melhorar a separação entre diferentes classes de observações. As amostras se agrupam de acordo com uma similaridade na estrutura da matriz de informação, o que origina os *clusters*. O método encontra uma relação entre as variáveis preditoras e as variáveis dependentes, construindo modelos, um para cada resposta. PLS-DA (também conhecido como PLS-2) em vez de construir modelos separados para cada resposta, é capaz de lidar com múltiplas respostas simultaneamente (GROMSKI *et al.*, 2014). O PLS-DA relaciona uma matriz de dados de observações a uma matriz de variáveis dependentes à medida que cria um modelo de regressão linear, projetando as variáveis e observações para um novo espaço (LINDON e NICHOLSON, 2008).

Por fim, foi empregada a análise discriminante com projeção ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA do inglês, *Orthogonal partial least square discriminant analysis*), que também é um método supervisionado para identificar os metabólitos discriminadores candidatos a biomarcadores (WIKLUND *et al.*, 2008).

A vantagem do modelo OPLS em comparação com PLS, é que o primeiro é girado de modo que na separação entre as classes é encontrado um componente preditivo e dentro da variação da classe é visto o primeiro componente ortogonal (WIKLUND *et al.*, 2008). Esta separação de previsão e componentes ortogonais facilita a interpretação do modelo. O OPLS tem a vantagem adicional de separar a variação preditiva da variação ortogonal, permitindo ser estudado e interpretado separadamente (WIKLUND *et al.*, 2008). Para duas classes de um problema (por exemplo: doente vs. saudável, tratado vs. não-tratado) o OPLS-DA é recomendado para obter uma visão mais clara e interpretação mais direta (TRYGG *et al.*, 2007).

Os modelos estatísticos resultantes da análise multivariada (PCA, PLS-DA e OPLS-DA) foram validados utilizando a capacidade de predição do modelo através dos parâmetros R^2 e Q^2 . Os parâmetros estatísticos R^2 e Q^2 são ferramentas importantes para avaliar o desempenho dos modelos multivariados. O parâmetro R^2 é conhecido por *goodness of fit*, traduzido como a “qualidade de ajuste”. Já o parâmetro Q^2 é conhecido por *goodness of prediction* podendo ser traduzido como “qualidade de predição”. Os parâmetros R^2_X (matriz de espectros) e R^2_Y (matriz de concentrações) são os que representam a porção de variância explicada pelo modelo multivariado. Assim temos: R^2 varia entre 0 e 1, em que 1 indica um modelo perfeito e 0 indica nenhum tipo de ajuste do modelo. Q^2 representa um indicador de desempenho mais efetivo e útil, uma vez que estima o poder preditivo do modelo. Igualmente como R^2 , o Q^2 tem um limite superior em 1. Dessa forma, para que um modelo seja considerado um bom modelo estatístico, tanto R^2 como Q^2 devem ser altos. De uma forma geral, $Q^2 > 0,5$ pode ser considerado como um bom modelo e $Q^2 > 0,9$ como um excelente modelo (ERIKSSON *et al.*, 2008).

Foram considerados potenciais biomarcadores as variáveis localizadas longe do agrupamento central (zero) da maioria das variáveis no *loading plot* bem como os resultados fornecidos pelo índice VIP (do inglês *Variable Influence on Projection*-Importância da variável na projeção), sendo as variáveis que apresentam valores mais distante de 1 indicam uma maior influência na separação dos grupos. Essas variáveis

foram exibidas para a seleção da lista dos metabólitos em gráficos de barras de covariância da componente preditiva do modelo, com os correspondentes intervalos de confiança gerados pela técnica de reamostragem denominados como “*jack-knifing*” (ERIKSSON *et al.*, 2013).

Resumidamente após normalização dos dados foi usado o PCA para separação dos grupos e OPLS-DA para identificação dos metabólitos discriminadores candidatos.

5.5.2 Análise Estatística Univariada

Para a análise univariada foi testada a significância de cada variável individualmente para cada grupo. A análise univariada foi feita através do *software* comercial MATLAB® (MATrix LABoratory) baseada num algoritmo de decisão, na qual é feito inicialmente um teste de normalidade de cada variável (*Kolmogorov-Smirnov* com a correção de *Lilliefors*) que levará a decidir se deverá ser feito um teste paramétrico (Test- t / ANOVA) ou não paramétrico (*Mann-Whitney*). Também foi calculado valor-*p* usando as correções de Bonferroni e Benjamini-Hochberg (FDR- *False DiscoveryRate*). Esses testes resultam em *p*-valores em que a variável (metabólito) com $p < 0,05$ foi selecionada como critério para ser considerada estatisticamente significativa.

5.6 BIOLOGIA DOS SISTEMAS

Considerando os sistemas biológicos como complexos, e somado ao fato de que os dados obtidos a partir dos experimentos ômicos, como a metabolômica, necessitam ser interpretados de uma forma simples e mais completa, torna-se necessária a busca de ferramentas que possibilitem a visualização dos princípios biológicos básicos que regem um determinado organismo. Dessa maneira a biologia dos sistemas, busca observar, de uma forma bastante ampla, as relações entre os componentes de um sistema biológico e dos seus respectivos processos (MOREIRA, 2015).

Assim, após análise estatística e dentre a escolha das ferramentas computacionais disponíveis e gratuitas, os metabólitos significativos foram estudados

por meio das plataformas HMDB versão 3.0 e 4.0 (*The Human Metabolome Database* <http://www.hmdb.ca/>), KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* <http://www.genome.jp/kegg/>), e PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), para vincular os dados com as informações clínicas, químicas, biológicas, molecular/bioquímica e para a compreensão das vias biológicas correlacionadas com metabolismo das leucemias e/ou no metabolismo do câncer.

Para o enriquecimento nas vias biológicas foram utilizadas as bases do MBROLE 2.0 (*Metabolites Biological Role* - <http://csbg.cnb.csic.es/mbrole2/>) um servidor que realiza análise de enriquecimento funcional de uma lista de compostos químicos derivados de um experimento metabolômico, e que permite que esta lista seja interpretada em termos biológicos (LOPEZ-IBANEZ *et al.*, 2016). Foi utilizada também a base do MetaboAnalyst, uma outra aplicação abrangente para análise e interpretação de dados metabolômicos disponível gratuitamente na *web* (XIA e WISHART, 2016).

6 RESULTADOS

As matrizes dos dados metabólicos geradas no experimento (concentrações dos metabólitos) foram analisadas no *software* SIMCA-P (versão 14). Com a finalidade de estabelecer-se uma estratégia de análise estatística, que permitisse a identificação de uma “assinatura metabólica” diferenciada, individualizada para cada grupo analisado, antes da entrada dos dados no *software* SIMCA, foi realizada a separação dos resultados da população estudada em três grupos:

1º Grupo: LLC (n= 22) vs. CTRL (n=19)

2º Grupo: SMD (n=11) vs. CTRL (n=19)

3º Grupo: LLC (n= 22) vs. SMD (n=11)

Os resultados da média dos parâmetros laboratoriais do hemograma dos pacientes com LLC (Binet A B/C) e SMD estão demonstrados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados dos parâmetros do hemograma

Grupo	RBC (10 ⁶ / µL)	Hemoglobina (g/ L)	Global leucócitos (10 ³ / µL)	Linfócitos (10 ³ / µL)	Plaquetas (10 ³ / µL)
LLC (Binet A)	4,25	12,0	33,4	28,9	134
LLC (Binet B+C)	4,19	11,9	30,1	25,7	105
SMD	3,58	10,1	18,7	2,28	138
Valor referência*	4,7- 5,3	13,6- 15,3	3,6 -11,0	1,0 -4,5	140- 360

Fonte: O autor, 2018.

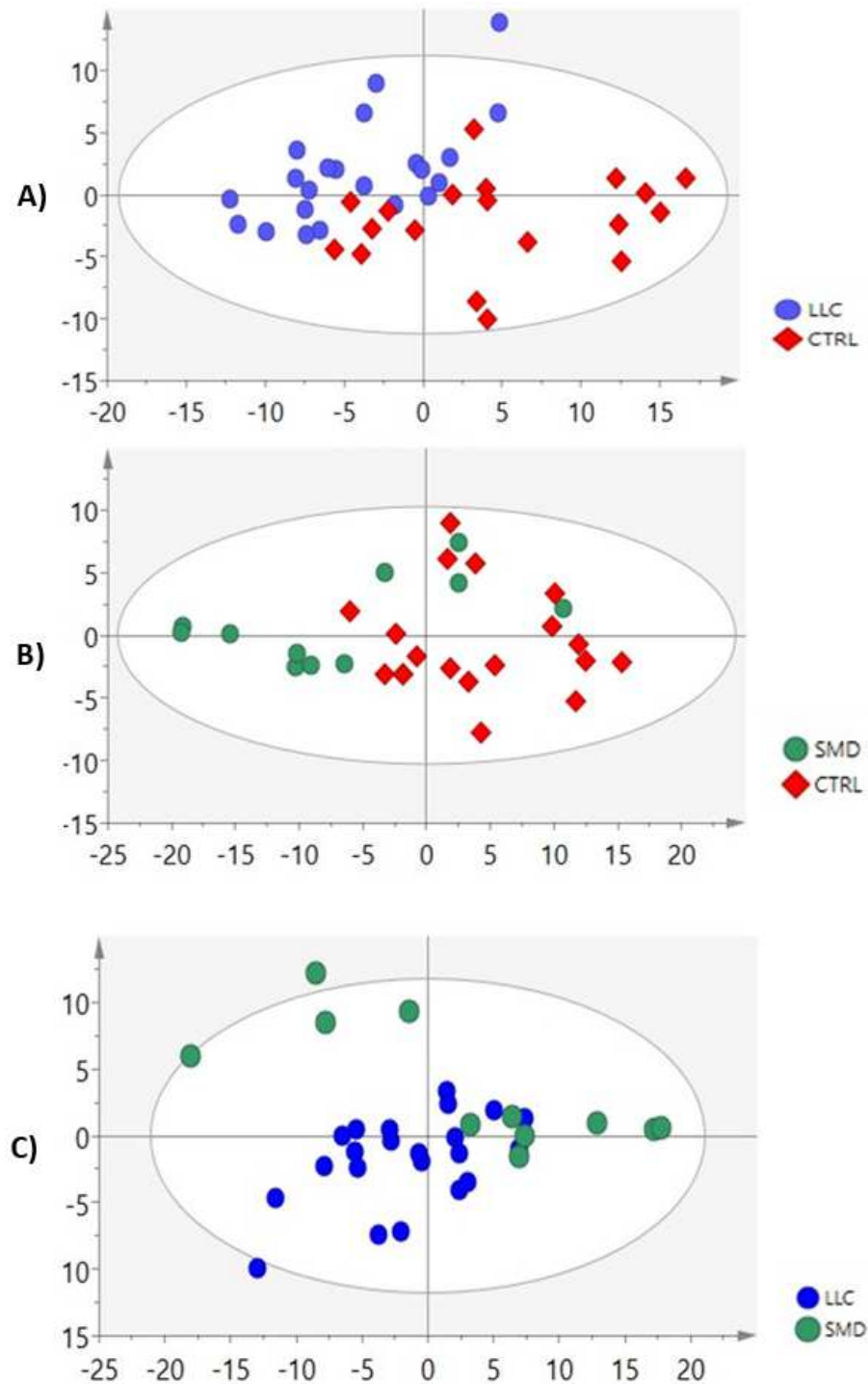
Legenda: *Fonte: FAILACE, 2015.

6.1 Análise Estatística Multivariada PCA, PLS-DA e OPLS-DA

Primeiramente foi realizada uma análise exploratória dos dados, com a totalidade das amostras para cada um dos três grupos, feita através do gráfico de escores (*score plot*) da análise multivariada não supervisionada, denominada análise de componentes principais (PCA), que agrupa as amostras de acordo com suas maiores similaridades. Dessa forma, os gráficos de PCA não representam necessariamente a separação originalmente buscada, mas sim, a segregação mais

significativa do ponto de vista estatístico. A Figura 20 (A, B, C) mostra o gráfico de *score plot* do modelo de PCA, para os três grupos construído com os dados obtidos com UPLC - MS/MS.

Figura 20 - Gráfico dos *escores plots* do modelo de PCA com as amostras de todos os pacientes da LLC, da SMD e dos indivíduos controle



Fonte: O autor, 2018.

Legenda: (A) Grupo: LLC vs. CTRL R^2 0,698 / Q^2 0,34 (B) Grupo: SMD vs. CTRL R^2 0,68 / Q^2 0,461 (C) Grupo: LLC vs. SMD R^2 0,617 / Q^2 0,413.

Como observado nos gráficos de PCA algumas amostras dos indivíduos controles aparecem misturadas com as amostras dos pacientes (Figura 20 – A e B) e alguns pacientes com SMD mesclam-se com os pacientes da LLC (Figura 20 – C). Além disso, observamos também a presença de amostras *outliers* nos grupos LLC vs. CTRL e LLC vs. SMD. No gráfico do PCA do grupo SMD vs. CTRL, visualizamos somente 18 símbolos dos indivíduos controles, devido a sobreposição de resultados de dois indivíduos controles (CTRL 84 e 89).

O PCA representa um modelo útil, pois, a partir dele é possível obter uma visão global dos dados multivariados. O coeficiente R^2 (da variação explicada pelo modelo) foi adequado nos três grupos ($R^2 > 0,5$) e o coeficiente Q^2 (previsibilidade do modelo) teve um desempenho aceitável, mas não totalmente satisfatório ($Q^2 < 0,5$).

Como o resultado do modelo do PCA com a totalidade das amostras para cada um dos três grupos formados ficou aquém do esperado, criou-se algumas estratégias de análise como: a exclusão dos *outliers*, de alguns pacientes e/ou indivíduos controles que apresentavam alguma tendência estatística para um grupo diferente do seu conjunto original. A criação dessas estratégias de análise foi buscando o objetivo de melhorar a separação dos grupos e aumentar a qualidade estatística na predição dos modelos de PCA, PLS-DA e OPLS-DA.

As estratégias estatísticas construídas para cada um dos três grupos 1º Grupo: LLC (n= 22) vs. CTRL (n=19); 2º Grupo: SMD (n=11) vs. CTRL (n=19) e 3º Grupo: LLC (n= 22) vs. SMD (n=11) para os modelos de PCA, PLS-DA e OPLS-DA com respectivo valor do desempenho dos parâmetros R^2 e Q^2 , bem como o número de metabólitos obtidos pela classificação na seleção *loading plot* e dos metabólitos VIP, estão com os resultados demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados das estratégias estatísticas para os modelos de PCA, PLS-DA e OPLS-DA construídas para os três grupos

A) 1º Grupo: LLC vs. CTRL

GRUPO	n	PCA		PLS-DA		OPLS-DA		Metabólitos	
		R ²	Q ²	R ²	Q ²	R ²	Q ²	Lista geral	VIP
LLC (todos) vs. CTRL (todos)	41	0,698	0,34	0,875	0,673	0,924	0,681	84	9
LLC (-119) vs. CTRL (todos)	40	0,615	0,359	0,878	0,659	0,878	0,659	98	9
LLC (-119) vs..CTRL (-71 71/74/75/76/78/79)	34	0,592	0,259	0,893	0,646	0,893	0,659	59	5
LLC (-119) vs. CTRL (somente 71/74/75/76/78/79)	27	0,627	0,312	0,944	0,892	0,944	0,891	107	2

Fonte: O autor, 2018.

B) 2º Grupo: SMD vs. CTRL

GRUPO	n	PCA		PLS-DA		OPLS-DA		Metabólitos	
		R ²	Q ²	R ²	Q ²	R ²	Q ²	Lista geral	VIP
SMD (todos) vs. CTRL (todos)	30	0,68	0,461	0,782	0,561	0,782	0,525	111	5
SMD (-137/144/145) vs. CTRL (todos)	27	0,657	0,503	0,826	0,546	0,622	0,587	162	9
SMD (-137/144/145) vs. CTRL (-81)	26	0,66	0,505	0,87	0,592	0,87	0,588	143	12

Fonte: O autor, 2018.

C) 3º Grupo: LLC vs. SMD

GRUPO	n	PCA		PLS-DA		OPLS-DA		Metabólitos	
		R ²	Q ²	R ²	Q ²	R ²	Q ²	Lista geral	VIP
LLC (todos) vs. SMD (todos)	33	0,617	0,413	0,851	0,49	0,666	0,428	56	2
LLC (-111/113/114/123/124/125/129/131/132) vs.SMD (todos)	24	0,699	0,477	0,909	0,689	0,909	0,686	85	5

Fonte: O autor, 2018.

A partir dos resultados das estratégias criadas, foi feita a escolha do melhor modelo estatístico na análise multivariada, para cada um dos três grupos, consubstanciado pelos critérios de melhor desempenho nos coeficientes R^2 e Q^2 , pela preservação do n amostral do grupo e pela avaliação qualitativa e quantitativa do ranqueamento dos metabólitos gerados. Dessa forma, o melhor modelo estatístico selecionado para cada um dos grupos está exposto na Tabela 16.

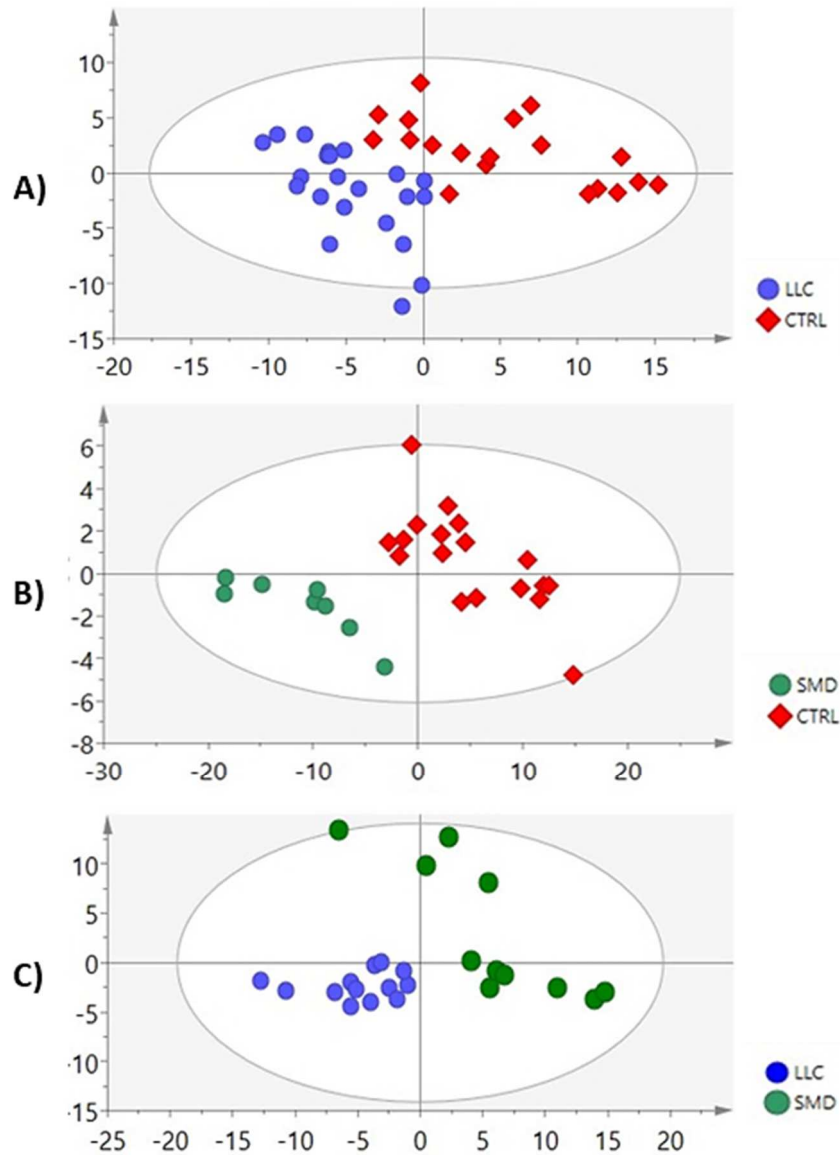
Tabela 16 - Resultado da seleção do melhor modelo estatístico na análise multivariada para cada um dos três grupos

GRUPO SELECIONADO	n	PCA		PLS-DA		OPLS-DA		Metabólito	
		R^2	Q^2	R^2	Q^2	R^2	Q^2	Lista geral	VIP
1º Grupo: LLC (todos) vs. CTRL (todos)	41	0,698	0,34	0,875	0,673	0,924	0,681	84	9
2º Grupo: SMD (-137/144/145) vs. CTRL (-81)	26	0,66	0,505	0,87	0,592	0,87	0,588	143	12
3º Grupo: LLC (-111/113/114/123/124/125/129/131/132) vs. SMD (todos)	24	0,699	0,477	0,909	0,689	0,909	0,686	85	5

Fonte: O autor, 2018.

Outra maneira de avaliar a variabilidade dos dados, o quanto cada grupo é diferente dos demais na análise, é por meio da construção do método supervisionado PLS-DA, isto é, que utiliza um conjunto de dados com parâmetros conhecidos (Lindon e Nicholson, 2008). O modelo do PLS-DA mostrou uma efetiva separação para os três grupos, apresentando um bom desempenho dos coeficientes R^2 e Q^2 (ambos superiores 0,5 para os três grupos). Os valores usuais para R^2 e Q^2 obtidos em experimentos biológicos são $Q^2 \geq 0,4$ e $R^2 \geq 0,7$ (JIMÉNEZ-CONTRERAS *et al.*, 2009). O resultado do modelo construído para o PLS-DA pode ser visualizado na Figura 21 (A, B, C).

Figura 21 - Modelos de PLS-DA construídos a partir da seleção do grupo



Fonte: O autor, 2018.

