

UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**METABOLÔMICA BASEADA EM RMN PARA CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS
CAUSADOS PELA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NA POPULAÇÃO CIRCUNVIZINHA À
LAGOA MUNDAÚ EM MACEIÓ – ALAGOAS (AL), BRASIL**

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-979 – Maceió-Al**

2021

Jeferson Santana Ursulino

**METABOLÔMICA BASEADA EM RMN PARA CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS
CAUSADOS PELA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NA POPULAÇÃO CIRCUNVIZINHA À
LAGOA MUNDAÚ EM MACEIÓ - ALAGOAS (AL), BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química e Biotecnologia.

Orientador (a): Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino

Co-orientador (a): Prof. Dra. Ana Catarina R. Leite

Maceió

2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Cláudio César Temóteo Galvino – CRB4/1459

- U82m Ursulino, Jeferson Santana.
Metabolômica baseada em RMN para caracterização dos efeitos causados pela contaminação ambiental na população circunvizinha à Lagoa Mundaú em Maceió – Alagoas (AL), Brasil / Jeferson Santana Ursulino. – 2021.
104 f.: il.
- Orientador: Thiago Mendonça de Aquino.
Co-orientadora: Ana Catarina Rezende Leite.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2021.
- Bibliografia: f. 84-95.
Apêndices: f. 96-104.
1. Metabonômica. 2. Mercúrio. 3. RMN. 4. OPLS-DA. I. Título.

CDU: 547



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA**



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação do mestrando **JEFERSON SANTANA URSULINO** intitulada: “**IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS URINÁRIAS E PLASMÁTICAS DA POPULAÇÃO CIRCUNVIZINHA A LAGUNA MUNDAÚ (MACEIÓ-AL) EXPOSTA A CONTAMINANTES INORGÂNICOS POR METABOLÔMICA BASEADA EM RMN**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 25 de agosto de 2021, às 8h30, por meio de videoconferência pelo *Google Meet*.

Comissão Examinadora:

Dr. FRANCISCO JAIME BEZERRA MENDONÇA JÚNIOR, UEPB
Examinador Externo à Instituição

Dr. RICARDO OLIVEIRA DA SILVA, UFPE
Examinador Externo à Instituição

Dr. JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS, UFAL
Examinador Interno

Dra. ANA CATARINA REZENDE LEITE, UFAL
Coorientadora - Examinadora Interna

Dr. THIAGO MENDONCA DE AQUINO, UFAL
Orientador - Presidente

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, sobretudo, a minha mãe. Por estarem sempre comigo em todos os momentos importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Thiago Mendonça de Aquino pela orientação, e principalmente pelo acolhimento num momento em que eu me encontrava ainda sem orientador. Suas contribuições vão além do laboratório de pesquisa ou sala de aula. Partem de uma perspectiva de formação integral do aluno – moral, ética, humana e científica – sempre promovendo iniciativas voltadas para fortalecer a formação de recursos humanos.

Agradeço à Professora Ana Catarina Rezende Leite pelas orientações e diálogos sempre proveitosos e incentivadores, pelas grandiosas ajudas em todas as etapas de todos os projetos que fizeram parte da minha formação. E também sua boa vontade com que me recebe em seu laboratório. Seu exemplo de entusiasmo e envolvimento com a pesquisa me ensinaram muito.

Agradeço ao Professor Josué Carinhonha Caldas Santos por abrir as portas do Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica – LINQA e possibilitar a minha participação no projeto de pesquisa “Avaliação da exposição a contaminantes inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) no ambiente e parâmetros bioquímicos associados ao estresse oxidativo da população circunvizinha ao Complexo Lagunar Mundaú-Manguaba (Maceió-AL): correlação entre contaminação ambiental e qualidade da saúde humana”.

Agradeço a todos os docentes, técnicos e colegas da Pós-Graduação que me acompanharam nesse período de evolução pessoal e que colaboraram de maneira direta ou indiretamente para a realização desse projeto.

E por último, mas não menos importante, à Universidade Federal de Alagoas, especialmente ao Instituto de Química e Biotecnologia e o Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, que transformam vidas e possibilitam a realização das mais diversas pesquisas.

EPÍGRAFE

“Estamos todos conectados; uns aos outros biologicamente, à Terra quimicamente e ao resto do universo atómicamente.”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

A contaminação ambiental causa vários efeitos adversos à saúde do homem, desde a infância; dentre os efeitos prejudiciais mais importantes, podemos destacar os distúrbios cardiovasculares, aumento do estresse oxidativo, disfunção renal, distúrbios mentais, dentre outros. Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa demonstrou altos níveis de metais potencialmente tóxicos na lagoa Mundaú, localizada no município de Alagoas-AL, bem como em amostras biológicas de pescadores que frequentam a lagoa em questão. Dentre os metais estudados, podemos destacar o mercúrio, o qual apresentou uma concentração total mais elevada no sangue ($0,73-48,38 \mu\text{g.L}^{-1}$) e na urina ($0,430-10,2 \mu\text{g.L}^{-1}$) destes pescadores, quando comparados com um grupo controle ($0,29-17,30 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,210-2,65 \mu\text{g.L}^{-1}$ no sangue e urina, respectivamente). Dando continuidade a estes estudos, o objetivo deste trabalho foi revelar o efeito da exposição à contaminação ambiental no metabolismo destes mesmos pescadores que vivem no entorno da laguna Mundaú, utilizando a metabolômica baseada em RMN. Neste estudo de caso-controle, os gráficos de pontuação da análise discriminante de mínimos quadrados ortogonais (OPLS-DA) mostraram que o grupo exposto foi discriminado do grupo controle, indicando que a contaminação ambiental causou alterações nos metabólitos. Usando gráficos de vulcão, foi observado que os pescadores do grupo exposto apresentaram níveis mais elevados de glutamato, creatinina, formato e glutamina no plasma. Além disso, foram observados níveis mais elevados de glicina e TMAO na urina. Esses resultados sugerem que a contaminação ambiental na laguna Mundaú pode ser responsável por causar prejuízos no metabolismo (ciclo de Krebs, beta-oxidação, via da creatina) e no estresse oxidativo (metabolismo da glutatona) dos pescadores.

Palavras-chaves: Metabolômica, Mercúrio, RMN, OPLS-DA.

ABSTRACT

Environmental contamination causes several adverse effects on human health from childhood onwards; among the most important effects, we can highlight cardiovascular disorders, increased oxidative stress, kidney dysfunction, and mental disorders. A study carried out by our research group demonstrated high levels of potentially toxic metals in Mundaú lake, located in the municipality of Alagoas-AL, as well as in biological samples from fishers who frequent the lake in question. Among the studied metals, we can highlight mercury, which had a higher total concentration in blood (0.73-48.38 $\mu\text{g.L}^{-1}$) and urine (0.430-10.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$) of these fishermen, when compared to a control group (0.29-17.30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 0.210–2.65 $\mu\text{g.L}^{-1}$ in blood and urine, respectively). Continuing these studies, this work aimed to reveal the effect of exposure to environmental contamination on the metabolism of these same fishermen living in the vicinity of the Mundaú lagoon, using the NMR-based metabolomics. In this case-control study, the orthogonal least squares discriminant analysis (OPLS-DA) showed that the exposed group was discriminated from the control group, indicating that environmental contamination caused alterations in the metabolite concentrations. Using Vulcan plots, it was observed that fishers in the exposed group had higher levels of glutamate, creatinine, formate, and glutamine in plasma. In addition, they showed higher levels of glycine and TMAO in urine. These results suggest that environmental contamination in the Mundaú lagoon may be responsible for causing damage to the fishermen's metabolism (Krebs cycle, beta-oxidation, creatine pathway) and oxidative stress (glutathione metabolism).