Legenda: A) Grupo: LLC vs. CTRL R^2 0,875 / Q^2 0,673 B) Grupo: SMD vs. CTRL R^2 0,87 / Q^2 0,592 C) Grupo: LLC vs. SMD R^2 0,909 / Q^2 0,689

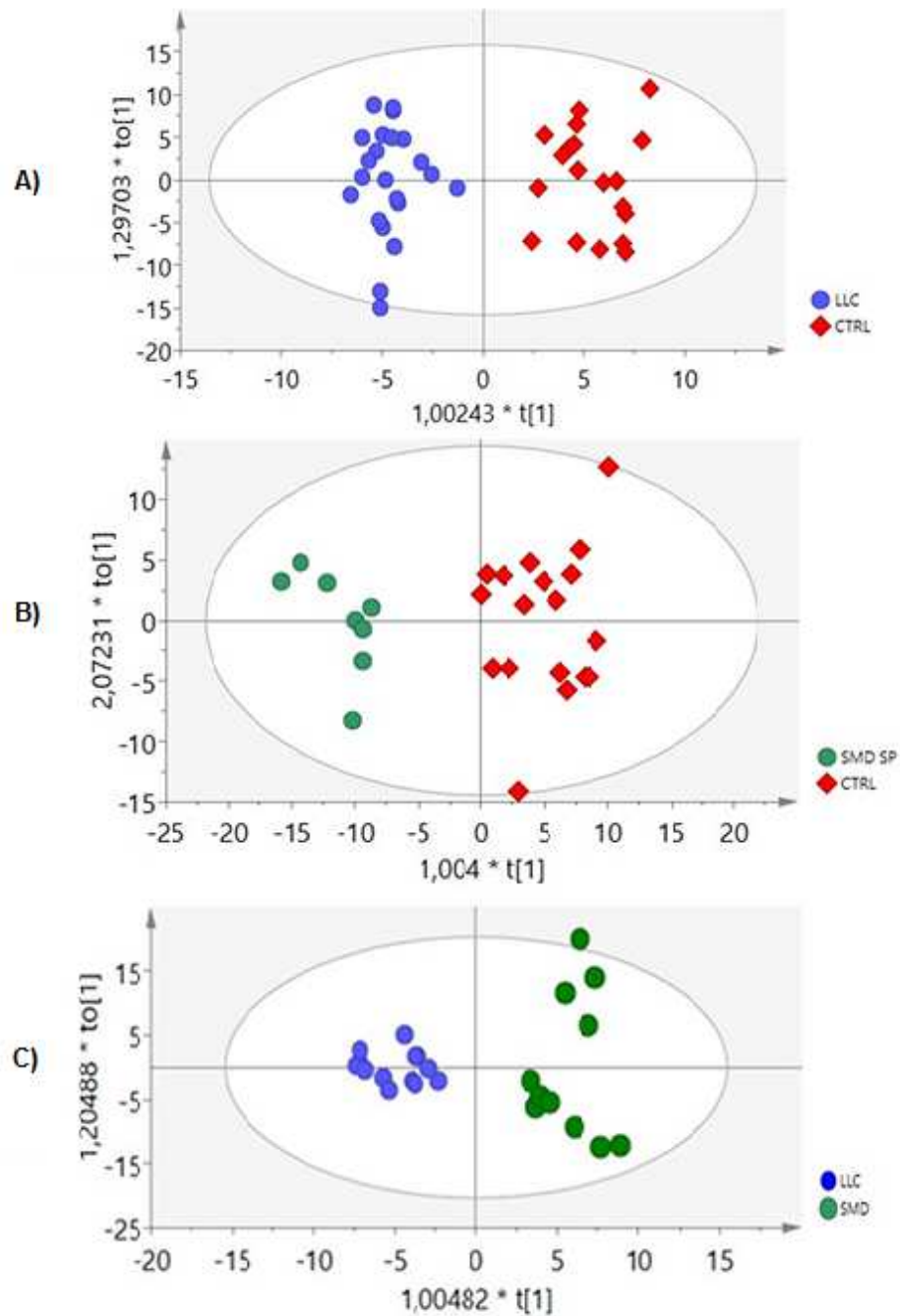
Outra extensão da estatística multivariada analisada foi OPLS-DA que integra um filtro de sinal de correção ortogonal para promover diferenciação entre as observações. A OPLS-DA foi introduzida como um aprimoramento do método PLS-DA. A vantagem em relação ao PLS-DA é a interpretação mais fácil do modelo, uma

vez que a complexidade da matriz de dados é reduzida, mostrando maior capacidade de separação entre os grupos (TRYGG e WOLD, 2002).

O PLS é aplicado para discriminar entre os grupos e os candidatos a biomarcadores, no entanto, nos estudos de metabolômica, para seleção de potencial biomarcadores e classificação de amostras, é preferível o modelo OPLS (GODZIEN *et al.*, 2013). Por isso, buscando-se otimizar ainda mais a separação dos grupos realizou-se o OPLS-DA que apresentou maior capacidade de separação. Foi por meio da OPLS-DA que foram selecionadas as principais variáveis que, em conjunto, mostram-se determinantes para o modelo de classificação de cada grupo. Também foi através da OPLS-DA que, criou-se o ranqueamento dos metabólitos significativos para o modelo, através da técnica *jack-knifing*, bem como também a seleção dos metabólitos candidatos à biomarcadores por VIP.

A visualização do resultado do modelo OPLS-DA apresentado na Figura 22 (A, B, C) permite confirmar que há uma separação entre os grupos.

Figura 22 - Modelos de OPLS-DA construídos a partir da seleção do grupo



Fonte: O autor, 2018.

Legenda: A) Grupo: LLC vs. CTRL R^2 0,924 / Q^2 0,681 B) Grupo: SMD vs. CTRL R^2 0,87 / Q^2 0,588 C) Grupo: LLC vs. SMD R^2 0,909 / Q^2 0,686.

6.2 Análise Estatística Univariada

Depois da análise multivariada, os dados foram submetidos à análise estatística univariada através do *software* MATLAB®, a fim de verificar a relevância de cada variável individualmente para cada grupo. Foram selecionados os metabólitos que obtiveram *p*-valor menor que 0,05. O número de metabólitos selecionados nessa etapa da análise estatística está demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17 - Número de metabólitos selecionados para cada grupo na análise estatística multivariada e univariada

GRUPO SELECIONADO	<i>n</i>	Análise Multivariada	Análise Univariada
		Nº metabólitos selecionados	Nº metabólitos selecionados
1º Grupo: LLC (todos) vs. CTRL (todos)	41	84	73
2º Grupo: SMD (-137/144/145) vs. CTRL (-81)	26	143	140
3º Grupo: LLC (-111/113/114/123/124/125/129/131/132) vs. SMD (todos)	24	85	70

Fonte: O autor, 2018.

A partir da seleção dos metabólitos estatisticamente significativos na análise univariada de cada grupo, foi feita a exploração do estudo para cada variável. Esse estudo foi realizado através da consulta nos bancos de dados HMDB, KEGG, MBROLE e MetaboAnalyst, para acessar as informações químicas, biológicas e clínicas de cada metabólito, bem como promover um avanço do trabalho à medida que permitiu uma conexão entre os dados gerados pela técnica analítica e os sistemas biológicos, como por exemplo a compreensão das vias biológicas.

6.3 Metabólitos significativos dos grupos

A lista dos metabólitos estatisticamente significativos obtidos para cada grupo, sua identidade, massa monoisotópica, fórmula química, *log fold change*, *fold change* e *p*-valor de cada variável estão mostradas nos Apêndice C (grupo LLC vs. CTRL), Apêndice D (grupo SMD vs. CTRL) e Apêndice E (grupo LLC vs. SMD).

6.4 Divisão das categorias químicas

Seis classes bioquímicas dos metabólitos (acilcarnitinas, aminoácidos, aminas biogênicas, fosfo e esfingolípídeos e hexoses) são quantificados pelo kit AbsoluteIDQ® p180 (Biocrates) e com relevância para aplicação nas principais áreas como na oncologia, cardiologia, diabetes e neurologia, permitindo assim o entendimento de diversos processos fisiopatológicos como a inflamação, a disfunção mitocondrial e controle do ciclo celular.

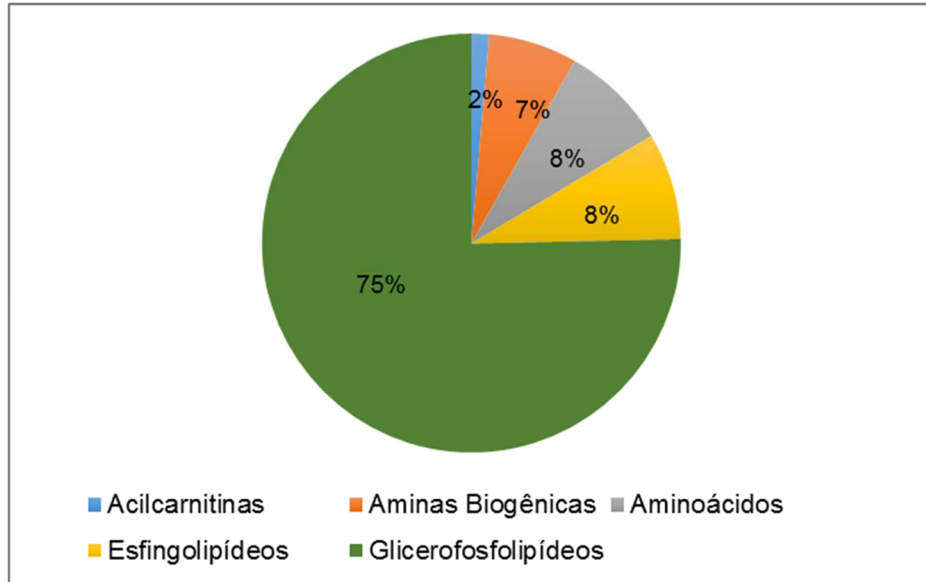
No grupo LLC vs. CTRL a classe química que teve mais representatividade foi a categoria dos glicerofosfolípídeos (75%), seguida por aminoácidos e esfingolípídeos (8% cada), aminas biogênicas (7%) e acilcarnitinas (2%).

Para o grupo SMD vs. CTRL a classe com maior notabilidade foi a classe dos glicerofosfolípídeos com 56%, com acilcarnitinas (18%), aminoácidos (11%) esfingolípídeos (10%) e aminas biogênicas (5%) na sequência.

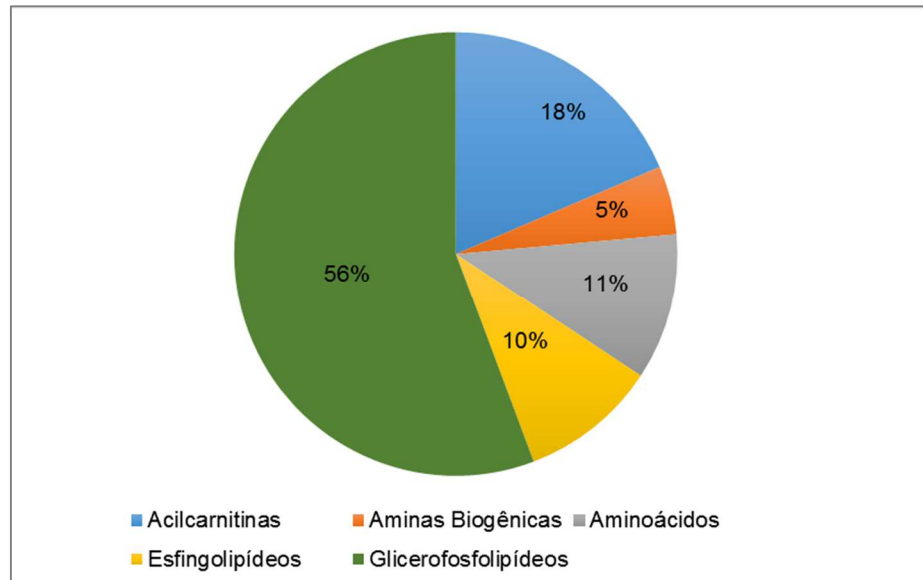
Já para o grupo LLC vs. SMD a distribuição das categorias químicas foi mais homogênea com 46% de glicerofosfolípídeos, acilcarnitinas (23%), esfingolípídeos (19%), aminoácidos (11%) e aminas biogênicas (1%). A representação do percentual da distribuição química para cada um dos três grupos está apresentada na Figura 23 (A, B, C).

Figura 23 - Representação da divisão das categorias químicas presentes em cada grupo

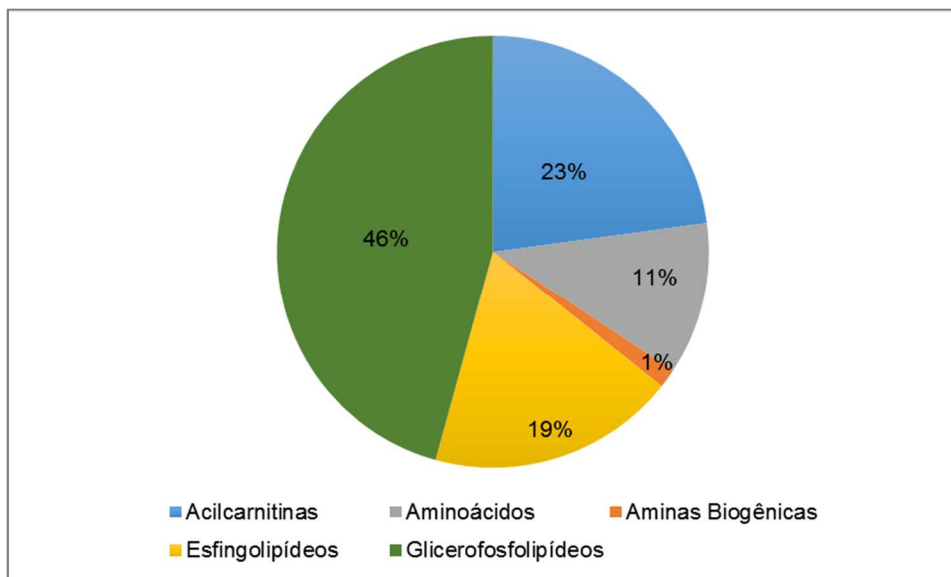
A) Grupo: LLC vs. CTRL



B) Grupo: SMD vs. CTRL



C) Grupo: LLC vs. SMD



Fonte: O autor, 2018.

6.5 Metabólitos com índice VIP

Como descrito anteriormente, foram considerados metabólitos com índice VIP (variáveis que apresentam valores mais distantes que 1 selecionados pela técnica “*jack-knifing*” e que têm uma maior influência na separação dos grupos. A Tabela 18 ilustra o resultado dessa análise para cada um dos grupos.

Tabela 18 - Lista dos metabólitos com índice VIP para cada um dos três grupos

Grupo	Categoria bioquímica	Metabólito	Índice VIP
LLC vs. CTRL	Aminas Biogênicas	Ac-Orn	1,66385
	Glicerofosfolídeos	lysoPC a C24:0	1,49232
	Glicerofosfolídeos	PC aa C26:0	1,46183
	Glicerofosfolídeos	PC ae C30:1	1,44847
	Glicerofosfolídeos	PC ae C34:3	1,34656
	Glicerofosfolídeos	PC ae C42:2	1,51107
	Glicerofosfolídeos	PC ae C42:3	1,60481
	Glicerofosfolídeos	PC ae C44:3	1,54547
	Aminas Biogênicas	Taurina	1,65323
SMD vs. CTRL	Glicerofosfolídeos	PC aa C36:1	1,31848
	Glicerofosfolídeos	PC aa C36:3	1,31428
	Glicerofosfolídeos	PC aa C36:6	1,20612
	Glicerofosfolídeos	PC aa C38:0	1,26804
	Glicerofosfolídeos	PC aa C38:3	1,261
	Glicerofosfolídeos	PC ae C32:1	1,22714
	Glicerofosfolídeos	PC ae C34:1	1,22289
	Glicerofosfolídeos	PC ae C36:0	1,31037
	Glicerofosfolídeos	PC ae C38:0	1,25873
	Glicerofosfolídeos	PC ae C40:2	1,23688
	Glicerofosfolídeos	PC ae C42:2	1,26347
	Esfingolipídeos	SM C16:0	1,23562
LLC vs. SMD	Glicerofosfolídeos	lysoPC a C18:1	1,46609
	Glicerofosfolídeos	PC ae C36:4	1,29473
	Glicerofosfolídeos	PC ae C38:5	1,32021
	Glicerofosfolídeos	PC ae C38:6	1,44088
	Esfingolipídeos	SM (OH) C14:1	1,41512

Fonte: O autor, 2018.

6.6 Metabólitos associados com vias do KEGG

Com o propósito de avaliar o comportamento do perfil metabólico na presença das doenças hematológicas LLC e na SMD foi pesquisado cada metabólito individualmente na base KEGG, buscando-se uma associação com as redes de interação molecular, principalmente com essas duas patologias. Os mapas do KEGG

para tipos específicos de câncer das doenças hematológicas descrevem até o momento consultado (*Last updated: October 11, 2017*) somente as vias da Leucemia mieloide aguda e Leucemia mieloide crônica. Dessa forma, optou-se por explorar a pesquisa, nessa base de dados, através de uma visão geral do câncer. Portanto, os metabólitos de cada grupo foram associados nas vias do metabolismo da colina no câncer e metabolismo central do carbono no câncer. Os metabólitos que aparecem vinculados à via do metabolismo da colina no câncer estão associados a importantes alterações genéticas nos oncogenes RAS e PI3K. Ao passo que os metabólitos com participação na via metabolismo central do carbono no câncer correlacionam-se com alterações genéticas nos oncogenes RAS, PI3K, AKT, c-Myc e nos genes supressores de tumor SIRT3, SIRT6, p53.

Para o grupo LLC vs. CTRL dos 73 metabólitos selecionados ($p < 0,05$), dez aparecem vinculados às duas vias acima citadas, sendo 05 aminoácidos e 05 glicerofosfolipídeos (01 VIP: LysoPC a C24:0). Já no grupo SMD vs. CTRL dos 140 metabólitos ($p < 0,05$), vinte e três mostraram-se relacionados às mesmas vias acima mencionadas, 11 pertencendo à classe dos aminoácidos e 12 à classe dos glicerofosfolipídeos (01 VIP: PC aa C36:1).

E, finalmente, no grupo LLC vs. SMD, dos 70 metabólitos ($p < 0,05$), quatorze metabólitos estavam associados às vias do câncer, equivalendo a 04 aminoácidos e 10 glicerofosfolipídeos (01 VIP: LysoPC a C18:1).

O nome dos metabólitos e suas respectivas ligações com as vias do metabolismo da colina no câncer e metabolismo central do carbono no câncer para cada um dos três grupos, estão demonstrados nos Apêndices F, G e H.

6.7 Análise na base de dados MBROLE

Com a finalidade de identificar os metabólitos relacionados com a leucemia, os metabólitos significativos ($p < 0,05$) de cada grupo formado foram submetidos à análise da biologia de sistemas realizada na base de dados MBROLE, para o enriquecimento das vias biológicas relacionadas às doenças e principais funções biológicas (molecular e celular) utilizando a base de dados *Homo sapiens* específica. Como resultado dessa análise, foi gerada uma tabela com os seguintes itens: anotação da palavra-chave na doença (seu registro na base de dados); a categoria a qual a palavra-chave pertence; *set* (mostra o número de compostos da entrada que

têm anotações ou registro nessa categoria); *in set* (mostra o número de compostos que possuem essa anotação particular nessa categoria); *p*-valor e FDR.

Como essa base de dados não possibilita até o momento que seja selecionada especificamente uma doença, como no caso do estudo da LLC e SMD, o resultado da análise mostrou se existe ou não uma associação estatística (*p*-valor e FDR) entre os metabólitos submetidos e as doenças de diversas categorias tais como doenças cardíacas, distúrbios neurológicos, erros inatos do metabolismo, doenças oncológicas e leucemias.

Para a lista de metabólitos submetidos nessa análise, para cada um dos grupos formados (LLC vs. CTRL; SMD vs. CTRL e LLC vs. SMD), alguns metabólitos da classe aminoácidos e um metabólito da classe aminas biogênicas (taurina) foram apontados como relacionados com a leucemia nos três grupos. A taurina foi único metabólito comum para os três grupos. O resultado dessa análise pela base MBROLE estão descritos na Tabela 19 e sua identidade mostrada na Figura 24.