Keywords: Metabonomics, Mercury, NMR, OPLS-DA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Protocolo de preparação e análise das amostras de urina..	40
Figura 2: Protocolo de preparação e análise das amostra de plasma.	41
Figura 3: Efeito da correção de fase no espectro ¹ H RMN de urina. (A) antes; (B) depois ...	43
Figura 4: Região entre δ 2.50 – 2.75 ppm de 50 espectros ¹ H RMN de urina. (A) antes; (B) depois do alinhamento	45
Figura 5: 50 espectro de urina sobrepostos para selecionar regiões para cortes e análise. (A) antes; (B) depois dos cortes	47
Figura 6: 50 espectro de urina sobrepostos para realizar a normalização. (A) antes; (B) depois da normalização pela mediana.....	49
Figura 7: Espectro representativo de ¹ H RMN obtido a partir de uma amostra de urina.....	54
Figura 8: Análise não supervisionada do conjunto de dados espectrais de ¹ HRMN - Urina. (A) Gráfico de pontuação de PCA mostrando controles (verde) e expostos (vermelho), representando as duas componentes principais (PCs) do PCA usando os 35 metabólitos urinários identificados e quantificados. (B) Gráficos de carregamento dos metabólitos, mostrando as 3 principais variáveis (metabólitos) com a maior contribuição para as duas PCs do PCA. (C) Mapa de calor com cluster para os controles (verde) e amostras do grupo exposto (vermelho). A cor corresponde ao valor da intensidade do pico do metabólito (vermelho, regulado para cima; azul, regulado para baixo).....	55
Figura 9: Análise supervisionada do conjunto de dados espectrais de ¹ H RMN - Urina. (A) O gráfico de pontuação de OPLS-DA entre controles (verde) e expostos (vermelho) mostra o componente preditivo e o componente ortogonal. (B) Teste de permutação 2000x. (C) Gráfico de vulcão para os dados metabolômicos. Metabólitos com \log_2 (alteração de dobra) além de 1,0 ou abaixo de - 1,0 com valor de $p < 0,05$ foram considerados significativamente alterados...58	58
Figura 10: Curva ROC - Urina. (A) Modelo de metabólitos de combinação calculado a partir da análise de regressão logística. (B) Probabilidades de classe previstas para cada amostra usando o melhor classificador (baseado em AUC). Como uma abordagem de subamostragem balanceada é usada para o treinamento do modelo, o limite de classificação está sempre no centro ($x = 0,5$, a linha pontilhada).....	60
Figura 11: Espectro representativo de ¹ H RMN obtido a partir de uma amostra de plasma. .	63

Figura 12: Análise não supervisionada do conjunto de dados espectrais de ¹ H RMN - Plasma . (A) Gráfico de pontuação de PCA mostrando controles (verde) e expostos (vermelho), representando as duas componentes principais (PCs) do PCA usando os 19 metabólitos plasmáticos identificados e quantificados. (B) Gráficos de carregamento dos metabólitos, mostrando as 3 principais variáveis (metabólitos) com a maior contribuição para as duas PCs do PCA. (C) Mapa de calor com cluster para os controles (verde) e amostras do grupo exposto (vermelho). A cor corresponde ao valor da intensidade do pico do metabólito (vermelho, regulado para cima; azul, regulado para baixo).....	65
Figura 13: Figura 9: Análise supervisionada do conjunto de dados espectrais de ¹ H RMN - Plasma . (A) O gráfico de pontuação de OPLS-DA entre controles (verde) e expostos (vermelho) mostra os componentes preditivos e os componentes ortogonais. (B) Teste de permutação 2000x (C) Gráficos de vulcão para os dados metabolômicos. Metabólitos com log ₂ (alteração de dobra) além de 1,0 ou abaixo de - 1,0 com valor de p inferior a 0,05 foram considerados significativamente alterados.	67
Figura 14: Curva ROC - Plasma . (A) Modelo de metabólitos de combinação calculado a partir da análise de regressão logística. (B) Probabilidades de classe previstas para cada amostra usando o melhor classificador (baseado em AUC). Como uma abordagem de subamostragem balanceada é usada para o treinamento do modelo, o limite de classificação está sempre no centro (x = 0,5, a linha pontilhada).....	68
Figura 15: Perturbações no ciclo de Krebs.....	71
Figura 16: Metabolismo benzoato, glicina e hipurato.....	73
Figura 17: Perturbações na via da Creatina. (A) Metabólitos quantificados na urina. (B) Metabólitos quantificados no plasma.	75
Figura 18: Metabolismo da TMA, DMA e TMAO.....	76
Figura 19: Rede metabólica.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo da população estudada.....	53
Tabela 2: Matriz de contingência	60
Tabela 3: Validação extra: Previsões de novas amostras	61
Tabela 4: Matriz de contingência	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RMN	– Ressonância Magnética Nuclear
¹ H RMN	– Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
LINQA Analítica	– Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica
OMS	– Organização Mundial da Saúde
CELMM	– Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Mangaba
MS	– <i>Mass Spectrometry</i>
GC-MS	– <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LC-MS	– <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
CE-MS	– <i>Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry</i>
PCA	– <i>Principal Component Analysis</i>
PLS-DA	– <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
OPLS-DA	– <i>Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
Curva ROC	– <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
AUC	– <i>Area under the ROC Curve</i>
DI-MS	– <i>Direct Infusion Mass Spectrometry</i>
HAP	– Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
GSH	– Glutathiona Reduzida
TMAO	– Óxido de Trimetilamina
TMA	– Trimetilamina
DMA	– Dimetilamina
BEA	– 2-Bromoetanamina
VLDL	– <i>Very Low Density Lipoprotein</i>
LDL	– <i>Low Density Lipoprotein</i>

R2Y	– Coeficiente de Determinação
Q2	– Capacidade Preditiva
ERO	– Espécies Reativas de Oxigênio
FAPEAL	– Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas
PPSUS	– Programa Pesquisa para o SUS
TCLE	– Termo de consentimento livre e Esclarecido
NOESY	– <i>Nuclear Overhauser Effect</i>
TSP	– 3-Trimetilsilil-2,2,3,3-propionato-d ₄ de sódio
δ	– Deslocamento químico
¹ H- ¹ H COSY	– Correlation spectroscopy
¹ H- ¹³ C HMQC	– Heteronuclear multiple quantum coherence
STOCSY	– Statistical total correlation spectroscopy
VP	– Verdadeiro positivo
FP	– Falso positivo
FN	– Falso negativo
VN	– Verdadeiro negativo
PP	– Positivo
PN	– Negativo
POS	– Exemplo positivo
NEG	– Exemplo negativo
GLYAT	– Glicina N-aciltransferase
FDR	– <i>False Discovery Date</i>
CK	– Creatina quinase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Bioinformática.....	20
2.2	Biologia sistêmica	20
2.3	Metabolômica.....	21
2.4	Metabolismo.....	22
2.5	Tipos de amostras.....	23
2.6	Técnicas analíticas para análise metabolômica	23
2.7	Análise estatística	25
2.8	Metabolômica e metais potencialmente tóxicos.....	26
2.8.1	Estudos modelos.....	27
2.8.2	Ecossistemas contaminados	30
3	JUSTIFICATIVA.....	34
4	OBJETIVOS	36
4.1	Objetivo Geral	36
4.2	Objetivos Específicos	36
5	METODOLOGIA	38
5.1	Reagentes químicos e preparo de solução.....	38
5.2	Coleta e preparo de amostra biológica	39
5.3	Análise por RMN	41
5.3.1	Processamento espectral.....	42
5.4	Processamento dos dados	43
5.4.1	Alinhamento espectral	44
5.4.2	Filtragem e seleção subespectral	45

5.4.3	Normalização.....	47
5.4.4	Tratamento estatístico.....	50
6	RESULTADOS.....	52
6.1	Análise populacional	52
6.2	Análise metabolômica geral com os dados de urina	53
6.2.1	Perfil metabólico das amostras de urina.....	53
6.2.2	Análise exploratória multivariada com dados de urina	55
6.2.2.1	Análise não supervisionada - Urina	55
6.2.2.2	Análise supervisionada - Urina	57
6.2.2.3	Curva ROC - Urina	59
6.3	Análise metabolômica geral com os dados de plasma	62
6.3.1	Perfil metabólico das amostras de plasma.....	62
6.3.2	Análise exploratória multivariada com dados de plasma	64
6.3.2.1	Análise não supervisionada – Plasma	64
6.3.2.2	Análise supervisionada – Plasma	66
6.3.2.3	Curva ROC – Plasma	68
7	DISCUSSÃO	71
7.1	Ciclo de Krebs	71
7.2	Oxidação de ácidos graxos	72
7.3	Estresse oxidativo.....	73
7.4	Metabolismo creatina e creatinina.....	74
7.5	Metabolismo da TMA, DMA e TMAO	75
8	CONCLUSÃO	80
9	PERSPECTIVAS	82
	REFERÊNCIAS	84
	APÊNDICE A.....	96

APÊNDICE B.....	99
APÊNDICE C.....	101
APÊNDICE D.....	103

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Em razão dos avanços tecnológicos recentes em técnicas analíticas de alto rendimento, a velocidade no desenvolvimento nas ciências ômicas correlacionadas com as áreas da saúde e afins cresceram consideravelmente. Há décadas pesquisas relacionadas aos metabólitos e ao metaboloma vem sendo desenvolvidas. Os metabólitos são definidos como produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica (FIEHN, 2002). Já metaboloma é o conjunto dos metabólitos presentes num sistema biológico (OLIVER et al 1998). A primeira pesquisa relacionada ao metaboloma e seus constituintes foi publicada em 1999 por Nicholson e colaboradores, o qual usou o termo metabonômica (do inglês, *metabonomics*), definida como sendo a medida quantitativa da resposta metabólica de um sistema biológico após estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas (NICHOLSON et al., 1999). No ano de 2001, foi introduzido por Oliver Fiehn o termo metabolômica (do inglês, *metabolomics*), definida como a análise abrangente e quantitativa do metaboloma num sistema biológico (FIEHN, 2001). A natureza da metabolômica é examinar os metabólitos de um determinado tecido ou fluido biológico, sendo considerada uma das ciências mais atuais no campo das ômicas. A vantagem da metabolômica é o fato de que o experimento pode ser imediatamente realizado em urina ou sangue, respondendo questionamentos frente a estudos do tipo caso-controle.

Em 2007, Norman Marrison e colaboradores definiram a metabolômica ambiental sendo a ciência aplicada a organismos obtidos diretamente de seu ambiente natural, ou criados em laboratório e submetidos a estresses (MARRISON et al., 2007). Assim, a metabolômica ambiental é a pesquisa a qual envolve o estudo das respostas metabólicas de organismos a fatores bióticos – os que dizem respeito a todos os elementos associados à interação dos organismos vivos presentes em um ecossistema, como os animais e vegetais –, e fatores abióticos – compostos físicos e químicos de um ambiente, capazes de influenciar os seres vivos presentes no ecossistema de modo que as plantas e os animais tenham que se adaptar para sobreviver e se desenvolver (WISHART, 2019).

A metabolômica ambiental em tão pouco tempo ganhou relevância no meio científico, sendo emergente para o monitoramento ambiental de forma indireta, fornecendo assim informações quantitativas sobre a qualidade do ambiente, assim como o efeito real causado pela contaminação ambiental. Esta ciência vem sendo aplicada na identificação de biomarcadores em ecossistemas utilizando plantas (SUN et al., 2010), crustáceos (NAGATO et al., 2013), bivalves (BAO et al., 2016), peixes (BRANDÃO et al., 2015), ratos (GARCÍA-SEVILLANO

et al., 2013a) e humanos (GAO et al., 2014), sendo esta última abordagem escassa na literatura e objeto de interesse deste trabalho.

Os dados do grupo de pesquisa fornecidos pelo Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica – LINQA, revelaram níveis de mercúrio acima do preconizado pela Organização Mundial da Saúde - OMS na urina e sangue de voluntários em duas colônias ribeirinhas (Pontal e Barra) ao Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba – CELMM, assim como na água do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM) (SANTOS et al., 2021; SILVA-FILHO et al., 2021).

Diante do exposto, o propósito desse estudo é investigar os efeitos causados pela contaminação ambiental presente no CELMM em moradores que vivem no entorno. Em adição, observa-se a necessidade de outras pesquisas com o tema – metabolômica ambiental –, pois os estudos publicados os quais são baseados em modelos de laboratório ou ecossistemas contaminados ainda são insuficientes na associação entre contaminação ambiental, especialmente a metais potencialmente tóxicos, e biomarcadores. Neste sentido, o desenvolvimento de estudos metabolômicos é extremamente importante para identificar e compreender os potenciais efeitos causados no metaboloma. Assim, a presente dissertação buscou analisar por meio da espectroscopia de RMN de ^1H a urina e o plasma de voluntários expostos ao CELMM, bem como criar modelos estatísticos capazes de classificar corretamente as amostras, além de identificar as alterações metabólicas.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bioinformática

A Bioinformática é definida como a aplicação de ferramentas da computação na análise e interpretação de dados biológicos. É um campo interdisciplinar, que agrega a ciência da computação, matemática, física, química e biologia. Esse recurso é essencial para o gerenciamento de dados na medicina e biologia moderna, o qual encontra-se em rápido crescimento. A atividade deste campo está principalmente relacionada ao desenvolvimento de modelos classificatórios, organização das quantidades crescentes de dados produzidos por biotecnologias, e na produção de bancos de dados (LEIPZIG, 2017).

No campo das ciências ômicas, a bioinformática fornece a conexão chave entre as diferentes formas de dados coletados por diferentes técnicas analíticas de alto rendimento. Matrizes com centenas de metabólitos (metaboloma), milhares de estruturas proteicas (proteoma) ou sequenciamento do DNA (genoma) requerem sistemas de bioinformática integrados e poderosos. Assim, a bioinformática é uma ferramenta poderosa baseada na representação de informações e descrição de dados, tecnologias e modelagem de dados para a produção de banco de dados e comunicação entre eles (metanálise), a qual visa o desenvolvimento de padrões em diferentes níveis de dados, possibilitando a integração da biologia sistêmica (LEIPZIG, 2017).

2.2 Biologia sistêmica

Por décadas, a biologia computacional e experimental têm sido disciplinas separadas. A biologia sistêmica surgiu como uma única disciplina científica na qual a modelagem computacional e matemática aliada a dados biológicos experimentais são usadas para estudar sistemas biológicos (VIDAL, 2009), podendo estes estarem envolvidos por complexas redes metabólicas.

A biologia sistêmica usa uma abordagem holística que estuda o sistema completo, ao menos, o que compete a amostra, em oposição à biologia molecular, a qual se concentra em subsistemas ou determinadas biomoléculas. Apesar das diferentes abordagens, a biologia sistêmica é altamente dependente das informações produzidas pela biologia molecular. Em adição, é necessário ressaltar que os dados ômicos produzidos pela biologia sistêmica são importantes, porém a maneira como esses dados são modelados é essencial (NIELSON, 2017).

2.3 Metabolômica

A metabolômica faz parte da biologia sistêmica (especialmente, genômica e transcriptômica). Genômica estuda todo o complemento genético de um organismo (o genoma), empregando DNA recombinante, métodos de sequenciamento de DNA e bioinformática para sequenciar, montar e analisar a estrutura e função dos genomas. A transcriptômica é o estudo do conjunto completo de transcritos de RNA que são produzidos pelo genoma, em circunstâncias específicas ou em uma célula específica, usando métodos de alto rendimento, como a análise de microarranjos. A comparação entre transcriptomas permite a identificação de genes que são expressos diferencialmente em populações de células distintas ou em resposta a diferentes tratamentos (WISHART, 2019).

A metabolômica é baseada em uma análise abrangente dos metabólitos em fluidos biológicos, tecidos ou células que estão relacionados com processos metabólicos distintos nos organismos. O conjunto de biomoléculas endógenas de baixo peso molecular (normalmente 1500 Da) é definido como metaboloma (FIEHN, 2002). Por se tratar de uma análise multiparamétrica, a metabolômica permite detectar a resposta metabólica de organismos que podem ser utilizadas em ambientes clínicos (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2014a), uso de drogas (WEI et al., 2008), contaminação ambiental (ERRY et al., 2000) e toxicológica (GARCÍA-SEVILLANO et al., 2013a). De modo geral, o propósito desta metodologia é identificação de padrões metabólicos que discriminam determinados grupos de interesse.

Fatores externos e estímulos internos (fisiológicos) são capazes de afetar a variedade dos metabólitos, significando que o metaboloma é dinâmico e um representante útil do fenótipo de um indivíduo. Considerando que o genótipo indica o que pode acontecer, o fenótipo indica o que está acontecendo (WISHART, D. S., 2019). Como exemplo, a análise global do perfil metabólico exposto a metais potencialmente tóxicos permite uma compreensão dos complexos mecanismos biológicos desencadeados pelos metais dentro dos organismos, influenciando diretamente em alguma via metabólica por inibição enzimática.

Processos em que há inibição ou superexpressão enzimática, por exemplo, promovem assinaturas no metabolismo deixadas na forma de metabólitos qualificados como intermediários biossintéticos ou produto final. Um determinado estudo pode ser capaz de mapear os metabólitos disponíveis em determinado tipo de amostra, onde podemos extrapolar esses dados e entender a função e relação no que diz respeito ao entendimento do fenótipo de um organismo, produzindo informação única e desempenhando um papel fundamental na biologia sistêmica (KUEHNBAUM, N. L. et al., 2013).