Tabela 19 - Resultados para os três grupos das análises realizadas na base de dados MBROLE dos metabólitos associados com doenças

A) Grupo: LLC vs. CTRL

Anotação	Categoria	set	in set	p-valor	FDR
Leucemia	Doenças	9	6	5.24e-08	1.99e-06
Esquizofrenia	Doenças	9	6	1.51e-07	2.87e-06
Epilepsia	Doenças	9	5	6.91e-06	8.47e-05
Insuficiência cardíaca	Doenças	9	4	8.92e-06	8.47e-05
Intoxicação Paraquat	Doenças	9	3	5.16e-05	3.92e-04
Doença de Alzheimer	Doenças	9	5	2.20e-03	1.19e-02
Câncer de Pulmão	Doenças	9	3	6.78e-03	3.22e-02

B) Grupo: SMD vs. CTRL

Anotação	Categoria	set	in set	p-valor	FDR
Leucemia	Doenças	30	14	1.55e-15	8.53e-14
Epilepsia	Doenças	30	12	4.37e-11	1.20e-09
Esquizofrenia	Doenças	30	11	1.13e-09	2.07e-08
Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeias muito longas	Doenças	30	8	1.15e-08	1.58e-07
Insuficiência cardíaca	Doenças	30	7	1.96e-07	2.16e-06
Doença de Alzheimer	Doenças	30	14	2.04e-06	1.87e-05
Dengue	Doenças	30	3	7.32e-05	4.03e-04
Doença celíaca	Doenças	30	5	6.88e-05	4.03e-04
Intolerância à Proteína Lisinúrica	Doenças	30	3	7.32e-05	4.03e-04
Cistinúria	Doenças	30	3	2.84e-04	1.42e-03
Doença da Urina do Xarope do Bordo	Doenças	30	4	5.00e-04	2.29e-03
Hipotireoidismo	Doenças	30	3	1.56e-02	5.05e-02
Fenilcetonúria	Doenças	30	3	2.34e-02	6.77e-02
Câncer de pulmão	Doenças	30	4	4.83e-02	9.16e-02

C) LLC vs. SMD

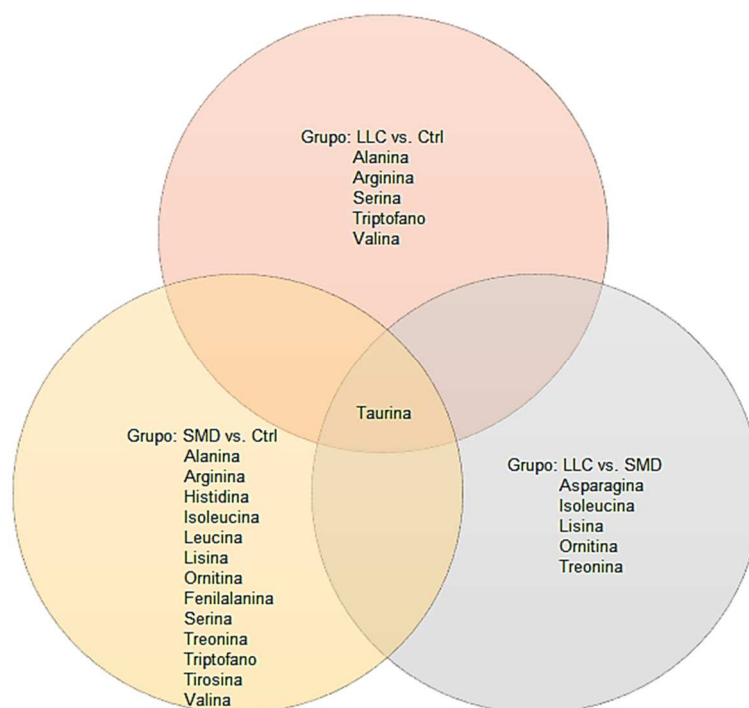
Anotação	Categoria	set	in set	p-valor	FDR
Epilepsia	Doenças	14	6	4.73e-06	2.72e-05
Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeias muito longas	Doenças	14	5	2.75e-06	2.72e-05
Esquizofrenia	Doenças	14	6	4.73e-06	2.72e-05
Leucemia	Doenças	14	6	1.68e-06	2.72e-05
Doença celíaca	Doenças	14	4	4.71e-05	2.17e-04
Doença de Alzheimer	Doenças	14	7	5.89e-04	2.26e-03
Insuficiência cardíaca	Doenças	14	3	1.66e-03	4.24e-03

Fonte: O autor, 2018.

Legenda:



Figura 24 - Identidade dos metabólitos associados com leucemia para cada grupo apontado pela análise no MBROLE



Fonte: O autor, 2018.

Legenda: Visão geral da identidade dos metabólitos apontados pelo MBROLE (*in set*) para cada grupo.

Como resultado das principais funções biológicas (molecular e celular) apontadas pela base MBROLE, foram identificadas 06 principais vias biológicas para os três grupos: 1) síntese de proteínas (transcrição e tradução), 2) Síntese de RNA transportador, 3) Metabolismo de aminoácidos, 4) Ciclo da ureia, 5) Biossíntese de metabólitos secundários, 6) Metabolismo de lipídeos. O número de metabólitos presentes em cada via está demonstrado na Tabela 20.

Tabela 20 - Principais vias biológicas apontadas pelo MBROLE dos metabólitos significativos dos três grupos

Nome da via	Nº metabólitos	p-valor	FDR
Síntese de proteínas (transcrição e tradução)	16	0.00E+00	0.00E+00
Síntese de RNA transportador	17	0.00E+00	0.00E+00
Metabolismo de aminoácidos	21	1.13E-04 - 9.63E-04	1.16E-03 - 4.94E-03
Ciclo da ureia	6	1.92E-05	2.62E-04
Biossíntese de metabólitos secundários	19	2.89E-08	4.24E-07
Metabolismo de lipídeos	7	3.88E-01 - 4.74E-01	4.68E-01 - 5.84E-01

Fonte: O autor, 2018.

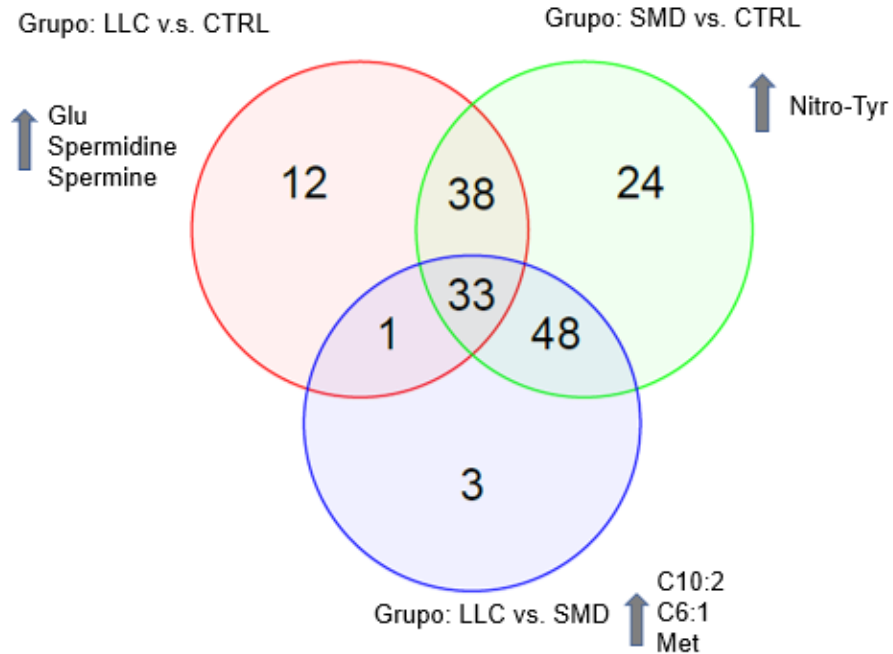
6.8 Diagrama Venn e Mapa de calor

No intuito de uma melhor demonstração das relações de união, exclusividade e de interseções entre os metabólitos pertencentes a cada um dos grupos formados (LLC vs. CTRL, SMD vs. CTRL e LLC vs. SMD), foi realizado o Diagrama Venn. Doze metabólitos foram apontados como exclusivos do grupo LLC vs. CTRL sendo eles: C12-DC, Creatinina, Glu, PC aa C26:0, PC aa C42:0, PC aa C42:1, PC ae C42:4, PC ae C42:5, PC ae C44:4, PC ae C44:6, espermidina e espermina.

Para o grupo SMD vs. CTRL, vinte e quatro metabólitos aparecem como exclusivos do grupo sendo eles: C10:1, C12:1, C14:2, C14:2-OH, C16:2, C2, C4-OH-Pro, C5:1, C5-DC (C6-OH), C5-M-DC, C6 (C4:1-DC), C7-DC, C8, C9, Kinurenine, Leu, Nitro-Tyr, PC aa C24:0, PC aa C34:4, PC aa C36:2, PC aa C36:5, Pro, SDMA, SM C20:2.

Para o grupo LLC vs. SMD, somente três metabólitos são exclusivos desse grupo sendo eles: C10:2, C6:1 e metionina. Exclusivo do grupo não quer dizer necessariamente que todos os metabólitos têm maior concentração. O panorama da distribuição numérica dos metabólitos pertencentes a cada grupo e dos que se destacam com as maiores concentrações está demonstrado na Figura 25.

Figura 25 – Diagrama de Venn

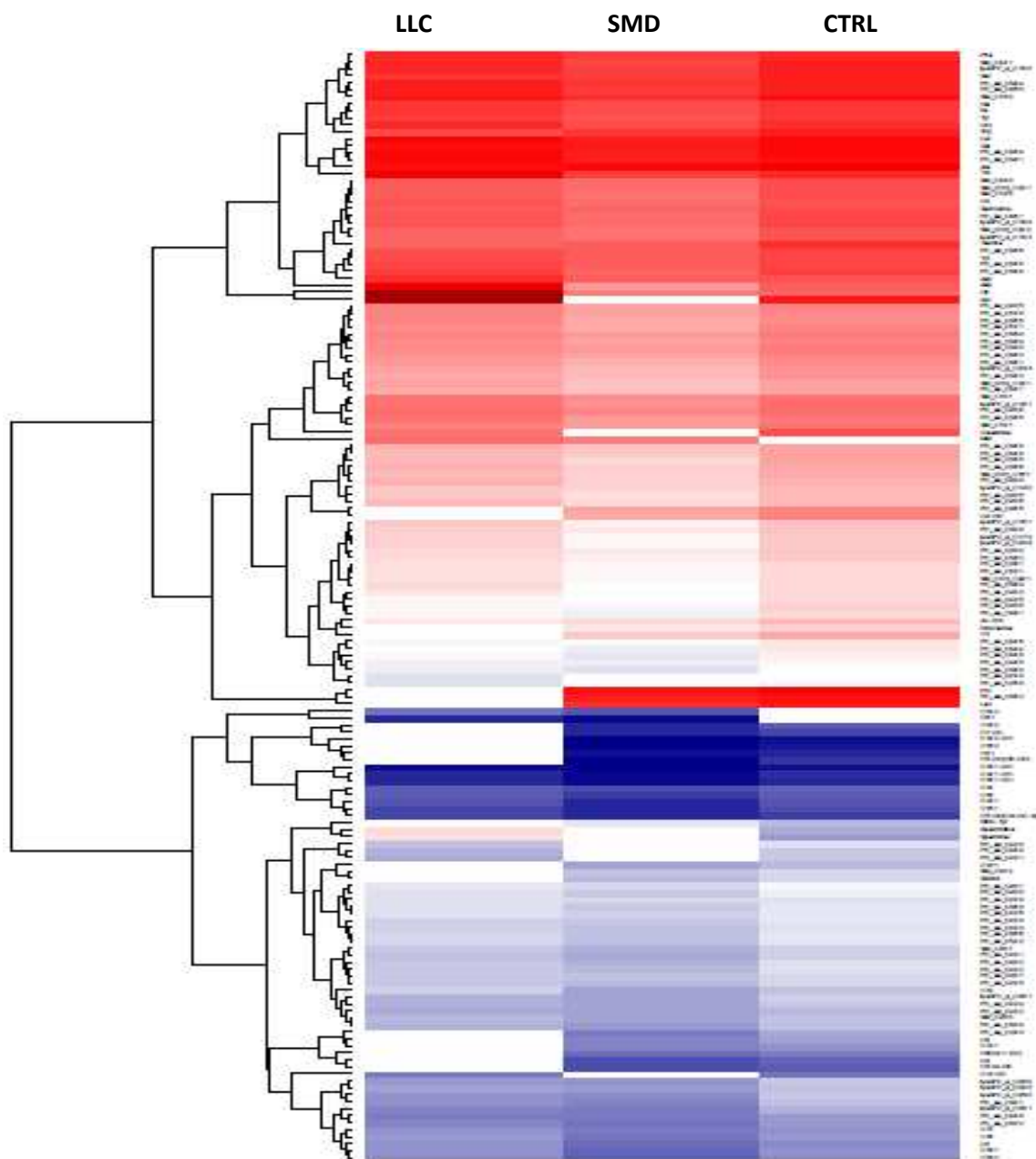


Fonte: O autor, 2018.

Para melhor visualização das variáveis (metabólitos) que apresentaram as maiores concentrações dentro de cada amostragem (LLC, SMD e CTRL) foi realizada a representação gráfica denominada mapa de calor ou também conhecidos como *heatmap*, conforme demonstrado na Figura 26.

Os metabólitos que se destacaram pela maior concentração para os pacientes com LLC são: aspartato, citrulina, glutamato, espermidina, espermina, asparagina e treonina. Já para os pacientes com SMD, os metabólitos parecem ter mais homogeneidade com o grupo controle.

Figura 26 – Mapa de calor (*heatmap*) para os 159 metabólitos mais relevantes estatisticamente gerados pelo modelo da classificação multivariada, segundo a análise realizada no SIMCA



Legenda: *Color key*



Fonte: O autor, 2018.

Legenda: A cor vermelha está associada com maiores concentrações e a cor azul associada com as menores concentrações. No lado direito do mapa está descrito a relação dos metabólitos estatisticamente significativos. No lado esquerdo do mapa está o dendrograma, mostrando com maior separação dois agrupamentos de clusters de metabólitos.

7 DISCUSSÃO

Diferentes células do sistema imunológico podem adotar configurações metabólicas distintas, permitindo que a célula equilibre suas necessidades de energia, biossíntese molecular e longevidade (LOFTUS, 2016). Nesse cenário as alterações do metabolismo celular são características de quase todos os tipos de câncer. Esforços têm sido feitos para compreender a fisiopatologia das leucemias, no entanto o conhecimento gerado ainda não permite o entendimento completo de suas patogêneses. Nesse estudo, apresentamos a análise do perfil metabólico no contexto da LLC e SMD, neoplasias hematológicas muito prevalentes em idosos, mas de quadro laboratorial distinto.

Na avaliação dos resultados multivariados (SIMCA) do grupo LLC vs. CTRL, sete metabólitos (C12-DC, espermina, espermidina, citrulina, glutamato, treonina e asparagina) apresentaram maiores concentrações na LLC do que nos indivíduos controles, conforme demonstrado no valor *fold change* (Apêndice C, *fold change* > 1,00).

Para o grupo SMD vs. CTRL somente um metabólito (nitrotirosina) apresentou concentração maior para SMD (Apêndice D *fold change* >1,00). Quando examinados os metabólitos do grupo LLC vs. SMD, dez deles apresentaram concentrações mais elevadas na LLC do que na SMD: asparagina, aspartato, citrulina, treonina, ornitina, C10, C14:1, C16:1, C18:1, C18:2 (Apêndice E - *log fold change*>1,00).

Em relação a análise realizada no banco de dados do KEGG, para a associação dos metabólitos de cada grupo (LLC vs. CTRL, SMD vs. CTRL e LLC vs. SMD) nas vias do metabolismo do câncer, basicamente duas classes químicas foram apontadas: aminoácidos e glicerofosfolipídeos. Os aminoácidos alanina, arginina, serina, triptofano e valina (para o grupo LLC vs. CTRL); alanina, arginina, aspartato, histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, serina, triptofano, tirosina e valina (para o grupo SMD vs. CTRL) e asparagina, aspartato, isoleucina, fenilalanina (para o grupo LLC vs. SMD) aparecem associados na via do metabolismo central do carbono no câncer com as alterações genéticas nos oncogenes (RAS, PI3K, AKT, c-Myc) e nos genes supressores de tumor (SIRT3, SIRT6, TP53). A classe dos glicerofosfolipídeos

(lisofosfatidilcolina - LysoPC - e fosfatidilcolinas – PC) mostrou-se relacionada com a via do metabolismo da colina no câncer com alterações nos oncogenes RAS e PI3K.

Desta forma, os resultados revelaram 04 classes bioquímicas (acilcarnitinas, aminas biogênicas, aminoácidos e glicerofosfolipídeos) que tiveram destaque por associação com as leucemias e com as vias câncer.

Em outra avaliação dos resultados foi observada alguns “pacientes *outliers*” no gráfico de PCA (01 paciente no grupo LLC vs. CTRL e 02 pacientes no grupo LLC vs. SMD). Não foi possível identificar pela abordagem da metabolômica *target*, e pela limitação dos dados clínicos - laboratoriais, se haveria algum metabólito diferenciador nesses pacientes ou algum outro marcador (bioquímico, hematológico, genético) que os diferenciasse dos demais pacientes do estudo.

7.1 Acilcarnitinas, leucemias e câncer:

As acilcarnitinas que apareceram mais elevadas na LLC foram: C12-DC (no grupo LLC vs. CTRL) e C10, C14:1 C16:1, C18:1, C18:2 (no grupo LLC vs. SMD). Não foi observada sua elevação para os pacientes com SMD.

Estas são formadas a partir de carnitina e acil-CoA pela carnitina aciltransferase na mitocôndria ou peroxissomas. A carnitina é uma amina naturalmente produzida pelo organismo a partir dos aminoácidos lisina e metionina ou obtida da dieta alimentar, sendo sua principal função a transferência de ácidos graxos de cadeia longa para as mitocôndrias para β -oxidação e produção de energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP). A carnitina participa de inúmeros outros processos metabólicos tais como metabolismo de carboidratos, aminoácidos de cadeia ramificada e cetogênese (BERTOLINI, 2004; SEMBA *et al.*, 2017). O sistema de enzimas do circuito da carnitina é responsável pela entrega do ácido graxo de cadeia longa do citoplasma para mitocôndria para oxidação, onde a carnitina acil-transferase I (CAT I) catalisa o passo limitante da taxa de oxidação de ácidos graxos. A CAT I ativa a oxidação dos ácidos graxos e alimenta o crescimento da célula tumoral via produção de ATP e NADPH, constituindo uma parte essencial da adaptação do metabolismo do câncer. Pesquisas recentes apontam para o papel crucial da oxidação dos ácidos graxos como fonte essencial de NADH, FADH₂, NADPH e ATP, com todos fornecendo vantagem de sobrevivência para a célula tumoral (QU, Q. *et al.*, 2016).

As acilcarnitinas são geralmente consideradas uma forma de transporte de ácidos graxos e podem ser utilizadas para produção de energia nas mitocôndrias ou

para a síntese de moléculas endógenas; elas também podem ser transportadas dos tecidos para o plasma. Uma vez que o metabolismo dos ácidos graxos, glicose e aminoácidos pode produzir acilcarnitinas, sua concentração no plasma é determinada pelo estado nutricional e por contribuições teciduais ou específicas do órgão. Historicamente, um aumento na concentração de acilcarnitinas tem sido usado como marcador de oxidação incompleta de ácidos graxos para diagnosticar defeitos de oxidação de ácidos graxos congênitos. Um aumento na concentração plasmática de acilcarnitinas tem sido associado à progressão de várias doenças incluindo resistência à insulina, às doenças cardiovasculares (MAKRECKA-KUKA *et al.*, 2017) e às leucemias (KARLIKOVA *et al.*, 2016). Tem sido proposto que as concentrações plasmáticas de acilcarnitinas (particularmente as de cadeia média e longa) podem prever o padrão de metabolismo energético intracelular e podem ser usadas como um marcador de disfunção metabólica (MAKRECKA-KUKA *et al.*, 2017).

As acilcarnitinas foram validadas em estudo realizado por *Piszczyk et al. (2016)* estando significativamente aumentadas no soro de pacientes com a forma agressiva da LLC em relação a sua forma indolente, mostrando-se um grupo de promissores biomarcadores. Um aumento de acilcarnitinas também foi observado no plasma em estudo realizado por *Karlikova et al. (2016)* para avaliar resposta ao tratamento com o uso de imatinibe em pacientes com Leucemia mieloide crônica.

Considerando as evidências da literatura, os dados obtidos neste estudo corroboram e permitem sugerir um distúrbio na oxidação dos ácidos graxos na LLC. Isto pode ser verificado pela elevada concentração plasmática de acilcarnitinas, possivelmente sendo uma forma alternativa de substrato para a produção de energia das células leucêmicas. O processo de oxidação dos ácidos graxos tem um importante papel na produção de energia durante os períodos de jejum ou quando os níveis de glicose estão esgotados. Este aumento dos níveis plasmáticos de acilcarnitinas também pode ser tanto um indicativo de atividade enzimática defeituosa, causando o acúmulo no plasma de acil-CoAs, quanto um aumento da carga dietética do seu precursor (carnitina). Ou ainda ser um reflexo de uma descompensação clínico-metabólica desses pacientes.

7.2 Aminas Biogênicas, leucemia e câncer:

As aminas biogênicas (também chamadas aminas bioativas ou poliaminas) são assim chamadas devido a sua origem biológica atuando em processos metabólicos com diferentes funções fisiológicas. Sua formação é essencialmente resultado da descarboxilação enzimática de aminoácidos livres e da transaminação de aldeídos e cetonas, sendo classificadas em função do número de grupamentos amina presentes e da estrutura química (CARDOZO *et al.*, 2013). O nível celular adequado de poliaminas é alcançado através do balanço entre sua biossíntese, degradação e captação. O aminoácido ornitina é o principal precursor das poliaminas, e dentre as enzimas que fazem parte do processo de formação das poliaminas a ornitina descarboxilase (ODC) além de ser a enzima limitante, também é a enzima chave para a síntese de putrescina, espermidina e espermina (CASERO e MARTON, 2007; GUERRA *et al.*, 2016).

As aminas biogênicas apresentam importante função no crescimento e sobrevivência celular, sendo associadas com ácidos nucleicos, manutenção da conformação da cromatina, regulação da expressão gênica, regulação dos canais iônicos e manutenção da estabilidade da membrana além de interagir, no meio biológico, com muitas macromoléculas. Como consequência dessa interação, as poliaminas desencadeiam uma variedade de efeitos celulares (CASERO e MARTON, 2007). A complexidade do metabolismo das poliaminas e os vários mecanismos compensatórios que participam da manutenção da homeostase das poliaminas em funções celulares normais e em doenças relacionadas ao sistema imunológico indicam que estas aminas são críticas para a sobrevivência celular. Altos níveis de poliaminas se manifestam em células tumorais bem como células B e T (HESTERBERG *et al.*, 2018).

Estudo realizado por *Bergeron et. al.* (1997) mostrou que o aumento dos níveis de espermidina e espermina nas hemácias pode ser usado para avaliação do prognóstico dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda, uma vez que 90% da circulação de espermidina e espermina são transportadas pelas hemácias. Normalmente a espermina não é liberada pelas células, a menos que as células percam sua viabilidade. Baixos níveis de espermina em células leucêmicas podem permitir apoptose espontânea e aumentar a sensibilidade a medicamentos alquilantes ao passo que altos níveis de espermina em células leucêmicas podem aumentar a

resistência à quimioterapia por “proteger” o DNA de sofrer fragmentação (BERGERON *et al.*, 1997).