As descobertas produzidas pela metabolômica estão levando a renovação do interesse sobre o metabolismo e o papel que os metabólitos desempenham em muitos processos biológicos. Logo, a ideia de que os metabólitos são “tijolos” que compõe células ou combustíveis está sendo derrubada. Os resultados de abordagens metabolômicas demonstram importantes funções como moléculas sinalizadoras, moduladoras imunológicas, toxinas endógenas e sensores ambientais. Assim, a metabolômica traz novos entendimentos sobre os metabólitos e seu papel em vários processos biológicos e fisiológicos importantes (WISHART, D. S., 2019).

2.4 Metabolismo

Diferentes formas de vida dependem da habilidade de converter nutrientes em espécies químicas, que podem ser utilizadas como blocos para a construção de macromoléculas, como proteínas, lipídios, ácidos desoxirribonucleicos (DNAs), ácidos ribonucleicos (RNAs) e carboidratos. Como forma de comunicação e defesa, algumas células produzem metabólitos secundários. Assim, o conjunto dessas reações químicas é conhecido como metabolismo, e a maioria das células realiza milhares de reações químicas diferentes, sendo a maior parte catalisada por enzimas específicas. É possível classificar o metabolismo em catabolismo e anabolismo. O processo baseado em vias de degradação, ou seja, de quebra das substâncias é definido como catabolismo, no qual está associado à geração de energia livre de Gibbs, que é armazenada durante a formação de adenosina trifosfato (ATP). A parte do metabolismo responsável pela biossíntese de moléculas complexas a partir de moléculas mais simples é definido como anabolismo (NIELSON, 2017).

Através da análise do metaboloma humano de tecidos, plasma/soro ou urina, é possível identificar uma assinatura metabólica no metabolismo promovida por uma doença. No entanto, como o número de metabólitos presentes no plasma é grande, é difícil identificar esta assinatura metabólica apenas em uma única abordagem sobre o metaboloma. Duas estratégias podem ser aplicadas: (i) Analisar o metabolismo global do tecido, plasma/soro ou urina do doente, afim de gerar uma hipótese que possa formar a base para a metabolômica direcionada, e (ii) analisar amostras que promovam uma perspectiva de “impressão digital” (plasma/soro ou líquido cefalorraquiano), combinado com as que produziram informações na forma de “pegada” (urina, saliva, águas fecais) (WISHART, D. S., 2019).

Acredita-se que essas abordagens podem levar a diagnósticos aprimorados e permitir a classificação dos pacientes em subgrupos que podem então ser tratados com precisão ou

medicina personalizada. Em adição, ao estudar o metabolismo associado ao desenvolvimento de doenças, pode ser possível identificar novos alvos de drogas (WISHART, D. S., 2019). Os resultados dessa abordagem têm-se mostrados promissores no campo do tratamento de câncer (HEIDEN et al., 2009), identificando várias enzimas metabólicas como novos alvos de fármacos (FREZZA et al., 2011; YUN et al 2015).

2.5 Tipos de amostras

O conjunto de transformações que os metabólitos sofrem no interior dos organismos vivos expressa o metabolismo celular, que ocorre em uma ampla variedade de amostras, incluindo células, tecidos, órgãos, fluidos biológicos, ou até organismos inteiros. Casos em que a metabolômica é aplicada às células ou culturas celulares servem como parâmetro ideal para investigar a fisiologia celular e processos celulares (KARGUL et al., 2017; KOSTIDIS et al., 2017). Quando extratos celulares ou o sangue são analisados, o método costuma ser chamado de “impressão digital” metabólica (ELLIS et al., 2007). Tratando-se de amostras que são considerados excrementos biológicos (como urina, suor, fezes ou saliva) são analisadas, o método é chamado de “pegada” metabólica (KELL et al. 2005). Tanto a impressão digital quanto a pegada podem revelar informações importantes e complementares sobre o metabolismo celular e a sinalização celular.

A maioria dos estudos com humanos envolve fluidos biológicos não invasivo (urina, por exemplo) ou minimamente invasivo (plasma, por exemplo). A análise de tecidos, órgãos ou seus extratos, quando aplicado a metabolômica, são particularmente úteis uma vez que preservam a fisiologia e os processos metabólicos (WISHART, 2006). Por outro lado, infelizmente, esses tipos de amostras são altamente invasivos e requer uma biópsia, geralmente limitados a estudos envolvendo animais.

2.6 Técnicas analíticas para análise metabolômica

A execução da metabolômica requer técnicas analíticas com alta seletividade e especificidade, capazes de distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas, e com a capacidade de identificação de biomoléculas de interesse na presença de outras biomoléculas na amostra. Deste modo, a Espectrometria de Massas (MS, do inglês, *Mass Spectrometry*), que juntamente com a espectroscopia de RMN, são as ferramentas analíticas mais comuns usadas para realização da metabolômica (GOLDSMITH, P. et al., 2010). Neste

sentido, existem dois tipos de análise metabolômica: a (i) direcionada e a (ii) não direcionada. Na metabolômica direcionada é analisado um grupo específico de metabólitos, como aminoácidos, lipídios e outros. Por outro lado, a metabolômica não direcionada é uma análise quantitativa e global dos metabólitos encontrados em fluido biológico, célula ou tecido (VERPOORTE et al., 2008; ISSAQ et al., 2008).

Instrumentos de MS são os mais populares nas aplicações de metabolômica, isto porque além de apresentarem alta sensibilidade, proporcionam também análises rápidas. É possível usá-la diretamente ou acoplada a técnicas de separação (mais comum) como a cromatografia gasosa GC-MS (do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), cromatografia líquida LC-MS (do inglês, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) e a eletroforese capilar CE-MS (do inglês, *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*). Para todos os instrumentos baseadas em MS, o princípio para a detecção e identificação de metabólitos é a ionização das moléculas, onde em seguida, é calculado a relação massa-carga (m/z) das moléculas ionizadas, ou seus fragmentos moleculares ionizados, os quais são comparados com outros espectros de MS de referência. Infelizmente, o processo de ionização das moléculas degrada as amostras, tornando-se assim uma técnica destrutiva.

A RMN é uma técnica analítica não destrutiva, em que as amostras podem ser recuperadas e mensuradas repetidas vezes (WISHART, 2006). Considerada uma técnica robusta, a RMN é capaz de identificar e quantificar compostos orgânicos de diferentes classes químicas dentro da faixa de micromolar (μM), com o privilégio de requerer pouca ou nenhuma manipulação de amostra, que em alguns casos podem ser analisadas intactas (sólidos e semi-sólidos) (LENZ & WILSON, 2007; PUTRI et al., 2013). A baixa sensibilidade e o fenômeno de sobreposição dos sinais são as principais limitações para amostras com grande número de metabólitos, onde alguns possuem concentração na faixa de nanomolar (nM) (ZHANG et al., 2012).

Os instrumentos de RMN e MS são inovadores e capazes de detectar e caracterizar diversos compostos químicos em misturas complexas como fluido biológico ou extratos de tecido (DUN et al., 2019; WISHART, 2011).

Os espectros ou cromatogramas obtidos a partir de fluidos biológicos apresentam alto grau de complexidade na identificação dos metabólitos. Assim, banco de dados como “*Human Metabolome Database*” (HMDB; hmdb.ca), aliado ao software CHENOMX, bibliotecas de sinais e recursos da literatura auxiliam na identificação dos sinais que são utilizados para montar um mapa metabólito com auxílio do banco de dados KEGG (genome.jp/kegg) (WISHART, et al. 2018).

2.7 Análise estatística

Os estudos envolvendo a metabolômica, em sua maioria, são observacionais do tipo caso-controle ou de “pré-intervenção *versus* pós-intervenção” (XIA et al., 2013). Conseqüentemente, os dados gerados devem ser processados e transformados em uma tabela complexa formada por dezenas ou centenas de amostras (por exemplo, em coluna) relacionadas a dezenas ou centenas de metabólitos identificados (por exemplo, em linhas) com valores de concentrações absolutas ou relativas.

Recursos estatísticos como análise multivariada, univariada e técnicas de agrupamento e classificação são necessárias para discutir o grande volume de dados (MAHIEU et al., 2016; WISHART, 2010; XIA & WISHART, 2013). Esses recursos auxiliam na seleção das alterações mais significativas dos metabólitos (para metabolômica direcionada) ou as alterações mais importantes no metaboloma (para metabolômica não direcionada), aliada a outras tendências importantes nos dados.

Com dados dessa natureza, a técnica de agrupamento mais comum é chamada Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*), considerada uma análise não supervisionada, ou seja, a classificação de cada amostra não é levada em consideração. Cada componente principal (PC) explica parte da variância dos dados. Assim, as PCs são ordenadas em função do quanto elas explicam da variância dos dados. Outras técnicas comuns para discriminação dos grupos são supervisionadas, envolvendo a correlação entre as variáveis dependentes e as variáveis de classe. Estas são denominadas Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) e Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais (OPLS-DA, do inglês, *Orthogonal partial least-squares discriminant analysis*) (MAHIEU et al., 2016; WISHART, 2010; XIA & WISHART, 2013).

Baseando-se no formalismo PLS-DA, é possível identificar os metabólitos mais importantes para a construção do modelo. Esta estratégia é realizada através da importância da variável na projeção (VIP, do inglês, *Variable Importance in Projection*), que é a soma ponderada dos quadrados dos pesos da PLS, levando em consideração a quantidade de variância explicada do metabólito em cada componente. A outra medida de importância é baseada na soma ponderada dos coeficientes de regressão PLS. Ambas as medidas de importância são implementadas na análise PLS-DA, a fim de selecionar recursos importantes (XIA et al., 2009).

As análises multivariadas não supervisionadas são aplicadas para realizar um estudo exploratório dos dados os quais não usam a informação de classe. As análises supervisionadas

são usadas, normalmente, para classificação, usando assim a informação de classe. Neste sentido, recursos multivariados são capazes de simplificar os espectros de RMN, identificar metabólitos alterados (entendendo as correlações) e classificar os grupos analisados (GARCÍA-SAVILLANO et al., 2014b; LI et al., 2019; LIN et al., 2016) ou identificar tendências importantes (WISHART 2010).

Em análises univariadas, os metabólitos (variáveis) são investigados separadamente e, diferente dos métodos multivariados, são negligenciadas as relações entre eles. Testes estatísticos como teste T de Student e ANOVA são frequentemente empregados, pois possuem a competência de selecionar metabólitos significativamente alterados entre os grupos avaliados com p -valor menor que 0,05 (SUGIMOTO et al., 2012; CHONG et al., 2019).

A análise da Curva Característica de Operação do Receptor (Curva ROC, do inglês, *Receiver Operating Characteristic Curve*), é comumente empregado em estudos metabolômicos, pois é uma ferramenta útil e poderosa para o treinamento do modelo proposto e avaliação de classificação binária. O gráfico de Curva ROC é baseado na taxa de falso positivo (especificidade) no eixo x, e de verdadeiro positivo (sensibilidade) no eixo y. A área sob a curva (AUC, do inglês, *area under the ROC Curve*), é a medida da capacidade discriminativa de um teste ou modelo, fundamentado na sensibilidade e especificidade da Curva ROC. Em outras palavras, trata-se da capacidade de um modelo classificar corretamente as amostras do grupo controle e experimental. Assim, a AUC é uma medida de precisão de um modelo. O valor de AUC varia de 0,0 até 1,0 e o limiar entre as classes estudadas é 0,5. Ou seja, acima desse limite, o algoritmo classifica em uma classe (controle, por exemplo), e abaixo na outra classe (experimental, por exemplo) (HUGHES et al., 2020).

Combinar esses dados com conhecimento biológico associado a bancos de dados com análise de enriquecimento do conjunto de metabólitos (XIA & WISHART, 2016; CHONG, et al., 2019) e modelagem de rede biológica (LI et al., 2013) podem fornecer informações importantes de como certos metabólitos contribuem para os processos bioquímicos específicos ou fenômenos fisiológicos importantes (HOLMES et al., 2008; VASILOPOULOU et al., 2016; XIA & WISHART 2016; CHONG et al., 2019).

2.8 Metabolômica e metais potencialmente tóxicos

A agressão antrópica ao meio ambiente realizada pelo homem com o uso indiscriminado de semimetals e metais potencialmente tóxicos (incluindo As, Cd, Hg, Cu, Pb, e Mn) têm provocado grandes alterações no meio ambiente e têm desencadeado um cenário de extrema

preocupação entre os estudiosos e defensores do mesmo. Para a população em geral, dieta e água potável são as principais fontes de exposição. A toxicidade resulta em danos aos pulmões, rins, fígado e outros órgãos (JAISHANKAR et al., 2014), além da existência de relatos de neurotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade do mercúrio.

Alguns estudos mostram que diferentes espécies de mercúrio podem entrar no cérebro através da ruptura da barreira hematoencefálica, danificando assim o sistema nervoso central (JAISHANKAR et al., 2014). Também é observado os efeitos nefrotóxicos de algumas espécies de mercúrio, os quais estão associados a lesões glomerular e tubular, sendo os idosos mais sensíveis aos efeitos do que os jovens (BRIDGES & ZALUPS, 2017). Há indicativos de correlação positiva entre espécies de mercúrio com hipertensão, doença cardíaca coronária, infarto do miocárdio, arritmias cardíacas, obstrução da artéria carótida, acidente vascular cerebral e aterosclerose generalizada (GENCHI et al., 2017). No entanto, mecanismos moleculares ainda precisam ser esclarecidos.

A metabolômica além de ser aplicada à toxicidade e função de metais em sistemas biológicos (GARCÍA-SEVILLANO et al., 2014b; GARCÍA-SEVILLANO et al., 2015), pode ser aplicada também a estudos envolvendo plantas (BRUNETTI et al., 2013), organismos aquáticos (GORDON & LEGGAT, 2010), fatores abióticos (ARBONA et al., 2013), fatores bióticos (MACEL et al., 2010), fatores bióticos e abióticos simultaneamente (PARK et al., 2014).

A aplicação da metabolômica na monitoração ambiental é mais complexo do que experiências controladas de exposição a metais. Isto devido ao grande número de fatores abióticos e bióticos que estão envolvidos. Contudo, a corroboração entre resultados de estudos modelos e ecossistemas poluídos pode autenticar marcadores biológicos dos metais (KAMMENGA et al., 2000).

Assim, a metabolômica tem contribuído para avaliar a exposição de humanos e roedores aos metais, indicando assim possíveis mecanismos de defesa contra a toxicidade dos mesmos, além da ocorrência de outros processos no organismo, como inibição enzimática, deficiência de antioxidantes e estresses oxidativo.

2.8.1 Estudos modelos

A literatura tem reportado alguns estudos de metabolômica investigando seres humanos como bioindicadores da poluição por metais potencialmente tóxicos (ELLIS et al., 2012; GAO et al., 2014; WU et al., 2018; WANG et al., 2018).

A exposição controlada a um metal potencialmente tóxico fornece informações valiosas sobre o modo de ação e a influência nas vias metabólicas analisando células, tecidos ou fluidos biológicos de organismos. Estes estudos podem ainda fornecer um panorama para as respostas em humanos expostos a contaminação ambiental. Entretanto, os efeitos subjacentes aos danos celulares causados por longos períodos de exposição parecem incertos (GARCÍA-SEVILLANO et al., 2013b).

Gartland e colaboradores (1989) investigaram efeitos bioquímicos de nefrotoxinas (Cromato de sódio, cisplatina, hexaclorobutadieno, cloreto de mercúrio II, propileno imina e bromoetanamina) administradas em ratos machos Fischer. O estudo por ^1H RMN forneceu informações uteis para detectar padrões anormais de metabólitos na urina dos animais. Os espectros do acompanhamento realizado por 48 horas após a administração revelaram elevação em TMAO (óxido de trimetilamina), e DMA (dimetilamina), além de elevações posteriores no acetato, succinato e N-dimetilglicina. Os autores sugeriram os metabólitos TMAO e DMA como marcadores de lesão papilar renal específica (GARLAND et al., 1989).

Holmes e colaboradores (1992) encontraram resultados semelhantes aplicando a mesma técnica analítica aliada a uma metodologia de acompanhamento por 9 dias. O cloreto de mercúrio II (HgCl_2) e 2-bromoetanamina (BEA), considerados respectivamente toxina tubular proximal e toxina medular, foram administrados em ratos Fischer. Os efeitos bioquímicos dessas toxinas na composição urinária foram observados, e a análise por PCA forneceu componentes de segregação das amostras sugerindo que as anormalidades bioquímicas causadas pelo mercúrio refletem principalmente no funcionamento de células que revestem o néfron. O teste t pareado ($p < 0,001$) considerou como metabólitos discriminatórios a valina, taurina, TMAO e glicose para HgCl_2 , e acetato, metilamina, DMA, lactato e creatina para BEA. Citrato, succinato, radical N-acetil de metabólitos não identificados, hipurato, alanina e 2-oxoglutarato apresentaram um papel importante nos ensaios de recuperação (HOLMES, E. et al., 1992).