Estudos revelaram que o oncogene c-Myc coordena a transcrição das quatro enzimas responsáveis pela biossíntese das poliaminas entre elas a ODC (NILSSON *et al.*, 2005). A ODC por ser a principal enzima que regula a síntese das poliaminas, tem sido alvo de intervenção terapêutica no tratamento do câncer com o uso do inibidor o difluormetilornitina (DFMO) (CHO *et al.*, 2018).

Estudo realizado por Nitta *et al.* (2001), para avaliar o envolvimento das poliaminas na apoptose mediada por receptores BCR nas células B, demonstrou em modelo *in vitro* com linhagem de células B que durante a apoptose os genes envolvidos na biossíntese de poliaminas estavam *downregulated*, enquanto aqueles envolvidos no catabolismo estavam *upregulated*, sugerindo que a diminuição dos níveis intracelulares de poliaminas desempenham um papel na apoptose induzida através do receptor BCR, por reduzir a função mitocondrial na capacidade de ativação das caspases, resultando em prisão do ciclo celular ou na apoptose.

Neste estudo foi observado níveis elevados de aminas biogênicas como espermidina e espermina entre os pacientes com LLC, enquanto níveis elevados de nitrotirosina foram observados entre os pacientes com SMD.

A espermina desempenha um papel importante em muitos processos celulares incluindo a regulação da transcrição e tradução, controle da atividade dos canais iônicos, modulação da atividade das quinases, proteção contra danos oxidativos, manutenção e função das membranas, contribuindo para estrutura/estabilidade do ácido nucleico além de ser importante na regulação dos fosfolipídios (PEGG, 2014).

Níveis elevados de espermina também foram encontrados em estudo realizado por Pirnes-Karhu *et al.* (2014), com células de pacientes com leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica e leucemia linfoblástica aguda indicando um distúrbio no metabolismo de poliaminas nas leucemias humanas.

Os níveis de poliaminas, espermina e espermidina sintetizados em pequenas quantidades por células saudáveis foram elevados em pacientes com LLC em outro estudo realizado por Tili *et al.* (2012) com cultura de células de pacientes em dois estágios da doença (baixo risco e alto risco) provavelmente sustentado pelo aumento na síntese de poliaminas (TILI *et al.*, 2012).

Dessa forma, os dados aqui encontrados reforçam que níveis elevados de espermidina e espermina podem apontar para um aumento da proliferação celular ou

talvez sinalizar para uma inibição dos mecanismos apoptóticos nos linfócitos B através do receptor BCR.

A nitrotirosina relacionada ao estresse oxidativo é um produto da ação de nitração causada por radicais livres como o ânion peroxinitrito e dióxido de nitrogênio em resíduos de proteínas. É detectada em algumas condições patológicas, como no câncer, e é considerada como um marcador de estresse oxidativo dependente de óxido nítrico. Estudo realizado por *Li et al.*, (2005) mostrou que a positividade para nitrotirosina em tecidos pode estar associada a uma pior sobrevida no câncer gástrico.

Os resultados desse estudo permitem sugerir que a medição dos níveis plasmáticos das poliaminas especialmente espermina e espermidina pode ser um importante marcador do ciclo celular em pacientes com leucemias. A elevação dos seus níveis possivelmente seja em decorrência da proliferação celular, sinalizando um avanço na progressão da doença ou ainda um indicador da maior sobrevivência celular, como é observado na LLC. Enquanto que o aumento de nitrotirosina nos pacientes com SMD talvez indique a presença de elementos envolvidos na modulação do estresse oxidativo no microambiente tumoral.

7.3 Aminoácidos, leucemias e câncer

Uma das funções dos aminoácidos é servir como fonte de energia celular. A regulação sistêmica e os níveis locais de aminoácidos modulam o sistema hematopoiético, incluindo a atividade das células-tronco hematopoéticas (CTH) (KARIGANE e TAKUBO, 2017). Pacientes com câncer têm alterações nas concentrações de aminoácidos dependentes do tipo da doença. O perfil de aminoácidos frequentemente é correlacionado com o órgão de origem entre os diferentes tipos de câncer. É possível monitorar e avaliar pacientes com câncer antes e após o tratamento usando o metabolismo dos aminoácidos presentes em determinado período do metabolismo (GU *et al.*, 2015). A medição dos níveis de vários aminoácidos usando HPLC revelou que a medula óssea contém concentrações 100 vezes maiores do que a concentração do sangue periférico, em relação a todos os 20 aminoácidos. Entre eles, a valina é necessária para a proliferação da CTH *in vitro* e para a capacidade de repovoamento da medula óssea após transplante *in vivo* (TAYA *et al.*, 2016).

Apesar de existir vasta literatura sobre as concentrações plasmáticas de aminoácidos em várias condições fisiológicas ou patológicas, frequentemente afirma-

se que os níveis plasmáticos de aminoácidos são de difíceis de interpretação. O fundamento dessa afirmação é que o pool plasmático de aminoácidos livres é muito pequeno em comparação com o pool intracelular de aminoácidos livres, que por sua vez é pequeno em comparação com a associação de aminoácidos às proteínas, sendo que os três estão em equilíbrio. Além disso, os aminoácidos são submetidos a várias trocas dentro do organismo, o que dificulta ainda mais a interpretação dos valores estáticos no plasma (CYNOBER, 2002). Tal como acontece com a maioria dos nutrientes, as concentrações plasmáticas de aminoácidos estão sujeitas à homeostase. Isso significa que, em situações fisiológicas, as concentrações de cada aminoácido variam dentro de limites fixos e são rigorosamente regulados. As concentrações plasmáticas dos aminoácidos são o resultado da sua taxa de aparecimento (R_a) menos sua taxa de desaparecimento (R_d) do plasma. A taxa de R_a depende de dois fatores: a ingestão de proteínas e da sua liberação pelos tecidos, principalmente os músculos. Já taxa R_d é a soma da oxidação dos aminoácidos, do metabolismo, da incorporação dos aminoácidos nas proteínas e, em menor medida, da perda de aminoácidos na urina, fezes, etc. (CYNOBER, 2002). A força motriz que contribui para manutenção da concentração de aminoácidos no plasma tem regulação hormonal, tais como insulina, cortisol, glucagon, hormônios tireoide e hormônio do crescimento (CYNOBER, 2002).

A disponibilidade de aminoácidos para células é um importante recurso para à síntese de proteínas; sua absorção pelas células é determinante para a função celular. Além disso, os aminoácidos podem servir como fontes de metabólitos que entram em processos metabólicos, como o ácido tricarboxílico (TCA). Esses processos celulares que demandam energia devem ser rigidamente regulados, exigindo que a célula detecte a abundância de aminoácidos disponíveis, tanto extracelular como intracelular. Estudos recentes começaram a identificar aminoácidos específicos (leucina, glutamina e arginina) e seus transportadores como sendo críticos na regulação da homeostase e função das células T (WEI, Jun *et al.*, 2017).

Os aminoácidos com níveis elevados de citrulina, asparagina, aspartato, glutamato e treonina foram observados entre os pacientes com LLC.

A citrulina é um aminoácido não essencial e não proteico que participa do ciclo da ureia. Por ser um precursor da arginina, pode desempenhar um papel importante no metabolismo e na regulação do óxido nítrico (NO) (BAHRI, SENDA *et al.*, 2013). Em decorrência de pesquisas pela procura de um melhor diagnóstico para a síndrome

do intestino curto, esse aminoácido foi ganhando destaque, uma vez que seu metabolismo ocorre no epitélio intestinal (BAILLY-BOTUHA, CÉLINE *et al.*, 2009). O metabolismo da citrulina é dividido entre o intestino (síntese) e o rim (degradação). Devido a essa especificidade, a citrulina pode atuar como um marcador funcional confiável para esses dois órgãos. A citrulina é convertida em arginina nos rins, por isso pode ser usada como precursor do óxido nítrico (BAHRI, SENDA *et al.*, 2013). Pesquisas sugerem que o estado imunológico pode ser melhorado em situações de estresse, fornecendo citrulina aos linfócitos T (BANSAL, VISHAL *et al.*, 2004). Foi relatado um aumento na citrulina plasmática como um potencial marcador de função renal, um aumento significativo de citrulina de forma proporcional ao estágio da doença, correlacionado com a concentração plasmática de creatinina para diagnóstico precoce de doença renal crônica (LAU, TITUS *et al.*, 2000; BENITO, S. *et al.*, 2018).

A citrulina plasmática não reflete apenas a perda de células intestinais, também está fortemente correlacionada com parâmetros inflamatórios. Em adultos, a citrulina plasmática tem sido um marcador útil para avaliar injúria da barreira de mucosas. Em estudo realizado com pacientes que receberam transplante de medula óssea seguido de intensa terapia mieloablativa foi observado um declínio significativo nas concentrações séricas de citrulina. Clinicamente, esses pacientes apresentaram mucosite oral, intestinal e maior risco para infecção (BLIJLEVENS, *et al.*, 2004). Em outro estudo também foi observado uma diminuição dos níveis plasmáticos de citrulina após altas doses de quimioterapia em crianças com Leucemia mieloide aguda, sendo sua diminuição relacionada com critérios definidos para efeitos adversos da mucosa intestinal (VAN VLIET *et al.*, 2009).

Níveis aumentados dos aminoácidos asparagina e treonina foram encontrados elevados em ar exalado por crianças com Leucemia linfoblástica aguda em estudo realizado por Konieczna *et al.*, (KONIECZNA *et al.*, 2018). Esses mesmos aminoácidos com níveis aumentados foram igualmente revelados neste estudo no plasma dos pacientes com LLC.

O glutamato, um aminoácido não essencial, é um importante substrato bioenergético para a proliferação de células normais e neoplásicas também é um neurotransmissor excitatório que está ativamente envolvido em vias de sinalização e oncogênicas. Recentes estudos comprovaram que a sinalização do glutamato não é limitada somente ao sistema nervoso central, apontando a existência de receptores

de glutamato em órgãos periféricos e células neoplásicas (STEPULAK *et.al.*,2014). Foi demonstrado em estudo realizado que as subunidades do receptor de glutamato são expressas em uma variedade de linhagens de células de câncer e tumores, bem como neoplasias do sangue, como leucemia e linfoma (GANOR *et.al.*,2009).

O glutamato pode ser sintetizado a partir da glutamina ou pelo α -cetoglutarato por transaminação. O destino do glutamato nas células depende da condição metabólica, podendo seguir pelo metabolismo oxidativo ou através do ciclo Krebs gerar ATP ou ser transformado em glutamina. As células cancerígenas têm um metabolismo de glutamina alterado, provavelmente como consequência do fenótipo glicolítico. Nas células cancerígenas, a glicose é convertida preferencialmente em piruvato e lactato em vez de ser metabolizada no ciclo de Krebs (STARKOVA, JULIA *et.al.*, 2018). A dependência de glutamina pelas células cancerosas foi de fato observada. Concentrações extracelulares elevadas de glutamina promovem o crescimento do tumor. A expressão aumentada das enzimas que participam do metabolismo da glutamina se correlaciona com a transformação celular (WISE, DAVID R. *et.al.*, 2010).

Os resultados apontam um aumento dos aminoácidos asparagina, aspartato, citrulina, glutamato e treonina na LLC. É possível sugerir que talvez o aumento desses aminoácidos seja um marcador característico do fenótipo dessas células leucêmicas, muito provavelmente em função de uma mudança metabólica dos linfócitos B para atender à demanda energética devido a sua maior sobrevivência. Também poderia ser reflexo do aumento da resposta inflamatória ou da proliferação celular ou ainda, de alterações provocadas simultaneamente. São hipóteses que só o aprofundamento dos estudos poderá responder. Mesmo assim, essas observações desde já podem ter alguma relevância clínica, uma vez que nos permitiu maior entendimento da fisiopatologia da doença, o que futuramente poderá auxiliar na compreensão da severidade dos sintomas e no manejo das manifestações clínicas e do tratamento.

7.4 Lipídeos, leucemias e câncer

Outra classe de metabólitos abordada no estudo foi a classe química dos glicerofosfolipídeos (LysoPC - lisofosfatidilcolina e PCs - fosfatidilcolinas), apontada pela base KEGG com participação na via do metabolismo da colina no câncer associada com alterações genéticas nos oncogenes RAS e PI3K.

O potencial carcinogênico da maioria dos oncogenes foi atribuído à sua capacidade de sustentar a proliferação, de regular o ciclo celular e de escapar da morte celular. Ao contrário dos linfócitos B normais ou outras células leucêmicas, as células da LLC armazenam lipídios em vacúolos citoplasmáticos e utilizam ácido graxos livres para produzir energia via fosforilação oxidativa (ROZOVSKI *et al.*, 2016).

Os lipídeos estão localizados principalmente em três compartimentos no corpo: plasma, tecido adiposo e membranas biológicas. Os ácidos graxos, a forma mais simples de lipídeos, encontram-se principalmente no plasma, enquanto os triglicerídeos, a forma de armazenamento dos lipídeos, no tecido adiposo. Já os fosfolipídeos sendo a principal classe de lipídeos das membranas de todas as células (VOET *et al.*, 2014). Os lipídeos complexos abrangem os glicerofosfolipídeos e os esfingolipídeos. Essas moléculas são encontradas em sua maioria em dois locais: membranas biológicas ou lipoproteínas circulantes. Os fosfolipídeos estão em um estado contínuo *de turnover* na maioria das membranas, isso ocorre como resultado do dano oxidativo durante a inflamação e com a ativação das lipases em resposta ao estímulo hormonal (VOET *et al.*, 2014).

Fosfatidilcolinas e lisofosfatidilcolinas são importantes membros da família de glicerofosfolipídeos. As PCs têm um indispensável papel estrutural em todas as membranas celulares, lipoproteínas sanguíneas, surfactantes naturais e bile, entre outros. A hidrólise parcial de uma molécula de PC resulta na produção de lysoPC, que é um lipídeo bioativo envolvido no recrutamento de monócitos, proliferação de células musculares lisas e disfunção endotelial. Fosfatidilcolinas e lysoPCs servem como reservatórios e transportadores de componentes. A diminuição dessas classes de lipídeos pode, portanto, levar a uma redução da disponibilidade da colina, que é um nutriente importante para os seres humanos, que além de ser usada na síntese de fosfolípidos de membrana, é um precursor essencial para o neurotransmissor acetilcolina (PAAPSTEL *et al.*, 2018). Os lipídios estão envolvidos em muitos processos cancerígenos, incluindo o deslocamento celular, invasão, migração e

proliferação. Os ácidos graxos e seu envolvimento na leucemia receberam muita atenção na literatura. Por exemplo, foi recentemente proposto que as células leucêmicas oxidam os ácidos graxos promovendo o desacoplamento mitocondrial para mudar a produção de ATP da oxidação de ácidos graxos para a glicólise. Isso estaria de acordo com o aumento nos ácidos graxos saturados mais abundantes e, portanto, a modulação do metabolismo de ácidos graxos pode fornecer uma nova estratégia para tratar a leucemia (SAMUDIO *et al.*, 2010; PISZCZ *et al.*, 2016).

Estudo realizado por *Franks et al.*, (2002) mostrou que as células de LLC possuem níveis aumentados de fosfoetanolamina, fosfocolina, glicerofosfoetanolamina e glicerofosfocolina quando comparadas com as células controles, o que sugere a ativação da fosfolipase A2 nos linfócitos da LLC. No entanto, uma diminuição no lysoPC tem sido observada no câncer de pulmão e fígado. O mesmo pode ser verificado com os níveis de fosfatidilinositol no câncer de pâncreas e vários tipos de lisofosfolipídeos em células B malignas, incluindo a LLC (BEGER, 2013; PISZCZ *et al.*, 2013).

O aumento da demanda de lipídios por células tumorais é refletido pela redução dos vários lipídios no sangue. Em estudo realizado por *Taylor et al.*, (2007) foi observado que as concentrações de lisofosfatidilcolina estavam diminuídas em pacientes com câncer. As concentrações plasmáticas de lysoPC correlacionaram-se com perda de peso e parâmetros inflamatórios e, portanto, podem ser marcadores de progressão para vários tipos de câncer.

Segundo *Starkova et al.*, a glicólise não desempenha um papel fundamental nas células da LLC. Elas armazenam lipídios para utilizar ácidos graxos livres e produzir energia por fosforilação oxidativa, ao contrário dos linfócitos B normais. Esta atividade é desencadeada pela maior atividade da lipoproteína lipase, que gera ácidos graxos livres e ativa a transcrição das enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa (STARKOVA, JULIA *et al.*, 2018). A diminuição dos níveis séricos de lisofosfatidilcolina também foi encontrada em estudo realizado por *Bai et al.*, (2014) em pacientes com Leucemia linfoblástica aguda comparados com indivíduos saudáveis, sugerindo que a diminuição dos níveis de LysoPC podem desregular a apoptose e levar ao aumento do crescimento celular e possivelmente da tumorigênese (BAI, Yunnuo *et al.*, 2014).

Neste trabalho foi observado que as concentrações plasmáticas de todos os glicerofosfolipídeos (PCs, lysoPcs e esfingolipídeos) estavam reduzidas, tanto na LLC como na SMD, quando comparadas ao grupo dos indivíduos controles.

Supostamente, essa diminuição seja decorrente de um aumento da demanda das células leucêmicas, posto que os glicerofosfolípídeos podem ser utilizados como forma alternativa de substrato para o metabolismo energético das células leucêmicas. Os mecanismos subjacentes a esta perturbação, as enzimas e genes envolvidos neste processo requerem um estudo mais aprofundado.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

- A abordagem analítica da metabolômica *target*, mostrou-se eficaz para a identificação dos metabólitos presentes na LLC e SMD.
- Através das estratégias estatísticas aplicadas, alcançou-se uma separação satisfatória entre os grupos analisados (LLC vs. CTRL, SMD vs. CTRL e LLC vs. SMD) e foi possível identificar os metabólitos diferenciadores entre o grupo doente (LLC e SMD) e grupo controle, visualizados através de Diagrama de Venn e *heatmap*.
- Foram apontados alguns metabólitos que se destacaram por apresentarem maiores concentrações (da classe das acilcarnitinas, aminas biogênicas e aminoácidos) e baixas concentrações (classe dos glicerofosfolipídeos) quando comparados aos indivíduos controles, que podem ser alvos para pesquisas futuras como candidatos a biomarcadores.
- Com o auxílio do banco de dados HMDB e KEGG foi possível formular a interpretação biológica dos resultados, propiciando questionar qual seria a relevância dos metabólitos apontados no estudo para ativar ou inativar oncogenes e genes supressores de tumor sabidamente envolvidos na patogênese da LLC e SMD.
- E, por fim, os resultados corroboraram com a proposta inicial de que estudos metabolômicos podem fornecer informações biológicas fundamentais sobre os mecanismos metabólicos envolvidos nas doenças hematológicas como são as leucemias.

Limitações do estudo

- Abordagem *target*.
- Número pequeno de pacientes recrutados.
- Resultados encontrados não são extensíveis para todos os tipos de leucemias.
- Limitações com a correlação de outros dados laboratoriais.

Considerações finais:

Este estudo, com a abordagem da metabolômica, é pioneiro no grupo de pesquisa em Onco-Hematologia do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Esse pioneirismo abre perspectivas para trabalhos futuros, tais como análise da metabolômica *untargeted* e a utilização de cultura das células para obter o perfil metabólico *in vitro* da célula leucêmica, além da validação dos dados com estudos mais aprofundados dos mecanismos envolvidos na patogênese das leucemias LLC e SMD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADÈS, L.; ITZYKSON, R.; FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2239-2252, 2014.
- AGAPITO, G.; GUZZI, P. H.; CANNATARO, M. High Performance Analysis of Omics Data: Experiences at University Magna Graecia of Catanzaro. **High Performance Computing & Simulation (HPCS)**, International Conference on, IEEE. p.929-932,2017.
- ALLEGRA, A. et al. The metabolomic signature of hematologic malignancies. **Leuk Res**, v. 49, p. 22-35, Oct 2016.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 19 2016.
- BAHRI, Senda et al. Citrulline: from metabolism to therapeutic use. **Nutrition**, v. 29, n. 3, p. 479-484, 2013.
- BAILLY-BOTUHA, Céline et al. Plasma citrulline concentration reflects enterocyte mass in children with short bowel syndrome. **Pediatric Research**, v. 65, n. 5, p. 559, 2009.
- BAI, Yunnuo et al. Biomarker identification and pathway analysis by serum metabolomics of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 207-216, 2014.
- BANSAL, Vishal et al. Citrulline can preserve proliferation and prevent the loss of CD3 ζ chain under conditions of low arginine. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 423-430, 2004.
- BARRAGÁN, Montserrat et al. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2969-2976, 2002.
- BEGER, R. D. A review of applications of metabolomics in cancer. **Metabolites**, v. 3, n. 3, p. 552-74, Jul 5 2013.
- BEJAR, R.; STEENSMA, D. P. Recent developments in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 124, n. 18, p. 2793-803, Oct 30 2014.
- BELLI, C. B. et al. Myelodysplastic syndromes in South America: a multinational study of 1080 patients. **Am J Hematol**, v. 90, n. 10, p. 851-8, Oct 2015.
- BENITO, S. et al. Plasma biomarker discovery for early chronic kidney disease diagnosis based on chemometric approaches using LC-QTOF targeted metabolomics data. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 149, p. 46-56, 2018.
- BERGERON, C. et al. Erythrocyte spermine levels: a prognostic parameter in childhood common acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 11, n. 1, p. 31, 1997.

BERTOLINI, GISELE LOPES. Carnitina–Metabolismo, funções e potencial terapêutico. **Revista Uningá**, v. 1, n. 1, 2004.