A urina de ratos induzidos à nefrotoxicidade pelo HgCl_2 foi analisada por ^1H RMN e após 3 e 6 dias de dosagem, os animais foram sacrificados ao término do experimento no intuito de realizar exames sanguíneos e histopatológicos. Os resultados revelaram por meio do PCA uma separação dos grupos em função do tempo e da dose, e o PLS-DA a classificação. Glicose, acetato, alanina, lactato, succinato e etanol aumentaram significativamente no grupo tratado com HgCl_2 , enquanto que 2-oxoglutarato, alantoína, citrato, formato, taurina e hipurato diminuíram significativamente. Quando realizado a correlação dos dados com alterações

histopatológicas renais, concluíram que a metabolômica baseada na ^1H RMN pode ser usada para prever nefrotoxicidade induzida pelo HgCl_2 (KIM et al., 2010).

A hipótese de que TMAO está associada à danos renais foi novamente relatada, uma vez que os resultados nos níveis plasmáticos deste metabólito estavam elevados em ratos obesos, nos quais os aspectos morfológicos revelaram fibrose intersticial renal (SUN et al., 2017).

Um dos primeiros estudos aplicando a metabolômica ambiental foi publicado em 2008, o qual avaliou os efeitos toxicológicos de realgar (um mineral composto por As). Ao longo de 21 dias, foi realizado o acompanhamento da administração (1 g/kg de peso corporal) em ratos Wistar. Urina, soro e tecido hepático foram analisados por ^1H RMN, e os resultados sugeriram perturbações no metabolismo energético, aumento de intermediários do ciclo de Krebs na urina, aumento dos níveis de corpos cetônicos na urina e no plasma, e diminuição dos níveis de glicose e glicogênio hepáticos. Níveis elevados de colina e betaína no soro e tecido hepático, e aumento da creatina sérica indicaram transmetilação alterada. O aumento da glutatona nos extratos do tecido hepático foram caracterizados como biomarcador de lesão oxidativa induzida pelo As, no qual foi apoiado pelo aumento do glutamato. As variações bioquímicas observadas dependeram do tempo de exposição ao As, e indicaram lesões no fígado e rim (WEI et al., 2009).

A resposta biológica obtida pela exposição ao As tem sido relacionada a importantes vias metabólicas em diferentes estudos com ratos, onde podemos citar o metabolismo de aminoácidos, colina e energético (glicólise, ciclo de Krebs), ciclo da metionina e degradação dos fosfolipídios de membrana no fígado (GARCÍA-SEVILLANO et al., 2013a), plasma e rins (GARCÍA-SEVILLANO et al., 2014c) (WEI et al., 2009).

A elevada quantidade de Cd pode provocar diversos problemas ambientais, uma vez que é considerado um metal tóxico que pode ser acumulado em organismos vivos. Para investigar os perfis metabolômicos urinários associados a danos renais induzidos pelo Cd, a ^1H RMN foi aplicada em amostras de ratos após a exposição oral de cloreto de cádmio (CdCl_2) (1,5 e 25 mg / kg) por 6 semanas. A exposição a altas doses (25 mg/ kg) de CdCl_2 não alterou os níveis séricos de creatinina, mas ocasionou acúmulo de ureia no sangue. Em adição, foi observado que citrato, serina, 3-hidroxi-isovalerato, 4-hidroxifenilactato, DMA e betaína envolvidos no metabolismo energético estavam com seus níveis baixos no grupo exposto. O estudo ainda reportou um aumento de glicose no grupo exposto, além de distúrbio no metabolismo de aminoácidos com aumento da glicina, mas em especial, a diminuição acentuada do glutamato, cisteína, serina e metionina, aminoácidos envolvidos na via de biossíntese da glutatona, e

considerados marcadores de lesão renal mediada por Cd (LEE et al., 2014). Outro estudo aplicando apenas a ^1H RMN e recursos auxiliares 2D, considerou que Cd causa danos renais e refletem principalmente em perturbação na biossíntese da glutathione (GRIFFIN et al., 2000).

Em resumo, a metabolômica ambiental aplicada em estudos modelo envolvendo roedores expostos a metais potencialmente tóxicos (Hg, As e Cd) fornecem importantes informações bioquímicas, auxiliando assim numa melhor compreensão dos mecanismos de ação dos metais em humanos, que estão subjacentes à lesão renal.

2.8.2 Ecossistemas contaminados

Os seres humanos estão suscetíveis a exposições físicas, químicas e biológicas, e o exossoma representa o acúmulo de todas as exposições ambientais ao longo da vida. Estratégias já citadas ao longo do texto avaliam de modo abrangente a exposição e enriquece nossa compreensão de como os metais potencialmente tóxicos afetam a saúde humana.

Em uma população geral de não fumantes, a dieta é a principal fonte de exposição ao Cd, e o aparelho gastrointestinal tem a capacidade de absorver entre 5-10% do metal. Já entre os fumantes, o tabaco é uma fonte significativa de exposição devido à alta taxa de absorção pelos pulmões (10-50%), isto associado a características bioacumulativas que geram efeitos adversos a saúde (GODT et al., 2006).

A metabolômica baseada em espectroscopia de ^1H RMN foi aplicada em uma população que vive perto de uma fonte de poluição ambiental que abrigava uma das maiores fundições de Cd e outros metais potencialmente tóxicos (Avonmouth, Reino Unido). Os resultados mostraram uma associação entre o Cd e seis metabólitos urinários, associados ao metabolismo mitocondrial (citrato, 3-hidroxi-isovalerato e 2,3-di-hidroxi-butanóico) e metabolismo de um carbono (dimetilglicina, creatinina e creatina). Apenas o citrato foi positivamente correlacionado ao Cd urinário. Em adição, o marcador de estresse oxidativo 8-oxo-desoxiguanosina apresentou níveis elevados em indivíduos com alta exposição ao Cd, apoiando a hipótese de estresse oxidativo (ELLIS et al., 2012).

Aplicando a mesma abordagem, um estudo publicado em 2014 por Dudka e colaboradores investigou os efeitos causados por Cd, As e Pb, simultaneamente, em trabalhadores metalúrgicos (Głogów e Legnica - Polônia) saudáveis utilizando amostras de soro. O perfil metabólico do grupo exposto revelou o aumento de lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL, do inglês, *very low density lipoprotein*), a diminuição lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês, *low density lipoprotein*) e aumento na concentração de ácidos

graxos insaturados, implicando distúrbio no metabolismo lipídico induzido pelos metais, na qual se deve a modificações no transporte de lipídios e ácidos graxos. Outros biomarcadores também apresentaram variações entre os grupos, incluindo Glutamina, 1-metil-histidina, fenilalanina e tirosina, ambos envolvidos no ciclo de Krebs. Os resultados indicaram que a exposição aos metais causou a inativação de enzimas envolvidas no catabolismo de aminoácidos, logo as células hepáticas não recebem efetivamente o aminoácido, causando um aumento na concentração de aminoácidos livres no soro (DUDKA et al., 2014).

Em outro trabalho, a exposição a longo prazo ao Cd foi avaliada em uma comunidade ao sul da China, em que algumas áreas eram desenvolvidas atividade de mineração e fundição. Apenas a urina de não fumantes foram analisadas. O Cd na urina foi quantificado, e os grupos divididos em concentrações de Cd ≥ 5 $\mu\text{g/L}$ e < 5 $\mu\text{g/L}$. A investigação metabolômica baseada na combinação de GC-MS e LC-MS revelou uma riqueza de informações ligando vários metabólitos urinários à exposição crônica ao Cd. Para ambas as técnicas analíticas empregadas, o modelo de OPLS-DA separou claramente os grupos, e 27 biomarcadores foram identificados (19 por LC-MS e 11 por GC-MS, 3 sendo em comuns as técnicas) e foram relacionados ao metabolismo de aminoácidos (glutamina, L-cistina, L-tirosina, N-metil-L-histidina, L-histidinol, taurina, fenilacetilglutamina, hipurato e ácido piroglutâmico), metabolismo da galactose (D-galactose e mio-inositol), metabolismo da purina (xantina, ureia e desoxiadenosina monofosfato), via da creatina (creatina e creatinina) e biossíntese de hormônios esteroides (17- α -hidroxiprogesterona, tetra-hidro cortisona, estrona e corticosterona). Os biomarcadores urinários revelados por indivíduos expostos ao Cd, indicam que o sistema renal foi afetado e estão relacionados a disfunção renal e estresse oxidativo, pois o ácido piroglutâmico é um derivado ciclizado do glutamato, e seu nível elevado está associado ao metabolismo da glutatona e da glutamina, ligado ao estresse oxidativo (GAO et al., 2014).

Este estudo evidenciou as descobertas de Ellis e colaboradores 2012, correlacionando os níveis elevados de Cd com estresse oxidativo (ELLIES et al., 2012). Em uma revisão bibliográfica, foram relatados sérios efeitos adversos à saúde sob exposições crônicas ao metal em questão, afetando especialmente os rins e os ossos, além dos indicativos de que o Cd é carcinógeno (ÅKESSON et al., 2014).

Com o objetivo de avaliar a previsibilidade a longo prazo dos metabólitos urinários associados à exposição ao As, foram investigados 112 voluntários não fumantes livres de quaisquer doenças crônicas. Esta avaliação foi baseada em um estudo prospectivo de coorte epidemiológico (2 anos) para investigar a exposição ao As na água potável em Arai-hazar, Bangladesh. Um total de 16 metabólitos (aminoetanol, β -aminoácido isobutírico, ácido cítrico,

1,2-ditiano-4,5-diol, ácido etanodióico, glicina, ácido 3-hidroxi- isovalérico, ácido indol-3-acético, treonina, ácido fosfórico, ácido piroglutâmico, ácido 3,4-di-hidroxiбутанóico, serina, ácido succínico, uracila e ácido úrico) foram considerados biomarcadores associados com a exposição ao As. O metabolismo de um carbono (rota metabólica que facilita a metilação e eliminação do As) apresentou alterações, visto que glicina, treonina e serina estavam negativamente correlacionados com os níveis de As na água e urina dos voluntários (WU et al., 2018). Indicações de dano renal foi sustentada pelo metabolismo de aminoácidos, pois o ácido piroglutâmico está relacionado com a glutathione (GAO et al., 2014; ELLIES et al., 2012).

Em uma população da província de Shanxi, na China, foi investigado a exposição crônica a benzeno, metais (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mo, Ni, Pb, Zn e Se) previamente quantificados na urina por ICP-MS. Como resultado, a metabolômica baseada em LC-MS exibiu uma associação linear entre metabólitos e o teor dos metais na urina, sendo dois aminoácidos (ácido piroglutâmico e 3-metil-histidina), três ácidos orgânicos (ácido azelaico, ácido decenedióico, e ácido 3-hidroxitetradecanodióico), dez acilcarnitinas de cadeia média e um conjugado de glicuronosídeo. Estas observações sugeriram que o aumento a exposição ambiental ao metal causou vários efeitos relacionados ao estresse oxidativo, incluindo a depleção de antioxidantes. Como hipótese, alguns dos metais foram capazes de catalisar a reação de Fenton e promover a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), bem como foram capazes de se ligar ao grupo sulfidril da glutathione e proteínas, causando o esgotamento da biomolécula antioxidante e a degradação de proteínas (WANG et al., 2019).

Neste tópico do trabalho, foi demonstrado então algumas abordagens envolvendo a RMN ou/e MS aliada a metabolômica. Destaca-se o papel da metabolômica para desvendar os efeitos induzidos por metais potencialmente tóxicos em estudos modelos e ecossistemas contaminados. Em resumo, os resultados obtidos em casos envolvendo humanos expostos a ecossistemas contaminados demonstram perturbações no metabolismo energético, metabolismo de aminoácidos e estresse oxidativo. Os resultados de estudos modelos com roedores não somente corroboram com os demonstrados com humanos, bem como alterações nos aspectos morfológicos de células renais e hepáticas graças a fácil possibilidade em realizar estudos histológicos.

Esses estudos baseados na metabolômica aprimoraram nosso entendimento de como a poluição ambiental, especialmente por metais potencialmente tóxicos, podem alterar os mecanismos biológicos e projetam luzes sobre a risco de doenças hepáticas e renais.

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

O expossoma representa a soma cumulativa de influências ambientais e as diferentes respostas biológicas. Assim, a abordagem metabolômica representa uma estratégia útil, pois avalia de maneira abrangente a resposta biológica motivada por exposição a contaminantes ambiental. Desse modo, o perfil metabólico define o fenótipo de um indivíduo, que é influenciado pela saúde, estilo de vida ou exposição ambiental, assim podendo revelar metabólitos sinalizadores de doença, que refletem a resposta adaptativa à exposição. Portanto, visou estudar o metabolismo dos moradores de regiões circunvizinhas ao Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Mangaba, no intuito de se investigar eventuais efeitos deletérios à saúde por exposição a contaminantes ambientais.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar alterações metabólicas causadas por contaminantes inorgânicos (em especial mercúrio) presentes no Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba em voluntários de duas colônias ribeirinhas – Grupo Exposto – aplicando a metabolômica baseada em ^1H RMN.

4.2 Objetivos Específicos

- Obter amostras de urina e plasma de voluntários e pescadores de colônias ribeirinhas do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba, bem como de um grupo controle;
- Preparação das amostras e aquisição dos espectros de ^1H RMN;
- Processamento dos espectros, identificação e quantificação dos metabólitos;
- Discriminação dos grupos Exposto e Controle utilizando-se ferramentas estatísticas;
- Identificação de padrões metabólicos característicos;
- Desenvolvimento de uma interpretação bioquímica a partir dos resultados obtidos.

METODOLOGIA

5 METODOLOGIA

O presente estudo está aliado ao projeto de pesquisa intitulado “Avaliação da exposição a contaminantes inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) no ambiente e parâmetros bioquímicos associados ao estresse oxidativo da população circunvizinha ao Complexo Lagunar Mundaú-Manguaba (Maceió-AL): correlação entre contaminação ambiental e qualidade da saúde humana”, apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL) e Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS), com número do processo 60030 000863/2016, aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa na Universidade Federal de Alagoas, Projeto CAAE Nº 57998116.8.0000.501, tal qual assinado pelos voluntários o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (vide Apêndice A) e acompanhado pelo questionário epidemiológico (vide Apêndice B). Este estudo segue a diretriz de relatórios de Fortalecimento do Relatório de Estudos Observacionais em Epidemiologia (STROBE) para estudos de coorte (von Elm et al., 2017).

Este estudo é observacional, baseando-se no tipo caso-controle, o qual visa comparar o grupo Exposto, formado por moradores de regiões circunvizinhas a Lagoa Mundaú, ao grupo Controle, composto por voluntários que não tem contato com a Lagoa Mundaú.

A obtenção dos espectros de ^1H RMN e a análise estatística foram realizadas no Núcleo de Análises e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear - NAPRMN da Universidade Federal de Alagoas.

5.1 Reagentes químicos e preparo de solução

Em análises de amostras biológicas por ^1H RMN, como a urina, o espectro pode sofrer mudanças significativas no deslocamento químico decorrente da variação do pH, característico deste tipo de amostra. O método mais popular para minimização destes efeitos é a adição de um tampão fosfato preparado com D_2O , TSP e pH 7,4 (BOGUSZEWICZ et al., 2019; KIM et al., 2019; GRATTON et al., 2016; BECKONERT et al., 2007).

Publicado em 2007 por Beckonert e colaboradores, o procedimento para preparação do tampão fosfato (pH 7,4) foi realizado a partir de uma mistura de 28,85 g de fosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4 99,0%; Sigma-Aldrich), 5,25 g de fosfato monossódico anidro (NaH_2PO_4) 99,0%; Sigma-Aldrich), 0,146 g de 3-trimetilsilil-2,2,3,3-propionato- d_4 de sódio (TSP 98%; Sigma-Aldrich) e 100 mL água deuterada (D_2O 99,8%; Sigma-Aldrich) (BECKONERT et al., 2007).