BILLARD, Christian. Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. **Oncotarget**, v. 5, n. 2, p. 309, 2014.

BINET, J. L. et al. Chronic lymphocytic leukaemia: proposals for a revised prognostic staging system. **British Journal of Haematology**, v. 48, n. 3, p. 365-367, 1981.

BIOCRATES, Absolute/DQ@Kit User Manual p180,PN:UM P-180-Waters 6, p.2-51, 2010. Disponível em: <https://www.biocrates.com/>. Acesso em: 06 maio de 2017.

BLANKENBERG, F. G. et al. Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Blood**, v. 89, n. 10, p. 3778-86, May 15 1997.

BLIJLEVENS, N. M. A. et al. Citrulline: a potentially simple quantitative marker of intestinal epithelial damage following myeloablative therapy. **Bone Marrow Transplantation**, v. 34, n. 3, p. 193, 2004.

BREIER, M. et al. Targeted metabolomics identifies reliable and stable metabolites in human serum and plasma samples. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e89728, 2014.

CAMBIAGHI, A.; FERRARIO, M.; MASSEROLI, M. Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. **Brief Bioinform**, v. 18, n. 3, p. 498-510, May 1 2017.

CANDELARIA, M.; DUENAS-GONZALEZ, A. Therapy-related myelodysplastic syndrome. **Expert Opin Drug Saf**, v. 14, n. 5, p. 655-65, May 2015.

CANUTO, G. A. B. et al. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Química Nova**, v. 41, p. 75-91, 2018.

CARDOZO, M. et al. Aminas biogênicas: um problema de saúde pública. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 149-168, 2013.

CARVALHOSA, A.; KILLICK, S. B. Myelodysplastic disorders. **Medicine**, v. 45, n. 5, p. 270-274, 2017.

CASERO, R. A., JR.; MARTON, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 5, p. 373-90, May 2007.

CATELAN, T. T. T. et al. Linfócitos B: da imunobiologia aos imunobiológicos. **Sinopse de Reumatologia**, v. 10, p. 35-57, 2008.

CHATTERJEE, T.; CHOUDHRY, V. P. Childhood myelodysplastic syndrome. **Indian J Pediatr**, v. 80, n. 9, p. 764-71, Sep 2013.

CHIORAZZI, N.; RAI, K. R.; FERRARINI, M. Chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, v. 352, n. 8, p. 804-15, Feb 24 2005.

CHO, Hwang Eui; KANG, Min H. pH gradient-liquid chromatography tandem mass spectrometric assay for determination of underivatized polyamines in cancer cells. **Journal of Chromatography B**, 2018.

- CIMMINO, Amelia et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 39, p. 13944-13949, 2005.
- COOK, D. W.; RUTAN, S. C. Chemometrics for the analysis of chromatographic data in metabolomics investigations. **Journal of Chemometrics**, v. 28, n. 9, p. ii-ii, 2014.
- COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **The cell: Molecular approach**. Fourth Edition. *Washington (DC): ASM Press and Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates*, 2007.
- CYNOBER, Luc A. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. **Nutrition**, v. 18, n. 9, p. 761-766, 2002.
- EFREMOV, D. G.; LAURENTI, L. Recent advances in the pathogenesis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. **Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)**, v. 35, n. 3, p. 105-20, 2014.
- ERIKSSON, Lennart et al. *Design of experiments: Principles and applications* (2008). Third revised and enlarged edition. **Umetrics Academy**, Sweden, 2008.
- ERIKSSON, Lennart, et al. *Multi-and megavariate data analysis basic principles and applications*. Vol. 1. **Umetrics Academy**, 2013.
- ESPINDOLA, F. S. et al. Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas como genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, 2010.
- EVANGELATOS, N. et al. Metabolomics in Sepsis and Its Impact on Public Health. **Public Health Genomics**, Jan 19 2018.
- FABBRI, G.; DALLA-FAVERA, R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 3, p. 145-62, Mar 2016.
- FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. Artmed Editora, 6 edição. 2015.
- FERREIRA, M. M. C. *Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações*. **Campinas: Unicamp**, 2015.
- FIEHN, O. et al. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nat Biotechnol**, v. 18, n. 11, p. 1157-61, Nov 2000.
- FRANKS, S. E. et al. Phosphomonoester concentrations differ between chronic lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. **Leuk Res**, v. 26, n. 10, p. 919-26, Oct 2002.
- FRIZZO, M. N.; DA SILVA, F. C.; DA SILVA ARAÚJO, L. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS NO IDOSO: UMA REVISÃO. **REVISTA SAÚDE INTEGRADA**, v. 8, n. 15-16, 2016.
- GANGAT, N.; PATNAIK, M. M.; TEFFERI, A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. **Am J Hematol**, v. 91, n. 1, p. 76-89, Jan 2016.
- GANOR, Yonatan et al. Human T-leukemia and T-lymphoma express glutamate receptor AMPA GluR3, and the neurotransmitter glutamate elevates the cancer-related

matrix-metalloproteinases inducer CD147/EMMPRIN, MMP-9 secretion and engraftment of T-leukemia in vivo. **Leukemia & lymphoma**, v. 50, n. 6, p. 985-997, 2009.

GHIA, P.; HALLEK, M. Management of chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica**, v. 99, n. 6, p. 965-972, 2014.

GILL, E. L. et al. Mass Spectrometric Methodologies for Investigating the Metabolic Signatures of Parkinson's Disease: Current Progress and Future Perspectives. **Anal Chem**, Feb 12 2018.

GLOBOCAN, Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Disponivel em: <http://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 27 de janeiro de 2018.

GODZIEN, J. et al. From numbers to a biological sense: How the strategy chosen for metabolomics data treatment may affect final results. A practical example based on urine fingerprints obtained by LC-MS. **Electrophoresis**, v. 34, n. 19, p. 2812-26, Oct 2013.

GOMES, L. C. et al. Advances in chronic lymphocytic leukemia pharmacotherapy. **Biomed Pharmacother**, v. 97, p. 349-358, Jan 2018.

GONÇALVES, R. P. et al. Avaliação do perfil hematológico de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC-B) em um hemocentro estadual. **Rev Bras Hematol Hemoter**, p. 228-34, 2009.

GREENBERG, P. L. et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454-65, Sep 20 2012.

GRIBBEN, J. G. Stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia. **Biology of blood and marrow transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 15, n. 1 Suppl, p. 53-58, 2008.

GRIMWADE, L. F.; FULLER, K. A.; ERBER, W. N. Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of acute leukaemia. **Methods**, v. 112, p. 39-45, Jan 1 2017.

GROMSKI, P. S. et al. A comparative investigation of modern feature selection and classification approaches for the analysis of mass spectrometry data. **Anal Chim Acta**, v. 829, p. 1-8, Jun 04 2014.

GRZYWNOWICZ, Maciej et al. Programmed death-1 and its ligand are novel immunotolerant molecules expressed on leukemic B cells in chronic lymphocytic leukemia. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35178, 2012

GU, Yu et al. Perioperative dynamics and significance of amino acid profiles in patients with cancer. **Journal Of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 35, 2015.

GUERRA, Gustavo Petri; RUBIN, Maribel Antonello; MELLO, Carlos Fernando. Modulation of learning and memory by natural polyamines. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 99-118, 2016.

GUIPAUD, O. et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features. **Lancet Oncol**, v. 4, n. 8, p. 505-14, Aug 2003.

GUNTHER, U. L. Metabolomics Biomarkers for Breast Cancer. **Pathobiology**, v. 82, n. 3-4, p. 153-65, Sep 2015.

HALLEK, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. **Am J Hematol**, v. 92, n. 9, p. 946-965, Sep 2017.

HALLEK, M. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5446-56, Jun 15 2008.

HANADA, Motoi et al. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 82, n. 6, p. 1820-1828, 1993.

HENDRIKS, M. M. et al. Data-processing strategies for metabolomics studies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1685-1698, 2011.

HESTERBERG, R. S.; CLEVELAND, J. L.; EPLING-BURNETTE, P. K. Role of Polyamines in Immune Cell Functions. **Med Sci (Basel)**, v. 6, n. 1, Mar 8 2018.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). Version 3.0 and Version 4.0. Disponível em: <http://www.hmdb.ca/>. Acesso em: 04 janeiro de 2017 a 30 janeiro de 2018.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. **Fundamentos em Hematologia-6ª Edição**. Artmed, 2012.

HOU, W. et al. Development of Multimarker Diagnostic Models from Metabolomics Analysis for Gestational Diabetes Mellitus (GDM). **Mol Cell Proteomics**, v. 17, n. 3, p. 431-441, Mar 2018.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Órgão Auxiliar do Ministério da Saúde no desenvolvimento e coordenação das ações integradas para a prevenção e o controle do câncer no Brasil. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>. Acesso em: 06 de março de 2018.

INVERNIZZI, R.; QUAGLIA, F.; PORTA, M. G. Importance of classical morphology in the diagnosis of myelodysplastic syndrome. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v. 7, n. 1, 2015.

JIMÉNEZ-CONTRERAS, E. et al. Response Surface Methodology and its application in evaluating scientific activity. **Scientometrics**, v. 79, n. 1, p. 201-218, 2009.

KARIGANE, D.; TAKUBO, K. Metabolic regulation of hematopoietic and leukemic stem/progenitor cells under homeostatic and stress conditions. **Int J Hematol**, v. 106, n. 1, p. 18-26, Jul 2017.

KARLIKOVA, R. et al. Metabolite Profiling of the Plasma and Leukocytes of Chronic Myeloid Leukemia Patients. **J Proteome Res**, v. 15, n. 9, p. 3158-66, Sep 2 2016.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/>. Acesso em: 04 janeiro a 20 de outubro de 2017.

KERN, Catherine et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. **Blood**, v. 103, n. 2, p. 679-688, 2004.

KIM, D. H. et al. Recent omics technologies and their emerging applications for personalised medicine. **IET Syst Biol**, v. 11, n. 3, p. 87-98, Jun 2017.

KLUPCZYNSKA, A.; DEREZINSKI, P.; KOKOT, Z. J. METABOLOMICS IN MEDICAL SCIENCES--TRENDS, CHALLENGES AND PERSPECTIVES. **Acta Pol Pharm**, v. 72, n. 4, p. 629-41, Jul-Aug 2015.

KNIFIC, T. et al. Models including plasma levels of sphingomyelins and phosphatidylcholines as diagnostic and prognostic biomarkers of endometrial cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 178, p. 312-321, Apr 2018.

KOHNKE, T. et al. Diagnosis of CLL revisited: increased specificity by a modified five-marker scoring system including CD200. **Br J Haematol**, v. 179, n. 3, p. 480-487, Nov 2017.

KOMROKJI, R. S.; ZHANG, L.; BENNETT, J. M. Myelodysplastic syndromes classification and risk stratification. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 24, n. 2, p. 443-57, Apr 2010.

KONIECZNA, Lucyna et al. Bioanalysis of underivatized amino acids in non-invasive exhaled breath condensate samples using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1542, p. 72-81, 2018.

LANASA, M. C. Novel insights into the biology of CLL. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2010, p. 70-6, 2010.

LAU, Titus et al. Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 9, p. 1217-1225, 2000.

LE GARFF-TAVERNIER, M. et al. Functional assessment of p53 in chronic lymphocytic leukemia. **Blood Cancer Journal**, v. 1, n. 2, p. e5, 2011.

LEVER, J.; KRZYWINSKI, M.; ALTMAN, N. Points of Significance: Principal component analysis. **Nature Methods**, v. 14, p. 641, 2017.

LI, Kefeng et al. A robust, single-injection method for targeted, broad-spectrum plasma metabolomics. **Metabolomics**, v. 13, n. 10, p. 122, 2017.

LI, Long-Gang; XU, Hui-Mian. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in gastric adenocarcinomas and their correlation with a poor survival. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 11, n. 17, p. 2539, 2005.

LIANG, C. et al. Characteristics of bone marrow cell dysplasia and its effectiveness in diagnosing myelodysplastic syndrome. **Hematology**, v. 23, n. 2, p. 65-76, Mar 2018.

LIESENFELD, D. B. et al. Review of mass spectrometry-based metabolomics in cancer research. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 22, n. 12, p. 2182-201, Dec 2013.

LIESNER, R.; GOLDSTONE, A. ABC of clinical haematology: the acute leukaemias. **BMJ**, v. 314, n. 7082, p. 733, 1997.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. **Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)**, v. 1, p. 45-69, 2008.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. **The Handbook of Metabonomics and Metabolomics**. Elsevier, 2011.

LINDSLEY, R. C.; EBERT, B. L. Molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. **Annu Rev Pathol**, v. 8, p. 21-47, Jan 24 2013.

LOFTUS, Róisín M.; FINLAY, David K. Immunometabolism: cellular metabolism turns immune regulator. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 1, p. 1-10, 2016.

LOPEZ-IBANEZ, J.; PAZOS, F.; CHAGOYEN, M. MBROLE 2.0-functional enrichment of chemical compounds. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. W1, p. W201-4, Jul 8 2016.

LORAND-METZE, I. Contribuição da citometria de fluxo para o diagnóstico e prognóstico das síndromes mielodisplásicas The application of flow cytometric analysis of bone marrow cells for the diagnosis and prognosis of myelodysplastic syndromes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 3, p. 178-181, 2006.

MA, X. et al. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. **Cancer**, v. 109, n. 8, p. 1536-42, Apr 15 2007.

MACINTYRE, D. A. et al. Serum metabolome analysis by ¹H-NMR reveals differences between chronic lymphocytic leukaemia molecular subgroups. **Leukemia**, v. 24, n. 4, p. 788-97, Apr 2010.

MAIOLI, M. C.; DE SOUZA, M. H. Síndromes Mielodisplásicas (SMD). **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 11, n. 1, 2012..

MAKRECKA-KUKA, M. et al. Plasma acylcarnitine concentrations reflect the acylcarnitine profile in cardiac tissues. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 17528, Dec 13 2017.

MANISHA, P. Leukemia: a review article. **International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences**, v. 1, n. 4, p. 397-408, 2012.

MATLAB, Software destinado a fazer cálculos com matrizes (MATrix LABoratory), version 7.0, 2004. Disponível em: mathworks.com/products/matlab.

MATUTES, E. et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. **Leukemia**, v. 8, n. 10, p. 1640-5, Oct 1994.

MBROLE, Metabolites Biological Role version 2.0. Disponível em <http://csbg.cnb.csic.es/mbrole2/>. Acesso em: 04 de janeiro de 2017 a 20 julho de 2017.

MCGRATH, C. M.; YOUNG, S. P. Lipid and Metabolic Changes in Rheumatoid Arthritis. **Curr Rheumatol Rep**, v. 17, n. 9, p. 57, Sep 2015.

METABOANALYST, Statistical, functional and integrative analysis of metabolomics data, version 3.0 and 4.0. Disponível em: <http://www.metaboanalyst.ca/>. Acesso em: 01 maio de 2017 a 10 de fevereiro de 2018.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 4, p. 271-89, Jul 2016.

MILNE, S. B. et al. Sum of the parts: mass spectrometry-based metabolomics. **Biochemistry**, v. 52, n. 22, p. 3829-40, Jun 4 2013.

MONTALBAN-BRAVO, G.; GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. **Am J Hematol**, v. 93, n. 1, p. 129-147, Jan 2018.

MOREIRA, L. M. **Ciências Genômicas: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015.

MUENST, S. et al. Diagnostic and prognostic utility of PD-1 in B cell lymphomas. **Disease markers**, v. 29, n. 1, p. 47-53, 2010.

MURRAY, Fiona; INSEL, Paul A. Targeting cAMP in chronic lymphocytic leukemia: a pathway-dependent approach for the treatment of leukemia and lymphoma. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 17, n. 8, p. 937-949, 2013

MUSHARRAF, S. G. et al. SERUM metabolomics of acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia for probing biomarker molecules. **Hematol Oncol**, v. 35, n. 4, p. 769-777, Dec 2017.

NITTA, Takeshi et al. Involvement of Polyamines in B Cell Receptor–Mediated Apoptosis: Spermine Functions as a Negative Modulator. **Experimental Cell Research**, v. 265, n. 1, p. 174-183, 2001.

NIERO-MELO, L. et al. Diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, p. 167-174, 2006.

NILSSON, Jonas A. et al. Targeting ornithine decarboxylase in Myc-induced lymphomagenesis prevents tumor formation. **Cancer Cell**, v. 7, n. 5, p. 433-444, 2005.

NOGAI, H.; DORKEN, B.; LENZ, G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 14, p. 1803-11, May 10 2011.

NYBAKKEN, G. E.; BAGG, A. The genetic basis and expanding role of molecular analysis in the diagnosis, prognosis, and therapeutic design for myelodysplastic syndromes. **J Mol Diagn**, v. 16, n. 2, p. 145-58, Mar 2014.

PAAPSTEL, K. et al. Inverse relations of serum phosphatidylcholines and lysophosphatidylcholines with vascular damage and heart rate in patients with atherosclerosis. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 28, n. 1, p. 44-52, Jan 2018.

PACILLI, A. et al. Carnitine-acyltransferase system inhibition, cancer cell death, and prevention of myc-induced lymphomagenesis. **J Natl Cancer Inst**, v. 105, n. 7, p. 489-98, Apr 3 2013.

PAVIA, Donald L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. Cengage Learning, 2010.

PEGG, Anthony E. The function of spermine. **IUBMB Life**, v. 66, n. 1, p. 8-18, 2014.

PELLAGATTI, A.; BOULTWOOD, J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. **Eur J Haematol**, v. 95, n. 1, p. 3-15, Jul 2015.

PIENING, B. D. et al. Integrative Personal Omics Profiles during Periods of Weight Gain and Loss. **Cell Syst**, v. 6, n. 2, p. 157-170.e8, Feb 28 2018.

PIRNES-KARHU, Sini et al. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity associates with white blood cell count in myeloid leukemias. **Experimental Hematology**, v. 42, n. 7, p. 574-580, 2014.

PISZCZ, J. et al. To treat or not to treat: metabolomics reveals biomarkers for treatment indication in chronic lymphocytic leukaemia patients. **Oncotarget**, v. 7, n. 16, p. 22324-38, Apr 19 2016.

PISZCZ, Jaroslaw et al. Differences and similarities between LC-MS derived serum fingerprints of patients with B-cell malignancies. **Electrophoresis**, v. 34, n. 19, p. 2857-2664, 2013.

PODHORECKA, M. et al. Deregulation of Apoptosis - Is it Still an Important Issue in Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia? **Curr Cancer Drug Targets**, v. 16, n. 8, p. 652-658, 2016.

PUBCHEM homepage, compound, substance, assay, bioassay, pubchem tools, sar. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 04 de janeiro a 25 de julho de 2017.

QU, Q. et al. Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 5, p. e2226, 2017.

RAI, K. R.; JAIN, P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. **Am J Hematol**, v. 91, n. 3, p. 330-40, Mar 2016.

RAI, K. R. et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 46, n. 2, p. 219-34, Aug 1975.

RAMSAY, A. D.; RODRIGUEZ-JUSTO, M. Chronic lymphocytic leukaemia--the role of the microenvironment pathogenesis and therapy. **Br J Haematol**, v. 162, n. 1, p. 15-24, Jul 2013.

RANKIN, E. B. et al. Biology of the bone marrow microenvironment and myelodysplastic syndromes. **Mol Genet Metab**, v. 116, n. 1-2, p. 24-8, Sep-Oct 2015.

RAZA, A.; GALILI, N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 12, p. 849-59, Dec 2012.

RHEE, E. P. How Omics Data Can Be Used in Nephrology. **Am J Kidney Dis**, Feb 23 2018.

ROBB, D. B.; COVEY, T. R.; BRUINS, A. P. Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography– mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 15, p. 3653-3659, 2000.

RODRIGUES, C. A. et al. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 38, n. 4, p. 346-357, Oct - Dec 2016.

ROSENBLUM, D.; PEER, D. Omics-based nanomedicine: the future of personalized oncology. **Cancer Lett**, v. 352, n. 1, p. 126-36, Sep 28 2014.

ROZOVSKI, U. et al. Metabolism pathways in chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 57, n. 4, p. 758-65, 2016.

SABATINE, M. S. et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. **Circulation**, v. 112, n. 25, p. 3868-75, Dec 20 2005.

SAMUDIO, I. et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. **J Clin Invest**, v. 120, n. 1, p. 142-56, Jan 2010.

SANTOS, F. R.; ORTEGA, J. M. Bioinformática aplicada à Genômica. **BIOWORK IV-Melhoramento Genômico**, 2003.

SCARFO, L.; FERRERI, A. J.; GHIA, P. Chronic lymphocytic leukaemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 104, p. 169-82, Aug 2016.

SEITER, K. Myelodysplasia: new approaches. **Curr Treat Options Oncol**, v. 14, n. 2, p. 156-69, Jun 2013.

SEMBA, Richard D. et al. Environmental enteric dysfunction is associated with carnitine deficiency and altered fatty acid oxidation. **EBioMedicine**, v. 17, p. 57-66, 2017.

SHAHJAHANI, M. et al. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. **Cell Oncol (Dordr)**, v. 38, n. 2, p. 93-109, Apr 2015.

SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química nova**, v. 32, n. 2, p. 453-462, 2009.

SIMCA, User Guide By MKS Umetrics, Version 14, Sweden, User guide edition date: January 26, 2015 p. 1-591.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006. Skoog, DA, p. 0-50.

SOUZA, A. M. D.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, p. 223-229, 2012.

STARKOVA, Julia et al. Altered Metabolism of Leukemic Cells: New Therapeutic Opportunity. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 336, p. 93-147, 2018.

STEPULAK, Andrzej et al. Glutamate and its receptors in cancer. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 8, p. 933-944, 2014.

STILGENBAUER, S. Prognostic markers and standard management of chronic lymphocytic leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2015, p. 368-77, 2015. ISSN 1520-4383.

SUN, Y. V.; HU, Y. J. Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases. **Adv Genet**, v. 93, p. 147-90, 2016.

SWERDLOW, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2375-90, May 19 2016.

TAYA, Y. et al. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. **Science**, v. 354, n. 6316, p. 1152-1155, Dec 2 2016.

TAYLOR, Lenka A. et al. Plasma lyso-phosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. **Lipids in Health and Disease**, v. 6, n. 1, p. 17, 2007.

TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med**, v. 361, n. 19, p. 1872-85, Nov 5 2009.

TEN HACKEN, E.; BURGER, J. A. Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. **Pharmacol Ther**, v. 144, n. 3, p. 338-48, Dec 2014.

TILI, Esmerina et al. The down-regulation of miR-125b in chronic lymphocytic leukemias leads to metabolic adaptation of cells to a transformed state. **Blood**, v. 120, n. 13, p. 2631-2638, 2012.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. **Pharm Methods**, v. 1, n. 1, p. 25-38, Oct 2010.

TIZIANI, S. et al. Metabolomics of the tumor microenvironment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82859, 2013.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabonomics. **J Proteome Res**, v. 6, n. 2, p. 469-79, Feb 2007.

TRYGG, J.; WOLD, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS. **Journal of Chemometrics**, Chichester, UK, v. 16, n. 3, p. 119-128, 2002.

TZIFI, Flora et al. The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. **Advances in Hematology**, v. 2012, 2012.

UMETRICS, M. **User guide to SIMCA**: Malmö (Sweden): MKS Umetrics AB. Version 14, 2015.

VALENT, P. et al. Standards and impact of hematopathology in myelodysplastic syndromes (MDS). **Oncotarget**, v. 1, n. 7, p. 483-96, Nov 2010.

VAN DEN BERG, R. A. et al. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, p. 142, Jun 08 2006.

VAN VLIET, Michel J. et al. Citrulline as a marker for chemotherapy induced mucosal barrier injury in pediatric patients. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 53, n. 7, p. 1188-1194, 2009.

VARMA, V. R. et al. Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: A targeted metabolomics study. **PLoS Med**, v. 15, n. 1, p. e1002482, Jan 2018.

VASSALLO, J.; MAGALHÃES, S. M. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. **Rev Bras Hematol. Hemoter**, v. 31, n. 4, p. 267-72, 2009.

VELLOSO, E. R. Agentes imunossupressores, talidomida e ácido valpróico nas síndromes mielodisplásicas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 28, n. 3, p. 213-217, 2006.

VERBURGH, E. et al. A new disease categorization of low-grade myelodysplastic syndromes based on the expression of cytopenia and dysplasia in one versus more than one lineage improves on the WHO classification. **Leukemia**, v. 21, n. 4, p. 668-77, Apr 2007.

VILLAS-BOAS, S. G. et al. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrom Rev**, v. 24, n. 5, p. 613-46, Sep-Oct 2005.

VILLAS-BOAS, Silas G., et al. **Metabolome Analysis: an Introduction**. Vol. 24. John Wiley & Sons, 2007.

VILLAS-BÔAS, Silas Granato; GOMBERT, Andreas K. METABOLOMA. **Biociência**, v. 36, p. 58, 2006.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.

WEI, Jun et al. Nutrient and metabolic sensing in T cell responses. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 247, 2017.

WIESTNER, A. The role of B-cell receptor inhibitors in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica**, v. 100, n. 12, p. 1495-1507, 2015.

WISE, David R.; THOMPSON, Craig B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. **Trends In Biochemical Sciences**, v. 35, n. 8, p. 427-433, 2010.

WIKLUND, S. et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. **Anal Chem**, v. 80, n. 1, p. 115-22, Jan 01 2008.

WISHART, D. S. Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation. **Am J Transplant**, v. 5, n. 12, p. 2814-20, Dec 2005.

WISHART, D. S. et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. Database issue, p. D608-17, Jan 04 2018.

WISHART, David S. et al. HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D801-D807, 2012.

WOOD, S. L.; WESTBROOK, J. A.; BROWN, J. E. Omic-profiling in breast cancer metastasis to bone: implications for mechanisms, biomarkers and treatment. **Cancer Treat Rev**, v. 40, n. 1, p. 139-52, Feb 2014.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. 55, p. 14.10.1-14.10.91, Sep 7 2016.

YAMAMOTO, J. F.; GOODMAN, M. T. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. **Cancer Causes Control**, v. 19, n. 4, p. 379-90, May 2008.

YAN, S. K. et al. "Omics" in pharmaceutical research: overview, applications, challenges, and future perspectives. **Chin J Nat Med**, v. 13, n. 1, p. 3-21, Jan 2015.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**, Ed. ATHENEU, 1ª edição, 2013.

ZAHID, M. F. et al. Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. **International Journal Of Hematology-Oncology And Stem Cell Research**, v. 11, n. 3, p. 231, 2017.

ZENZ, T. et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. **Leukemia**, v. 24, n. 12, p. 2072-9, Dec 2010..

ZHANG, A. et al. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst**, v. 137, n. 2, p. 293-300, Jan 21 2012.

ZHANG, S.; KIPPS, T. J. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 103-18, 2014.

ZHONG, P.; ZHANG, J.; CUI, X. Abnormal metabolites related to bone marrow failure in aplastic anemia patients. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 4, p. 13709-18, Oct 29 2015.

ZURFLUH, S. et al. The role of metabolomic markers for patients with infectious diseases: implications for risk stratification and therapeutic modulation. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 16, n. 2, p. 133-142, Feb 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Lista dos metabólitos medidos pelo kit (Biocrates Absolute IDQ® p180 - Abreviatura e nome completo)

(CONTINUA)

Acilcarnitinas (40)			
C0	Carnitina	C10:1	Decenoilcarnitina
C2	Acetilcarnitina	C10:2	Decadienilcarnitina
C3	Propionilcarnitina	C12	Dodecanoilcarnitina
C3-OH	Hidroxi propionilcarnitina	C12:1	Dodecenoilcarnitina
C3:1	Propenoilcarnitina	C12-DC	Dodecanodil carnitina
C4	Butirilcarnitina	C14	Tetradecanoilcarnitina
C4-OH (C3-DC)	Hidroxibutirilcarnitina	C14:1	Tetradecenoilcarnitina
C4:1	Butenilcarnitina	C14:1-OH	Hidroxitetradecenoilcarnitina
C5	Valerilcarnitina	C14:2	Tetradecadienilcarnitina
C5:1	Tigilcarnitina	C14:2-OH	Hidroxitetradecadienilcarnitina
C5:1-DC	Glutaconilcarnitina	C16	Hexadecanoilcarnitina
C5-DC (C6-OH)	Glutaril- carnitina/ Hidroxihexanoil-L-carnitina	C16:1	Hexadecenoilcarnitina
C5-M-DC	Metilglutarilcarnitina	C16-OH	Hidroxihexadecanoilcarnitina
C5-OH (C3-DC-M)	Hidroxivalerilcarnitina (metilmalonilcarnitina)	C16:1-OH	Hidroxihexadecenoilcarnitina
C6 (C4:1-DC)	Hexanoilcarnitina (Fumarilcarnitina)	C16:2	Hexadecadienilcarnitina
C6:1	Hexanoilcarnitina	C16:2-OH	Hidroxihexadecadienilcarnitina
C7-DC	Pimelilcarnitina	C18	Octadecanoilcarnitina
C8	Octanoilcarnitina	C18:1	Octadecenoilcarnitina
C9	Nonailcarnitina	C18:1-OH	Hidroxioctadecenoilcarnitina
C10	Decanoilcarnitina	C18:2	Octadecadienilcarnitina
Aminoácidos (21)			

(CONTINUAÇÃO)

Ala	Alanina	Lys	Lisina
Arg	Arginina	Met	Metionina
Asn	Asparagina	Orn	Ornitina
Asp	Aspartato	Phe	Fenilalanina
Cit	Citrulina	Pro	Prolina
Gln	Glutamina	Ser	Serina
Glu	Glutamato	Thr	Treonina
Gly	Glicina	Trp	Triptofano
His	Histidina	Tyr	Tirosina
Ile	Isoleucina	Val	Valina
Leu	Leucina		
Aminas Biogênicas (19)			
Ac-Orn	Acetil-ornitina	Nitro-Tyr	Nitrotirosina
ADMA	Dimetilarginina assimétrica	OH-Pro	Hidroxiprolina
SDMA	Dimetilarginina simétrica	PEA	Feniletilamina
alpha-AAA	Ácido alfa-aminoadípico	Putrescine	Putrescina
Carnosine	Carnosina	Sarcosine	Sarcosina
Creatinine	Creatinina	Serotonin	Serotonina
DOPA	DOPA	Spermidine	Espermidina
Dopamine	Dopamina	Spermine	Espermina
Histamine	Histamina	Taurine	Taurina
Kinurenine	Quinurenina		
Met-SO	Sulfóxido de metionina		
Hexoses (01)			
H1	Soma das Hexoses (incluindo glicose)		
Esfingolipídeos (15)			

(CONTINUAÇÃO)

SM (OH) C14:1	Hidroxi esfingomielina C14:1	SM C18:1	Esfingomielina C18:1
SM (OH) C16:1	Hidroxi esfingomielina C16:1	SM C20:2	Esfingomielina C20:2
SM (OH) C22:1	Hidroxi esfingomielina C22:1	SM C22:3	Esfingomielina C22:3
SM (OH) C22:2	Hidroxi esfingomielina C22:2	SM C24:0	Esfingomielina C24:0
SM (OH) C24:1	Hidroxi esfingomielina C24:1	SM C24:1	Esfingomielina C24:1
SM C16:0	Esfingomielina C16:0	SM C26:0	Esfingomielina C26:0
SM C16:1	Esfingomielina C16:1	SM C26:1	Esfingomielina C26:1
SM C18:0	Esfingomielina C18:0		

Glicerofosfolipídeos (90)

lysoPC a C14:0	Acil Lisofosfatidilcolina C14:0	PC aa C24:0	Diacil Fosfatidilcolina C24:0	PC ae C30:0	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C30:0
lysoPC a C16:0	Acil Lisofosfatidilcolina C16:0	PC aa C26:0	Diacil Fosfatidilcolina C26:0	PC ae C30:1	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C30:1
lysoPC a C16:1	Acil Lisofosfatidilcolina C16:1	PC aa C28:1	Diacil Fosfatidilcolina C28:1	PC ae C30:2	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C30:2
lysoPC a C17:0	Acil Lisofosfatidilcolina C17:0	PC aa C30:0	Diacil Fosfatidilcolina C30:0	PC ae C32:1	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C32:1
lysoPC a C18:0	Acil Lisofosfatidilcolina C18:0	PC aa C30:2	Diacil Fosfatidilcolina C30:2	PC ae C32:2	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C32:2
lysoPC a C18:1	Acil Lisofosfatidilcolina C18:1	PC aa C32:0	Diacil Fosfatidilcolina C32:0	PC ae C34:0	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C34:0
lysoPC a C18:2	Acil Lisofosfatidilcolina C18:2	PC aa C32:1	Diacil Fosfatidilcolina C32:1	PC ae C34:1	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C34:1
lysoPC a C20:3	Acil Lisofosfatidilcolina C20:3	PC aa C32:2	Diacil Fosfatidilcolina C32:2	PC ae C34:2	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C34:2
lysoPC a C20:4	Acil Lisofosfatidilcolina C20:4	PC aa C32:3	Diacil Fosfatidilcolina C32:3	PC ae C34:3	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C34:3
lysoPC a C24:0	Acil Lisofosfatidilcolina C24:0	PC aa C34:1	Diacil Fosfatidilcolina C34:1	PC ae C36:0	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C36:0
lysoPC a C26:0	Acil Lisofosfatidilcolina C26:0	PC aa C34:2	Diacil Fosfatidilcolina C34:2	PC ae C36:1	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C36:1
lysoPC a C26:1	Acil Lisofosfatidilcolina C26:1	PC aa C34:3	Diacil Fosfatidilcolina C34:3	PC ae C36:2	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C36:2
lysoPC a C28:0	Acil Lisofosfatidilcolina C28:0	PC aa C34:4	Diacil Fosfatidilcolina C34:4	PC ae C36:3	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C36:3
lysoPC a C28:1	Acil Lisofosfatidilcolina C28:1	PC aa C36:0	Diacil Fosfatidilcolina C36:0	PC ae C36:4	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C36:4
		PC aa C36:1	Diacil Fosfatidilcolina C36:1	PC ae C36:5	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C36:5
		PC aa C36:2	Diacil Fosfatidilcolina C36:2	PC ae C38:0	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C38:0
		PC aa C36:3	Diacil Fosfatidilcolina C36:3	PC ae C38:1	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C38:1

(CONCLUSÃO)

		PC aa C36:4	Diacil Fosfatidilcolina C36:4	PC ae C38:2	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C38:2
		PC aa C36:5	Diacil Fosfatidilcolina C36:5	PC ae C38:3	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C38:3
		PC aa C36:6	Diacil Fosfatidilcolina C36:6	PC ae C38:4	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C38:4
		PC aa C38:0	Diacil Fosfatidilcolina C38:0	PC ae C38:5	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C38:5
		PC aa C38:1	Diacil Fosfatidilcolina C38:1	PC ae C38:6	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C38:6
		PC aa C38:3	Diacil Fosfatidilcolina C38:3	PC ae C40:1	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C40:1
		PC aa C38:4	Diacil Fosfatidilcolina C38:4	PC ae C40:2	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C40:2
		PC aa C38:5	Diacil Fosfatidilcolina C38:5	PC ae C40:3	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C40:3
		PC aa C38:6	Diacil Fosfatidilcolina C38:6	PC ae C40:4	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C40:4
		PC aa C40:1	Diacil Fosfatidilcolina C40:1	PC ae C40:5	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C40:5
		PC aa C40:2	Diacil Fosfatidilcolina C40:2	PC ae C40:6	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C40:6
		PC aa C40:3	Diacil Fosfatidilcolina C40:3	PC ae C42:0	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C42:0
		PC aa C40:4	Diacil Fosfatidilcolina C40:4	PC ae C42:1	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C42:1
		PC aa C40:5	Diacil Fosfatidilcolina C40:5	PC ae C42:2	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C42:2
		PC aa C40:6	Diacil Fosfatidilcolina C40:6	PC ae C42:3	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C42:3
		PC aa C42:0	Diacil Fosfatidilcolina C42:0	PC ae C42:4	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C42:4
		PC aa C42:1	Diacil Fosfatidilcolina C42:1	PC ae C42:5	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C42:5
		PC aa C42:2	Diacil Fosfatidilcolina C42:2	PC ae C44:3	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C44:3
		PC aa C42:4	Diacil Fosfatidilcolina C42:4	PC ae C44:4	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C44:4
		PC aa C42:5	Diacil Fosfatidilcolina C42:5	PC ae C44:5	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C44:5
		PC aa C42:6	Diacil Fosfatidilcolina C42:6	PC ae C44:6	Acil-Aquil Fosfatidilcolina C44:6

Fonte: O autor, 2018.

APÊNDICE B – Importância biológica dos metabólitos medidos pelo kit

(CONTINUA)

Classe bioquímica dos metabólitos	Número	Nome do metabólito ou abreviação	Importância Biológica -Exemplos selecionados
Aminoácidos	21	Alanina, Arginina, Asparagina, Aspartato, Citrulina, Glutamina, Glutamato, Glicina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Ornitina, Fenilalanina, Prolina, Serina, Treonina, Triptofano, Tirosina, Valina	Metabolismo de aminoácidos (ex.: erros inatos do metabolismo, como Fenilcetonúria) ciclo da uréia, atividade de gliconeogênese e glicólise, sensibilidade/resistência à insulina, metabolismo de neurotransmissores, estresse oxidativo
Aminas Biogênicas	19	Acetilornitina, Dimetilarginina simétrica, Dimetilarginina assimétrica, Ácido alfa-aminoadípico, Carnosina, Histamina, Creatinina, Dopamina, Quinurenina, Sulfóxido de metionina, Nitrotirosina, Hidroxiprolina, Sarcosina, Espermidina, Espermina, Taurina, Feniletilamina, Putrescina, Serotonina	Doenças neurológicas, proliferação celular, progressão do ciclo celular, estabilidade do DNA, estresse oxidativo
Acilcarnitinas	40	C0,C10,C10:1,C10:2,C12,C12-DC,C12:1,C14,C14:1,C14:1-OH, C14:2,C14:2-OH,C16,C16-OH,C16:1,C16:1-OH,C16:2,C16:2-OH, C18,C18:1,C18:1-OH,C18:2,C2,C3,C3-OH,C3:1,C4,C4-OH (C3-DC), C4:1,C5,C5-M-DC,C5-OH (C3-DC-M),C5:1,C5:1-DC,C6 (C4:1-DC), C5-DC (C6-OH),C6:1,C7-DC,C8,C9,	Metabolismo energético, transporte e oxidação ácidos graxos mitocondrial (ex.: erros inatos do metabolismo, Deficiência de Acil-CoA Desidrogenase de Cadeia Média (MCAD), cetose, estresse oxidativo, dano na membrana mitocondrial (apoptose)
Glicerofosfolípidos:			
Liso- fosfatidilcolinas	14	lysoPC a C14:0/C16:0/C16:1/C17:0/C18:0/C18:1/C18:2/C20:3/C20:4/ C24:0/C26:0/C26:1/C28:0/C28:1	Degradação de fosfolípidos (atividade de fosfolipase) danos à membrana, cascatas de sinalização, perfil de ácidos graxos

(CONCLUSÃO)

Diacil - Fosfatidilcolinas	38	PC aa C24:0/C26:0/C28:1/C30:0/C30:2/C32:0/C32:1/C32:2/C32:3/C34:1/C32:2/C34:3/C32:4/C36:0/C36:1/C36:2/C36:3/C36:4/C36:5/C36:6/C38:0/C38:1/C38:3/C38:4/C38:5/C38:6/C40:1/C40:2/C40:3/C40:4/C40:5/C40:6/C42:0/C42:1/C42:2/C42:4/C42:5/C42:6	Dislipidemia, composição e dano da membrana, perfil de ácidos graxos, atividade das desnaturalização
Acil - Aquil Fosfatidilcolinas	38	PC ae C30:0/C30:2/C32:1/C32:2/C34:0/C34:1/C34:2/C34:3/C36:0/C36:1/C36:2/C36:3/C36:4/C36:5/C38:0/C38:1/C38:2/C38:3/C38:4/C38:5/C38:6/C40:1/C40:2/C40:3/C40:4/C40:5/C40:6/C42:0/C42:1/C42:2/C42:3/C42:4/C42:5/C44:3/C44:4/C44:5/C44:6	Dislipidemia, composição e dano da membrana, perfil de ácidos graxos, atividade das desnaturalização
Esfingolipídeos	15	SM (OH) C14:1, SM C16:0, SM C16:1, SM C16:1, SM C18:0, SM C18:1, SM C20:2, SM C22:3, SM (OH) C22:1, SM (OH) C22:2, SM C24:0, SM C24:1, SM (OH) C24:1, SM C26:0, SM C26:1	Cascatas de sinalização, danos à membrana (por exemplo, neurodegeneração)
Soma das Hexoses	1	H1	Metabolismo de carboidratos
Total	186		

Fonte: <https://www.biocrates.com/>

Legenda: Lista dos metabólitos medidos usando o kit Biocrates Absolute IDQ p180. Aa, acil-acil; ae, acil-alquil; a, lyso Cx: y, onde “x” é o número de carbonos na cadeia lateral do ácido graxo; e o “y” é o número de ligações duplas na cadeia lateral; DC, decarboxil; M metil; OH, hidroxila; PC, fosfatidilcolina; SM, esfingomielina.

APÊNDICE C: Metabólitos significativos análise univariada do Grupo: LLC vs. CTRL

(CONTINUA)

Metabólito	Massa Monoisotópica	Fórmula Química	log fold change	Fold change	p-valor
Acetil-ornitina	174.1004	C7H14N2O3	-1,490639038	0,355854889	5,26636E-08
Alanina	89.0476	C3H7NO2	-1,094265536	0,468374509	0,001087145
Arginina	174.1116	C6H14N4O2	-1,269017154	0,414942359	2,31019E-06
Asn	132.053	C4H8N2O3	1,325563431	2,506307501	0,333352576
C12-DC	373.2464	C19H35NO6	0,190709354	1,141324752	0,006157912
Citrulina	175.0956	C6H13N3O3	9,320416652	639,3298537	0,017973351
Creatinina	113.0589	C4H7N3O	-1,13111698	0,456562104	0,014711111
Espermidina	145.157	C7H19N3	3,865635293	14,57713499	0,658736776
Espermina	202.2157	C10H26N4	4,065063456	16,73809524	0,01559155
Glu	147.053	C5H9NO4	6,525087274	92,09732029	0,173980666
lysoPC a C14:0	467.3011	C22H46NO7P	-0,325557291	0,797990076	0,006799052
lysoPC a C16:0	495.332	C24H50NO7P	-0,293487437	0,815927326	0,089191352
lysoPC a C18:0	523.3637	C26H54NO7P	-0,329266184	0,79594123	0,029017894
lysoPC a C18:2	519.3324	C26H50NO7P	-0,54572437	0,685047357	0,002033456
lysoPC a C20:3	545.3481	C28H52NO7P	-0,355471257	0,781614287	0,027491648
lysoPC a C20:4	543.3324	C28H50NO7P	-0,398972107	0,758398436	0,005807279
lysoPC a C24:0	607.4576	C32H66NO7P	-0,871978654	0,546396954	3,08527E-05
lysoPC a C26:0	635.4889	C34H70NO7P	-1,707184531	0,306257158	1,3415E-05
lysoPC a C26:1	633.4733	C34H68NO7P	-1,437087343	0,369312157	2,14538E-05
lysoPC a C28:0	663.5202	C36H74NO7P	-1,225783282	0,427565312	9,7856E-05
lysoPC a C28:1	661.5046	C36H72NO7P	-0,97192058	0,509826906	0,000163984
PC aa C26:0	649.468	C34H68NO8P	-0,805551954	0,572143145	1,33686E-05

(CONTINUAÇÃO)

PC aa C28:1	675.483	C36H70NO8P	-0,264004448	0,832773203	0,339842434
PC aa C30:0	705.5308	C38H76NO8P	-0,394413794	0,760798447	0,032023528
PC aa C32:3	727.5152	C40H74NO8P	-0,556882121	0,679769661	0,000437164
PC aa C34:3	755.5465	C42H78NO8P	-0,495593356	0,709269907	0,001596641
PC aa C36:1	787.6091	C44H86NO8P	-0,437166314	0,738583883	0,001230542
PC aa C36:6	777.5308	C44H76NO8P	-0,587716345	0,665395334	0,000857006
PC aa C40:1	827.6767	C48H94NO7P	-0,502712769	0,705778423	0,000155645
PC aa C40:3	839.6404	C48H90NO8P	-0,465796478	0,724071224	0,001612558
PC aa C42:0	873.7186	C50H100NO8P	-0,843307151	0,557364433	1,34266E-05
PC aa C42:1	871.7030	C50H98NO8P	-0,888405838	0,540210715	5,51997E-07
PC aa C42:5	863.6404	C50H90NO8P	-0,415181544	0,749925121	0,000497603
PC aa C42:6	861.6247	C50H88NO8P	-0,246518617	0,842928042	0,00869376
PC aaC38:6	805.5621	C46H80NO8P	-0,350541743	0,784289536	0,044084101
PC aaC40:2	841.6560	C48H92NO8P	-0,857224969	0,552013338	0,000184658
PC aaC42:2	869.6873	C50H96NO8P	-0,605774298	0,657118608	3,50881E-05
PC aaC42:4	865.6560	C50H92NO8P	-0,598034489	0,660653409	0,000220384
PC ae C30:0	691.551	C38H78NO7P	-0,373426983	0,771946633	0,260883675
PC ae C30:1	689.5359	C38H76NO7P	-1,344307732	0,393842926	2,34655E-05
PC ae C30:2	687.5202	C38H74NO7P	-0,796466606	0,575757576	0,000271675
PC ae C32:1	717.5672	C40H80NO7P	-0,289322184	0,818286421	0,035154984
PC ae C32:2	715.5515	C40H78NO7P	-0,414058178	0,750509283	0,00557914
PC ae C34:1	745.598	C42H84NO7P	-0,220027299	0,858549191	0,080332397
PC ae C34:2	743.5828	C42H82NO7P	-0,601566172	0,659038123	8,31734E-05
PC ae C34:3	741.5672	C42H80NO7P	-0,638796231	0,642248611	7,58646E-05
PC ae C36:0	775.6454	C44H90NO7P	-0,203842666	0,868234908	0,030998129
PC ae C36:1	773.6298	C44H88NO7P	-0,462570238	0,725692247	0,001303303

(CONTINUAÇÃO)

PC ae C36:2	771.6141	C44H86NO7P	-0,437178303	0,738577745	0,003157285
PC ae C36:3	769.5985	C44H84NO7P	-0,526400282	0,694284909	0,000217453
PC ae C36:4	767.582	C44H82NO7P	-0,214925414	0,861590702	0,090104656
PC ae C38:0	803.6767	C46H94NO7P	-0,45219695	0,730928935	0,001081848
PC ae C38:1	801.6611	C46H92NO7P	-0,766709561	0,587756477	0,001242379
PC ae C38:2	799.6454	C46H90NO7P	-0,646556537	0,638803208	0,000376406
PC ae C38:3	797.6298	C46H88NO7P	-0,667095421	0,629773335	0,001278379
PC ae C38:4	795.6141	C46H86NO7P	-0,244198278	0,844284844	0,048810531
PC ae C38:6	791.582	C46H82NO7P	-0,219235867	0,859020302	0,076671526
PC ae C40:1	829.6924	C48H96NO7P	-0,52737054	0,693818137	0,000216088
PC ae C40:2	827.6767	C48H94NO7P	-0,480301355	0,716827875	0,001110714
PC ae C40:3	825.6611	C48H92NO7P	-1,116323351	0,461267851	0,00012798
PC ae C40:4	823.6454	C48H90NO7P	-0,585773405	0,666292054	0,000384637
PC ae C40:5	821.6298	C48H88NO7P	-0,436911914	0,738714134	0,001175722
PC ae C42:1	857.7237	C50H100NO7P	-0,578497572	0,669660802	0,000818025
PC ae C42:2	855.7080	C50H98NO7P	-0,576780807	0,670458153	0,000142281
PC ae C42:3	853.6924	C50H96NO7P	-0,90525575	0,533938043	1,50035E-06
PC ae C42:4	851.6767	C50H94NO7P	-0,880714977	0,543098214	1,5123E-05
PC ae C42:5	849.6611	C50H92NO7P	-0,731009403	0,602482231	3,86022E-05
PC ae C44:3	881.7237	C52H100NO7P	-0,967148252	0,511516168	4,18418E-05
PC ae C44:4	879.7080	C52H98NO7P	-0,701753316	0,614824553	5,65517E-05
PC ae C44:5	877.6924	C52H96NO7P	-0,802104252	0,573512068	0,000108969
PC ae C44:6	875.6767	C52H94NO7P	-0,799549392	0,574528597	0,000149884
Sarcosina	89.0476	C3H7NO2	-0,609818606	0,655279087	0,047573353
Serina	105.0425	C3H7NO3	-0,762004636	0,589676401	0,000288657
SM (OH) C16:1	716.5468	C39H77N2O7P	-0,320275128	0,800917125	0,026606327

(CONCLUSÃO)

SM (OH) C22:1	800.6407	C45H89N2O7P	-0,401964635	0,756826948	0,013487114
SM (OH) C22:2	798.6250	C45H87N2O7P	-0,343280353	0,788246982	0,030990809
SM C16:1	715.575	C40H80N2O6P	-0,167539995	0,89035958	0,240172688
SM C18:0	732.6145	C41H85N2O6P	-0,430640526	0,74193231	0,007361572
SM C18:1	728.5832	C41H81N2O6P	-0,459652119	0,72716158	0,020669012
SM C24:0	815.7006	C47H96N2O6P	-0,43436021	0,740021859	0,00022512
Taurina	125.0146	C2H7NO3S	-1,89913338	0,268104366	1,43098E-07
Thr	119.058	C4H9NO3	1,691612168	3,230174644	0,266510311
Triptofano	204.0898	C11H12N2O2	-0,295071835	0,815031749	0,016437076
Valina	117.0789	C5H11NO2	-0,26532418	0,832011757	0,010800936

Fonte: O autor, 2018.

APÊNDICE D: Metabólitos significativos análise univariada do Grupo: SMD vs. CTRL

(CONTINUA)

Metabólito	Massa Monoisotópica	Fórmula Química	<i>log folg change</i>	<i>Fold change</i>	<i>p</i>-valor
Ac-Orn	174.1004	C7H14N2O3	-1,03638768	0,4875467	0,002917539
Ala	89.0476	C3H7NO2	-0,782013112	0,581554735	0,022716615
Arg	174.1116	C6H14N4O2	-0,787824579	0,579216827	0,016880634
Asp	133.0375	C4H7NO4	-1,926961687	0,262982429	0,000947883
C0	161.1051	C7H15NO3	-0,71003832	0,611303901	0,015663354
C10	315.2409	C17H33NO4	-1,053866058	0,481675664	0,005925382
C10:1	313.2253	C17H31NO4	-0,83232745	0,561622465	0,011511301
C12	343.2722	C19H37NO4	-0,726017183	0,604570637	0,000618665
C12:1	341.2566	C19H35NO4	-0,516167038	0,699227079	0,020383164
C14	371.3035	C21H41NO4	-0,698430993	0,616242038	0,001245291
C14:1	369.2879	C21H39NO4	-1,52466199	0,347560976	0,000243743
C14:1-OH	385.2828	C21H39NO5	-1,218772106	0,429648241	0,001553949
C14:2	367.272	C21H37NO4	-1,632332053	0,322566372	0,000195788
C14:2-OH	385.2828	C21H39NO5	-1,473931188	0,36	0,001943306
C16	399.3348	C23H45NO4	-1,212077719	0,431646526	0,000417158
C16:1	397.3192	C23H43NO4	-1,227951947	0,426923077	0,000672646
C16:1-OH	413.3141	C23H43NO5	-0,962525295	0,513157895	0,00051572
C16:2	395.3035	C23H41NO4	-1,010647244	0,496323529	0,017221138
C18	427.3661	C25H49NO4	-1,116083519	0,461344538	0,000192057
C18:1	425.3505	C25H47NO4	-1,544079444	0,342914439	1,98E-05

(CONTINUAÇÃO)

C18:1-OH	441.3454	C25H47NO5	-0,733398979	0,601485149	0,006771087
C18:2	423.3348	C25H45NO4	-1,392406525	0,380928854	0,00046226
C2	203.1157	C9H17NO4	-0,967137121	0,511520115	0,004221591
C4-OH-Pro	131.0582	C5H9NO3	-1,064474314	0,478146853	0,001539101
C5	245.1627	C12H23NO4	-0,883920593	0,541892809	0,00126712
C5:1	100.052	C5H8O2	-0,617081275	0,651988636	0,070319942
C5-DC (C6-OH)	275.1368	C12H21NO6	-1,60165879	0,329497908	0,001093033
C5-M-DC	289.152	C13H23NO6	-0,325824297	0,797842402	0,10735281
C5-OH (C3-DC-M)	263.1732	C12H25NO5	-0,820552224	0,566225166	0,006036508
C6 (C4:1-DC)	259.1783	C13H25NO4	-0,553193383	0,681509946	0,002795144
C7-DC	303.1681	C14H25NO6	-0,969349787	0,510736196	0,011960346
C8	287.2096	C15H29NO4	-0,830662296	0,562271062	0,00068936
C9	301.2253	C16H31NO4	-0,714754315	0,609308886	0,03958825
Cit	175.0956	C6H13N3O3	-0,666920635	0,629849638	0,025709526
His	155.0694	C6H9N3O2	-0,763244292	0,589169931	0,000814074
Ile	131.0946	C6H13NO2	-0,922119129	0,52773328	0,000388864
Kinurenine	208.0848	C10H12N2O3	-0,748515369	0,59521576	0,015593596
Leu	131.0946	C6H13NO2	-0,834059246	0,560948704	0,002046957
Lys	146.1055	C6H14N2O2	-0,752338708	0,593640445	0,005959526
lysoPC a C14:0	467.3011	C22H46NO7P	-0,686583405	0,621323529	0,000319227
lysoPC a C16:0	495.3324	C24H50NO7P	-1,131917788	0,456308746	0,000338442
lysoPC a C16:1	493.3168	C24H48NO7P	-1,382066035	0,383668962	0,000515028
lysoPC a C17:0	509.3481	C25H52NO7P	-1,37137391	0,386522979	0,000401994
lysoPC a C18:0	523.3637	C26H54NO7P	-1,242553326	0,422624021	0,000126082
lysoPC a C18:1	521.3481	C26H52NO7P	-1,290240046	0,408882991	6,10E-05
lysoPC a C18:2	519.3324	C26H50NO7P	-1,000470585	0,499836934	0,002654499
lysoPC a C20:3	545.3481	C28H52NO7P	-1,479311969	0,358659818	2,68E-07

(CONTINUAÇÃO)

lysoPC a C20:4	543.3324	C28H50NO7P	-1,112131734	0,462609971	0,000152883
lysoPC a C24:0	607.4576	C32H66NO7P	-1,186435054	0,43938726	0,00069649
lysoPC a C26:0	635.4889	C34H70NO7P	-1,864404663	0,274636511	0,000776296
lysoPC a C26:1	633.4733	C34H68NO7P	-1,700896339	0,307594937	0,001044202
lysoPC a C28:0	663.5202	C36H74NO7P	-1,535966633	0,344848206	0,00063257
lysoPC a C28:1	661.5046	C36H72NO7P	-1,607294704	0,328213229	1,16E-05
Nitro-Tyr	226.0589	C9H10N2O5	1,267222203	2,406976744	0,002186445
Orn	132.0898	C5H12N2O2	-0,886229811	0,541026134	0,032444668
PC aa C24:0	621.436	C ₃₂ H ₆₄ NO ₈ P	-1,448476392	0,366408178	0,00126712
PC aa C28:1	675.4839	C36H70NO8P	-1,107767483	0,464011516	4,93E-05
PC aa C30:0	705.5308	C38H76NO8P	-1,209077314	0,432545165	7,57E-06
PC aa C32:0	733.5621	C40H80NO8P	-0,816765032	0,567713505	8,02E-05
PC aa C32:1	731.5465	C40H78NO8P	-1,112970512	0,462341089	0,004215081
PC aa C32:3	727.5152	C40H74NO8P	-0,972340938	0,50967838	0,000516169
PC aa C34:1	759.5778	C42H82NO8P	-0,600732019	0,659419283	0,001680222
PC aa C34:3	755.5465	C42H78NO8P	-0,933034279	0,523755619	0,000294491
PC aa C34:4	753.5308	C42H76NO8P	-1,197614831	0,435995506	0,000144945
PC aa C36:1	787.6091	C44H86NO8P	-1,279237326	0,41201326	3,20E-06
PC aa C36:2	785.5934	C44H84NO8P	-0,475708327	0,719113636	0,032444668
PC aa C36:3	783.5778	C44H82NO8P	-1,04508789	0,484615385	5,14E-06
PC aa C36:4	781.5621	C44H80NO8P	-0,575248832	0,67117048	0,002242529
PC aa C36:5	779.5465	C44H78NO8P	-1,051901949	0,482331872	1,39E-05
PC aa C36:6	777.5308	C44H76NO8P	-1,199688149	0,43536938	0,000113369
PC aa C38:0	817.6560	C46H92NO8P	-1,088211855	0,47034398	1,04E-05
PC aa C38:3	811.6091	C46H86NO8P	-1,226224714	0,427434506	9,52E-06
PC aa C38:4	809.5934	C46H84NO8P	-0,83287092	0,561410939	8,21E-05
PC aa C38:5	807.5778	C46H82NO8P	-0,859474277	0,551153364	0,000160105

(CONTINUAÇÃO)

PC aa C38:6	805.5621	C46H80NO8P	-0,771550148	0,585787719	0,007050608
PC aa C40:1	827.6767	C48H94NO7P	-0,736424144	0,600225225	0,001695897
PC aa C40:2	841.6560	C48H92NO8P	-1,469986465	0,360985685	0,000273156
PC aa C40:3	839.6404	C48H90NO8P	-1,253563327	0,41941102	1,20E-06
PC aa C40:4	837.6247	C48H88NO8P	-1,045271432	0,484553735	2,87E-05
PC aa C40:5	835.609	C48H86NO8P	-0,860673038	0,550695591	0,000199974
PC aa C40:6	833.5934	C48H84NO8P	-0,830205036	0,562449301	0,001114185
PC aa C42:2	869.6873	C50H96NO8P	-0,934059121	0,523383693	0,001401002
PC aa C42:4	865.6560	C50H92NO8P	-1,13711094	0,454669161	0,000112471
PC aa C42:5	863.6404	C50H90NO8P	-0,887820117	0,54043008	2,62E-05
PC aa C42:6	861.6247	C50H88NO8P	-0,740200226	0,598656262	7,36E-06
PC ae C30:0	691.5515	C38H78NO7P	-1,123445483	0,458996328	0,000196794
PC ae C30:1	689.5359	C38H76NO7P	-1,952207562	0,258420502	8,69E-06
PC ae C30:2	687.5202	C38H74NO7P	-1,288510166	0,409373561	0,000417158
PC ae C32:1	717.5672	C40H80NO7P	-1,095606427	0,467939387	0,000350997
PC ae C32:2	715.5515	C40H78NO7P	-1,138684978	0,45417337	0,000176835
PC ae C34:0	747.6141	C42H86NO7P	-1,091324762	0,469330212	4,58E-06
PC ae C34:1	745.5985	C42H84NO7P	-0,953625555	0,516333262	0,000231456
PC ae C34:2	743.5828	C42H82NO7P	-1,073455772	0,47517941	0,001042129
PC ae C34:3	741.5672	C42H80NO7P	-1,173578712	0,443320287	2,05E-05
PC ae C36:0	775.6454	C44H90NO7P	-0,896749505	0,537095484	4,76E-06
PC ae C36:1	773.6298	C44H88NO7P	-1,188166148	0,438860354	1,00E-06
PC ae C36:2	771.6141	C44H86NO7P	-1,018728431	0,493551169	0,000214255
PC ae C36:3	769.5985	C44H84NO7P	-1,170080578	0,444396519	2,70E-05
PC ae C36:4	767.5828	C44H82NO7P	-1,073270657	0,475240385	1,42E-05
PC ae C36:5	765.5672	C44H80NO7P	-1,021134213	0,492728828	0,000166298
PC ae C38:0	803.6767	C46H94NO7P	-1,033501153	0,488523154	2,33E-05

(CONTINUAÇÃO)

PC ae C38:1	801.6611	C46H92NO7P	-1,675794476	0,3129937	8,98E-05
PC ae C38:2	799.6454	C46H90NO7P	-1,392144336	0,380998088	0,000112264
PC ae C38:3	797.6298	C46H88NO7P	-1,66153572	0,316102484	1,16E-06
PC ae C38:4	795.6141	C46H86NO7P	-1,003191474	0,498895142	2,60E-05
PC ae C38:5	793.5985	C46H84NO7P	-0,94794872	0,518368975	6,56E-05
PC ae C38:6	791.5828	C46H82NO7P	-1,086190594	0,471003409	2,82E-05
PC ae C40:1	829.6924	C48H96NO7P	-1,070697944	0,476088622	4,82E-06
PC ae C40:2	827.6767	C48H94NO7P	-1,264396649	0,416273421	1,67E-05
PC ae C40:3	825.6611	C48H92NO7P	-1,762213312	0,294795557	0,001695897
PC ae C40:4	823.6454	C48H90NO7P	-1,040208652	0,486257143	0,001695897
PC ae C40:5	821.6298	C48H88NO7P	-1,121312699	0,459675379	8,57E-05
PC ae C40:6	819.6141	C48H86NO7P	-0,931252323	0,524402939	0,000318982
PC ae C42:0	859.7393	C50H102NO7P	-0,303787343	0,810122879	2,46E-05
PC ae C42:1	857.7237	C50H100NO7P	-1,177461871	0,44212865	0,000419064
PC ae C42:2	855.7080	C50H98NO7P	-1,107313934	0,464157413	0,000774682
PC ae C42:3	853.6924	C50H96NO7P	-1,004569344	0,498418891	0,002690714
PC ae C44:3	881.7237	C52H100NO7P	-1,093109404	0,46875	0,001151797
PC ae C44:5	877.6924	C52H96NO7P	-0,860064151	0,55092806	0,002951636
Phe	165.0789	C9H11NO2	-0,762967041	0,589283166	0,001555469
Pro	115.063	C5H9NO2	-0,49660728	0,708771609	0,124425176
Sarcosine	89.0476	C3H7NO2	-0,884246957	0,541770237	0,001704744
SDMA	202.142	C8H18N4O2	-1,152003093	0,45	0,000768731
Ser	105.0425	C3H7NO3	-0,998161586	0,500637552	0,001863923
SM (OH) C14:1	688.5155	C37H73N2O7P	-1,047550278	0,48378895	5,43E-06
SM (OH) C16:1	716.5468	C39H77N2O7P	-1,133295853	0,455873087	0,000176835
SM (OH) C22:1	800.6407	C45H89N2O7P	-0,945679124	0,519185097	8,07E-05
SM (OH) C22:2	798.6250	C45H87N2O7P	-1,000498972	0,4998271	0,000516169

(CONCLUSÃO)					
SM (OH) C24:1	828.6720	C47H93N2O7P	-1,02667165	0,490841232	0,000335927
SM C16:0	703.5753	C39H80N2O6P	-0,936301444	0,52257085	1,99E-05
SM C16:1	715.5753	C40H80N2O6P	-0,912892922	0,531119012	0,000311214
SM C18:0	732.6145	C41H85N2O6P	-1,14245634	0,452987662	0,000112264
SM C18:1	728.5832	C41H81N2O6P	-1,148406528	0,451123226	0,001112618
SM C20:2	754.598	C43H83N2O6P	-0,876976559	0,544507355	0,028473834
SM C24:0	815.7006	C47H96N2O6P	-1,023285377	0,491994681	1,32E-06
SM C24:1	812.677	C47H93N2O6P	-1,008678493	0,497001292	0,00032071
SM C26:0	843.7319	C49H100N2O6P	-0,922399563	0,527630708	0,003399102
SM C26:1	840.7084	C49H97N2O6P	-1,1634281	0,446450428	0,000826468
Taurine	125.0146	C2H7NO3S	-1,62585413	0,324018001	1,36E-06
Thr	119.0582	C4H9NO3	-0,975479355	0,508570838	0,002004732
Trp	204.0898	C11H12N2O2	-0,77671481	0,583694424	0,001126067
Tyr	181.0738	C9H11NO3	-0,818414571	0,567064768	0,000827244
Val	117.0789	C5H11NO2	-0,676225058	0,625800598	0,001325058

Fonte: O autor, 2018.

APÊNDICE E - Metabólitos significativos análise univariada do Grupo: LLC vs. SMD

(CONTINUA)

Metabólito	Massa Monoisotópica	Fórmula Química	log fold chance	Fold change	p-valor
Asn	132.0534	C4H8N2O3	2,029679879	4,08314239	0,027694372
Asp	133.0375	C4H7NO4	5,861653579	58,14783527	0,020369043
C0	161.105	C7H15NO3	0,367624255	1,290226411	0,08228786
C10	315.2409	C17H33NO4	1,416656305	2,669660534	0,007670478
C10:2	423.3348	C25H45NO4	0,889695592	1,852785146	0,002107497
C12	343.2722	C19H37NO4	0,680933102	1,603176318	0,018876453
C14	371.3035	C21H41NO4	0,468265761	1,383445452	0,001017727
C14:1	369.2879	C21H39NO4	1,094382255	2,135216346	0,014720848
C14:1-OH	385.2828	C21H39NO5	0,988473747	1,984084881	0,002088629
C16	399.3348	C23H45NO4	0,919276913	1,891167192	0,000474878
C16:1	397.3192	C23H43NO4	1,011878351	2,016534867	0,004830276
C16:1-OH	413.3141	C23H43NO5	0,653809664	1,573317308	0,002430398
C18	427.3661	C25H49NO4	0,934841736	1,911680912	0,000361123
C18:1	425.3505	C25H47NO4	1,193970475	2,287815126	7,02876E-05
C18:1-OH	441.3454	C25H47NO5	0,693896872	1,617647059	0,008354966
C18:2	423.3348	C25H45NO4	1,131895136	2,191464238	0,000344279
C5	245.1627	C12H23NO4	0,695798074	1,61978022	0,017904107
C5-OH (C3-DC-M)	263.1732	C12H25NO5	0,62347693	1,540583554	0,017358669
C6:1	257.1627	C13H23NO4	0,937962042	1,915820029	0,011734673
Cit	175.0956	C6H13N3O3	10,25701378	1223,682679	0,007696976
His	155.069	C6H9N3O2	0,396599315	1,316401262	0,052201025
Ile	131.0946	C6H13NO2	0,723173671	1,650809529	0,003769572
Lys	146.1055	C6H14N2O2	0,617997999	1,534743967	0,020478587

(CONTINUAÇÃO)

lysoPC a C14:0	467.3011	C22H46NO7P	0,3738582	1,295813596	0,003485334
lysoPC a C16:0	495.3324	C24H50NO7P	0,656604249	1,57636787	0,002036524
lysoPC a C16:1	493.3168	C24H48NO7P	0,869640655	1,827207724	7,35378E-05
lysoPC a C17:0	509.3481	C25H52NO7P	0,656070109	1,575784346	0,008352264
lysoPC a C18:0	523.3637	C26H54NO7P	0,691709998	1,615196845	0,001418699
lysoPC a C18:1	521.3481	C26H52NO7P	0,763994508	1,698186029	0,000177165
lysoPC a C18:2	519.332	C26H50NO7P	0,421228646	1,339067462	0,095934681
lysoPC a C20:3	545.3481	C28H52NO7P	0,932646066	1,908773695	0,000145049
lysoPC a C20:4	543.3324	C28H50NO7P	0,608988598	1,525189599	0,020597342
Met	149.051	C5H11NO2S	0,46132793	1,37680852	0,131893273
Orn	132.0898	C5H12N2O2	1,000035718	2,000049516	0,001701615
PC aa C28:1	675.4839	C36H70NO8P	0,601419078	1,517208204	0,003414732
PC aa C32:0	733.5621	C40H80NO8P	0,519188389	1,433148781	0,001756571
PC aa C32:1	731.5465	C40H78NO8P	0,658206414	1,578119456	0,020478587
PC aa C32:3	727.515	C40H74NO8P	0,265262875	1,201855021	0,228218052
PC aa C34:1	759.5778	C42H82NO8P	0,528850966	1,442779637	0,001299104
PC aa C36:1	787.6091	C44H86NO8P	0,660027943	1,580113228	0,001681083
PC aa C36:3	783.5778	C44H82NO8P	0,687987879	1,611035047	0,00376201
PC aa C36:4	781.562	C44H80NO8P	0,379849628	1,301206223	0,054800219
PC aa C38:0	817.6560	C46H92NO8P	0,725275057	1,6532158	0,006517735
PC aa C38:3	811.6091	C46H86NO8P	0,770229173	1,705540689	0,001827861
PC aa C38:4	809.5934	C46H84NO8P	0,590283427	1,505542492	0,009010016
PC aa C38:5	807.5778	C46H82NO8P	0,527613414	1,441542542	0,011125074
PC aa C38:6	805.5621	C46H80NO8P	0,479496681	1,394257161	0,004292052
PC aa C40:4	837.6247	C48H88NO8P	0,68647274	1,609344003	0,002591376
PC aa C40:5	835.6098	C48H86NO8P	0,509908662	1,423960041	0,017660982

(CONTINUAÇÃO)

PC aa C40:6	833.5934	C48H84NO8P	0,498659916	1,412900544	0,005978627
PC ae C32:2	715.551	C40H78NO7P	0,389944346	1,310342855	0,127002222
PC ae C34:0	747.6141	C42H86NO7P	0,563323809	1,477669686	0,009835896
PC ae C34:1	745.5985	C42H84NO7P	0,4962574	1,410549603	0,018601628
PC ae C36:0	775.6454	C44H90NO7P	0,518223938	1,432191032	0,020864411
PC ae C36:1	773.6298	C44H88NO7P	0,472305948	1,387325144	0,029820268
PC ae C36:2	771.614	C44H86NO7P	0,397973207	1,317655481	0,076772179
PC ae C36:3	769.598	C44H84NO7P	0,423230679	1,340926981	0,103153751
PC ae C36:4	767.5828	C44H82NO7P	0,692968676	1,616606638	0,002464189
PC ae C36:5	765.5672	C44H80NO7P	0,816546624	1,761185198	0,000569127
PC ae C38:0	803.6767	C46H94NO7P	0,414540916	1,332874472	0,023674155
PC ae C38:2	799.645	C46H90NO7P	0,32855817	1,255757742	0,208232788
PC ae C38:4	795.6141	C46H86NO7P	0,508779463	1,422845942	0,029955616
PC ae C38:5	793.5985	C46H84NO7P	0,734605807	1,663942762	0,001261261
PC ae C38:6	791.5828	C46H82NO7P	0,770976243	1,706424096	0,00028453
PC ae C40:1	829.692	C48H96NO7P	0,313144304	1,242412546	0,192784688
PC ae C40:2	827.676	C48H94NO7P	0,415080714	1,333373273	0,12161882
PC ae C40:6	819.614	C48H86NO7P	0,485689749	1,400255164	0,05912771
PC ae C42:0	859.739	C50H102NO7P	0,158290872	1,115964297	0,062141356
Phe	165.0789	C9H11NO2	0,434332025	1,351285036	0,048697955
SM (OH) C14:1	688.5155	C37H73N2O7P	0,754274316	1,686782917	0,000628518
SM (OH) C16:1	716.5468	C39H77N2O7P	0,641429452	1,55987395	0,003502007
SM (OH) C22:1	800.6407	C45H89N2O7P	0,547338198	1,461386918	0,009982093
SM (OH) C22:2	798.6250	C45H87N2O7P	0,699011747	1,62339238	0,001651426
SM (OH) C24:1	828.6720	C47H93N2O7P	0,477659514	1,392482806	0,046568017
SM C16:0	703.5753	C39H80N2O6P	0,573946702	1,48859026	0,009859873

(CONCLUSÃO)

SM C16:1	715.5753	C40H80N2O6P	0,733232263	1,662359329	0,00085419
SM C18:0	732.6145	C41H85N2O6P	0,642579353	1,561117743	0,005856096
SM C18:1	728.5832	C41H81N2O6P	0,719442028	1,646545099	0,005877154
SM C24:0	815.7006	C47H96N2O6P	0,462206183	1,377646919	0,029455458
SM C24:1	812.6778	C47H93N2O6P	0,577812221	1,492584099	0,025574782
SM C26:0	843.7319	C49H100N2O6P	0,570038372	1,484563056	0,020249897
SM C26:1	840.7084	C49H97N2O6P	0,630442171	1,548039379	0,015607675
Taurine	125.0146	C2H7NO3S	-1,072799191	0,475395717	0,040079828
Thr	119.0582	C4H9NO3	2,78358519	6,88561344	0,012728682
Tyr	181.073	C9H11NO3	0,444905294	1,361224755	0,139487238

Fonte: O autor, 2018.

APÊNDICE F - Metabólitos do grupo LLC vs. CTRL e suas respectivas ligações com as vias do metabolismo do câncer na base KEGG

Classe	Metabólito	Vias relacionadas KEGG	Oncogenes	Genes supressores de tumor
Aminoácido	Ala	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácido	Arg	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Glicerofosfolipideos	lysoPC a C18:0	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolipideos	lysoPC a C20:3	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolipideos	lysoPC a C20:4	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolipideos	lysoPC a C24:0	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolipideos	PC aa C36:1	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Aminoácido	Ser	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácido	Trp	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácido	Val	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53

Fonte: O autor, 2018.

Legenda: Oncogenes: RAS, PI3K, AKT e c-Myc. Genes supressores de tumor: SIRT3, SIRT6 e p53. NA: Não avaliado.

APÊNDICE G: Metabólitos do grupo SMD vs. CTRL e suas respectivas ligações com as vias do metabolismo do câncer na base KEGG

Classe	Metabólito	Vias relacionadas KEGG	Oncogenes	Genes supressores de tumor
Aminoácidos	Ala	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácidos	Arg	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácidos	Asp	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácidos	His	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;Akt;c-Myc	SIRT3;SIRT6;p53
Aminoácidos	Ile	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;Akt;c-Myc	SIRT3;SIRT6;p53
Aminoácidos	Leu	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;Akt;c-Myc	SIRT3;SIRT6;p53
Glicerofosfolídeos	lysoPC a C16:0	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolídeos	lysoPC a C16:1	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolídeos	lysoPC a C17:0	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolídeos	lysoPC a C18:0	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolídeos	lysoPC a C18:1	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolídeos	lysoPC a C20:3	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolídeos	lysoPC a C20:4	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolídeos	lysoPC a C24:0	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolídeos	PC aa C32:0	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolídeos	PC aa C34:1	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolídeos	PC aa C36:1	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolídeos	PC aa C36:2	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Aminoácidos	Phe	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácidos	Ser	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácidos	Trp	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácidos	Tyr	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácidos	Val	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53

Fonte: O autor, 2018.

Legenda: Oncogenes: RAS, PI3K, AKT e c-Myc. Genes supressores de tumor: SIRT3, SIRT6 e p53. NA: Não avaliado.

APÊNDICE H - Metabólitos do grupo LLC vs. SMD e suas respectivas ligações com as vias do metabolismo do cancer na base KEGG

Classe	Metabólito	Vias relacionadas KEGG	Oncogenes	Genes supressores de tumor
Aminoácidos	Asn	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácidos	Asp	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;AKT;c-Myc	SIRT3;SIRT6;P53
Aminoácidos	Ile	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;Akt;c-Myc	SIRT3;SIRT6;p53
Glicerofosfolípeos	lysoPC a C16:0	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolípeos	lysoPC a C16:1	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolípeos	lysoPC a C17:0	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolípeos	lysoPC a C18:0	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolípeos	lysoPC a C18:1	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolípeos	lysoPC a C20:3	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolípeos	lysoPC a C20:4	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolípeos	PC aa C32:0	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolípeos	PC aa C34:1	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Glicerofosfolípeos	PC aa C36:1	Metabolismo da colina no câncer	RAS;PI3K	NA
Aminoácidos	Phe	Metabolismo central do carbono no câncer	RAS;PI3K;Akt;c-Myc	SIRT3;SIRT6;p53

Fonte: O autor, 2018.

Legenda: Oncogenes: RAS, PI3K, AKT e c-Myc. Genes supressores de tumor: SIRT3, SIRT6 e p53. NA: Não avaliado.

ANEXOS

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mieloides, linfoides e mielodisplasia”

SUBPROJETO: “Leucemia Linfocítica Crônica: avaliação de fatores de diagnóstico e prognósticos e sua relação com o estadiamento da doença”

Prezado (a) Senhor (a),

O Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle das Neoplasias Mieloides, Linfoides e Mielodisplasias. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de apenas 10 mL de seu sangue para realizarmos exames laboratoriais que incluirão dosagens de proteínas, exames genéticos e testes com biomoléculas, importantes parâmetros para o diagnóstico, avaliação de prognóstico e descoberta de novas drogas para tratamento destas doenças. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. O (a) Sr(a) não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração

por sua participação. O participante e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com o participante e a outra com o pesquisador.

Qualquer outra informação que desejar poderá ser obtida com o Professor Adriano de Paula Sabino da Faculdade de Farmácia/UFMG, através do telefone 3409-6882. Informações sobre os aspectos éticos da pesquisa poderão ser obtidas com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG/COEP, pelo telefone 3409-4592, localizado à Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, Campus Pampulha, Belo Horizonte - MG. Desde já agradeço sua colaboração.

Prof. Adriano de Paula Sabino (Coordenador do projeto, Professor de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG)

Nome:

Documento de identificação:

Assinatura: _____

_____ Data: ____/____/____

Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – COEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 02177612.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Adriano de Paula Sabino
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de junho de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do mecanismo apoptótico e da expressão da Proteína-Tirosina Quinase Zap 70 e de micro-RNAs na Leucemia Linfocítica Crônica(LLC)" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 02177612.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Adriano de Paula Sabino
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 22 de abril de 2015, a emenda ao projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do mecanismo apoptótico e da expressão da Proteína-Tirosina Quinase Zap 70 e de micro-RNAs na LeucemiaLinfocítica Crônica(LLC)**" com as alterações:

- Inclusão de pacientes com Síndrome Mielodisplásica e Leucemias Mielóides e Linfóides;
- Substituir o título corrente por: "Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mieloides, linfóides e mielodisplasia";
- Substituir: "estudar in vitro o efeito de diferentes quimioterápicos" por estudar in vitro o efeito de biomoléculas, uma vez que quimioterápicos são usados para comparação de efeito de novas biomoléculas pelo grupo de estudo;
- Alteração do tempo de execução do projeto, com extensão do prazo para 2020.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo C - Termo Livre e esclarecido indivíduos controles

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) **Biomarcadores de Acidente Vascular Isquêmico**

Prezado(a),

- Você está sendo convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa.
- Por favor, leia atentamente todo este documento.
- Esclareça suas dúvidas com a equipe médica ou de pesquisadores que fazem parte desse estudo.
- Confirme sua participação através da assinatura deste termo.

Qual o objetivo desse estudo?

É avaliar se variações presentes no metabolismo e no DNA podem identificar o desenvolvimento do Acidente Vascular Cerebral Isquêmico. Para tanto, precisaremos de amostras de sangue de indivíduos que já tiveram a doença e de indivíduos que nunca tiveram.

Por que fui escolhido?

Este estudo envolverá pessoas de ambos os sexos com idade entre 25 e 85 anos que forem admitidas no setor de acompanhamento da neurologia da Santa Casa de Belo Horizonte. Serão excluídos deste estudo indivíduos com doenças degenerativas crônicas, cardiopatia chagásica, doença tireoidiana, doença renal crônica, tumores malignos, trauma e alcoólatras.

Sou obrigado a participar?

Nenhum indivíduo é obrigado a participar, sendo sua participação voluntária e podendo abandoná-lo em qualquer momento, sem prejuízo do seu tratamento ou perda de benefícios.

Quais os riscos e benefícios de participar do estudo?

Este estudo envolve coleta de dados de história clínica, exame físico e coleta de sangue venoso, sendo os riscos apenas os inerentes a este procedimento. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção poderá ocorrer um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. A equipe médica estará prontamente disponível no caso de qualquer eventualidade. O paciente não receberá

nenhum benefício por participar, mas poderá contribuir para o conhecimento sobre novos métodos para o diagnóstico de AVCI.

E o que acontece com as informações deste estudo?

As informações coletadas nesse estudo serão armazenadas, codificadas e datadas por um período de 10 anos. Será mantido sigilo absoluto sobre os dados pessoais do paciente, os quais serão utilizados somente para fins acadêmicos e científicos.

Qual a minha participação? Quais as etapas do estudo?

Sua participação neste estudo envolverá a coleta de 20 ml de sangue venoso utilizando técnicas adequadas. Este volume é cerca de 20 vezes menor ao volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar todas as dosagens importantes neste estudo.

Terei custos ao participar desse estudo? Receberei alguma ajuda financeira?

Não haverá custos ou nenhuma compensação financeira neste estudo.

Contatos da equipe médica e de pesquisa:

Prof Dr Paulo Pereira Christo (Santa Casa)- ppchristo@gmail.com - Tel: (31)9950-1061

Profa Dra Valéria Cristina Sandrim (Santa Casa)- valsandrin@yahoo.com.br- Tel: (31) 8866-6108

Prof Dr Rodrigo Ribeiro Resende (UFMG)- rresende@hotmail.com- Tel: (31)9129-3901

COEP-Comitê de Ética em Pesquisa(UFMG)

Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2005

Campus Pampulha - Tel: (31)3409-4592

Belo Horizonte, MG-Brasil

31270-901

Dessa maneira:

1. Informo que li o documento acima, retirei as dúvidas e compreendi de maneira satisfatória sobre a minha participação neste estudo.
2. Entendo que minha participação é voluntária e posso recusar em participar em qualquer momento, sem prejuízo para minha saúde ou tratamento.
3. Compreendo que o material coletado (Sangue venoso) será utilizado apenas para fins científicos bem como autorizo o uso dessas informações para fins de publicação científica.

Nome por extenso do Paciente: _____

Data: _____

Assinaturas:

Pesquisador

Paciente

Anexo D - Aprovação do CEP – Indivíduos controles

SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do perfil metabólico e de expressão gênica em amostras de pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico

Pesquisador: Rodrigo Ribeiro Resende

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15097113.3.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 315.034

Data da Relatoria: 29/08/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional, caso-controle, com uma casuística de 200 pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) e 100 voluntários sem AVCI, participantes provenientes do Hospital Santa Casa de Misericórdia de BH, com idade entre 25 e 85 anos. Todos os participantes serão submetidos à coleta de sangue. Serão feitas análises do perfil metabólico (metaboloma) e de expressão gênica, usando material biológico (sangue e derivados). Será realizada a detecção de metabólitos (aminoácidos e ácidos graxos) no plasma de pacientes com AVCI, mediante a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Depois, será feita a análise da expressão de genes relacionados com as vias de inflamação, usando leucócitos isolados do sangue periférico de pacientes com AVCI pela técnica de PCR. Há critérios de inclusão e de exclusão, resumo do tratamento estatístico, cronograma com data de

SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH



Continuação do Parecer: 315.034

"recrutamento dos pacientes" a partir de 01/05/13 e custo de dezessete mil reais, com financiamento próprio. As análises de perfil metabólico serão realizadas no Departamento de Química (UFMG); e as análises de expressão gênica serão realizadas no laboratório de Sinalização Celular e Nanotecnologia (UFMG).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: - Pesquisar, identificar e caracterizar os perfis metabólitos e genéticos de pacientes com AVCI em busca de novos biomarcadores que possam contribuir efetivamente para o diagnóstico da doença.

Objetivo Secundário: - Busca e seleção, com base na literatura, de metabólitos representativos de vias de sinalização envolvidas com o dano celular (endotélio, micróglia, neurônios e astrócitos) e inflamação, que serão usados na padronização da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; - Padronização das condições de análise, identificação e quantificação de aminoácidos, ácidos graxos, ácidos biliares e carboidratos presentes no soro de pacientes com AVCI usando GC-MS; - Realizar a análise da expressão gênica em amostras de sangue periférico de pacientes com AVCI, identificando genes diferentemente expressos nos subtipos da doença; - Estabelecer e correlacionar os perfis de expressão gênica com os perfis dos metabólitos encontrados nas amostras analisadas; - Investigar o potencial dos metabólitos e genes em diferenciar os subtipos de AVCI; - Investigar a correlação dos genes e metabólitos encontrados com as principais vias de sinalização celular envolvidas com a doença, como por exemplo, vias de inflamação".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores "este estudo envolve coleta de dados de história clínica, exame físico e

Endereço:	Rua Domingos Vieira 590	CEP:	30.150-240
Bairro:	Santa Efigênia		
UF:	MG	Município:	BELO HORIZONTE
Telefone:	(31)3238-8933	Fax:	(31)3238-8838
		E-mail:	cep@santacasaBH.org.br

Página 22 de 34

SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH



Continuação do Parecer 315.034

coleta

de sangue venoso, sendo os riscos apenas os inerentes a este procedimento". Entretanto, não foram descritos os riscos no projeto. E segundo os pesquisadores não há benefícios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo os pesquisadores, "atualmente nenhum teste sanguíneo para AVCI é usado na prática clínica". A identificação de biomarcadores, objetivo principal do projeto, pode nortear a abordagem daqueles pacientes, com vistas à melhora de seu prognóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A 1ª versão foi considerados os seguintes termos:

Anexados projeto de pesquisa (também em documento word), termos de compromissos de todos os pesquisadores, parecer consubstanciado do Departamento de Imunologia e Bioquímica, TCLE e folha de rosto. Não há cartas de anuência dos laboratórios, nos quais serão feitas as análises de perfil metabólico e de expressão gênica. Não há carta de anuência do Hospital Santa Casa. O TCLE está em forma de convite, porém é colocado que "Este estudo foi rigorosamente avaliado por um comitê de ética em pesquisa que o aprovou, indicando que neste estudo não apresenta riscos para sua saúde". Não são colocados os riscos da coleta de 20 ml de sangue e não há benefícios. Há somente um TCLE para o paciente ou seu representante legal, porém com texto dirigido ao paciente. Não há dados para contato com os pesquisadores e não há dados do COEP (endereço, telefone) para os aspectos éticos.

Recomendações:

Normas atendidas de acordo com a instituição proponente.

Endereço: Rua Domingos Vieira 590	CEP: 30.150-240
Bairro: Santa Efigênia	
UF: MG	Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8933	Fax: (31)3238-8838 E-mail: cep@santacasabh.org.br

Página 03 de 04

SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH



Continuação do Parecer: 315.004

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BELO HORIZONTE, 25 de Junho de 2013

Assinador por:
Francisco das Chagas Lima e Silva
(Coordenador)