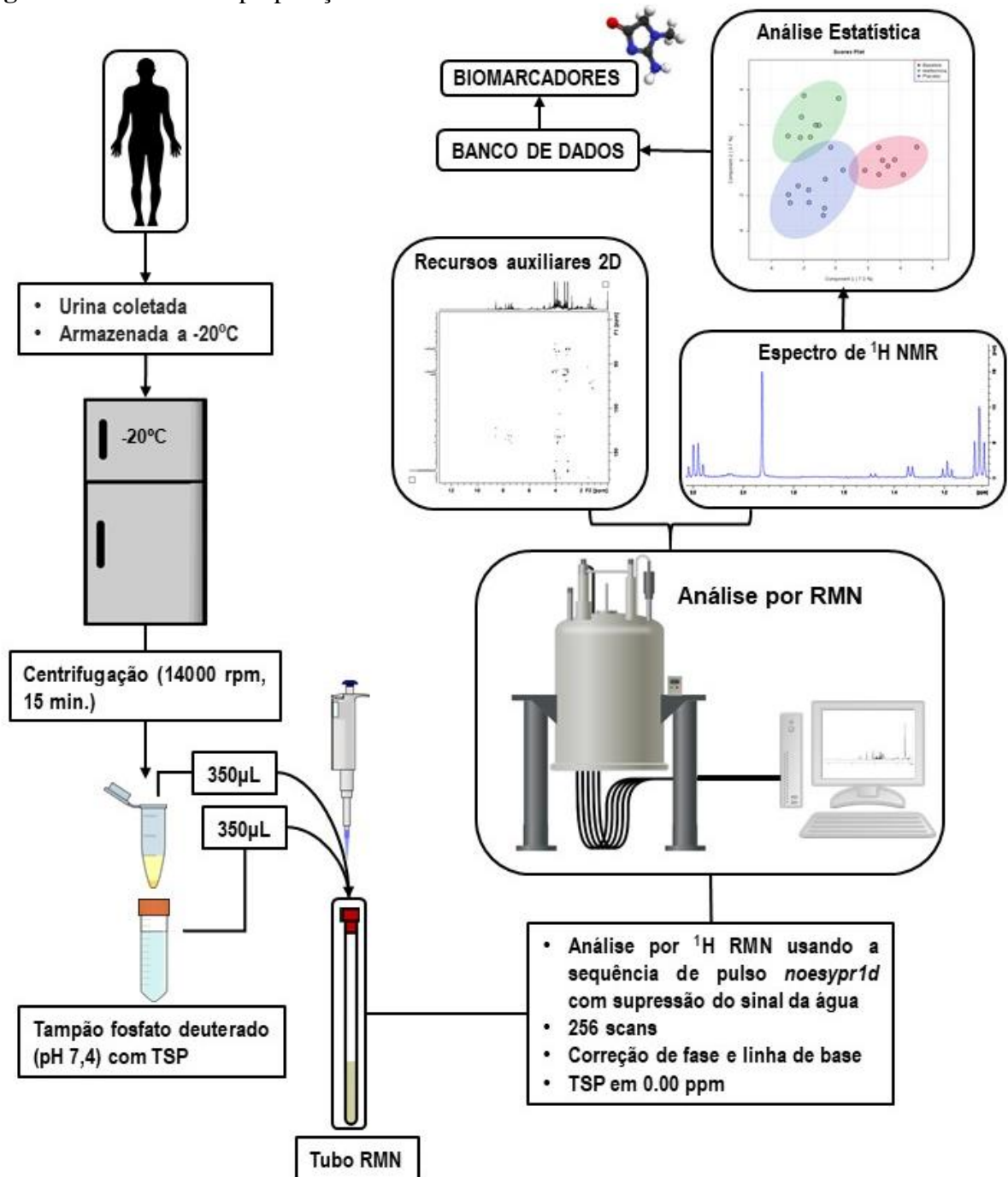
5.2 Coleta e preparo de amostra biológica

Após jejum noturno de no mínimo 10 horas, o sangue e a urina dos voluntários foram coletados. Foi orientado que o primeiro jato da urina fosse descartado, coletando apenas o jato “médio”. A coleta de sangue foi realizada em condições estritas de punção venosa.

As amostras matinais de urina foram coletadas e armazenadas a -20°C até o preparo das amostras. Estas foram descongeladas à temperatura ambiente e imediatamente centrifugada a 14000 rpm por 15 minutos. Em seguida, 350 μL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de RMN ao qual foram adicionados 350 μL tampão fosfato deuterado. Esta metodologia foi adaptada a partir de um protocolo proposto por Kim e colaboradores (2019), demonstrado na Figura 1 (KIM et al., 2019)

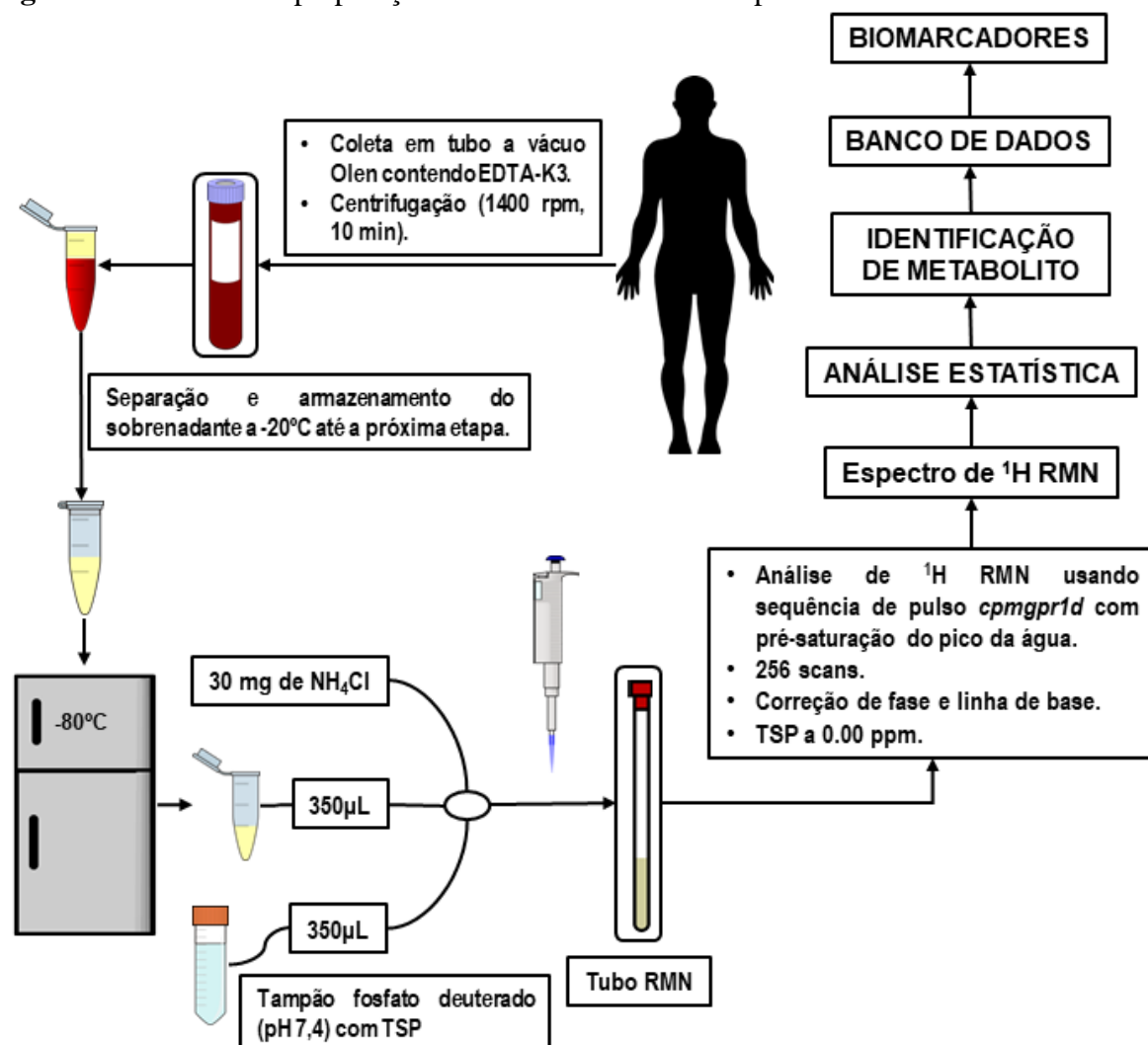
As amostras de sangue foram coletadas em tubo a vácuo Olen contendo EDTA-K3. Após, cada amostra foi centrifugada a 1400 rpm (temperatura ambiente) por 10 min para separação do plasma, e então armazenada a -20°C até o dia da análise por RMN. Todas as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, e finalmente 350 μL da amostra e 350 μL do tampão deuterado foram adicionados em um tubo de RMN, assim como 30 mg de NH_4Cl . A Figura 2 ilustra o protocolo de preparação adaptado proposto por Beckonert e colaboradores (2007).

Figura 1: Protocolo de preparação e análise das amostras de urina.



Fonte: O autor, 2021.

Figura 2: Protocolo de preparação e análise das amostra de plasma.



Fonte: O autor, 2021.

5.3 Análise por RMN

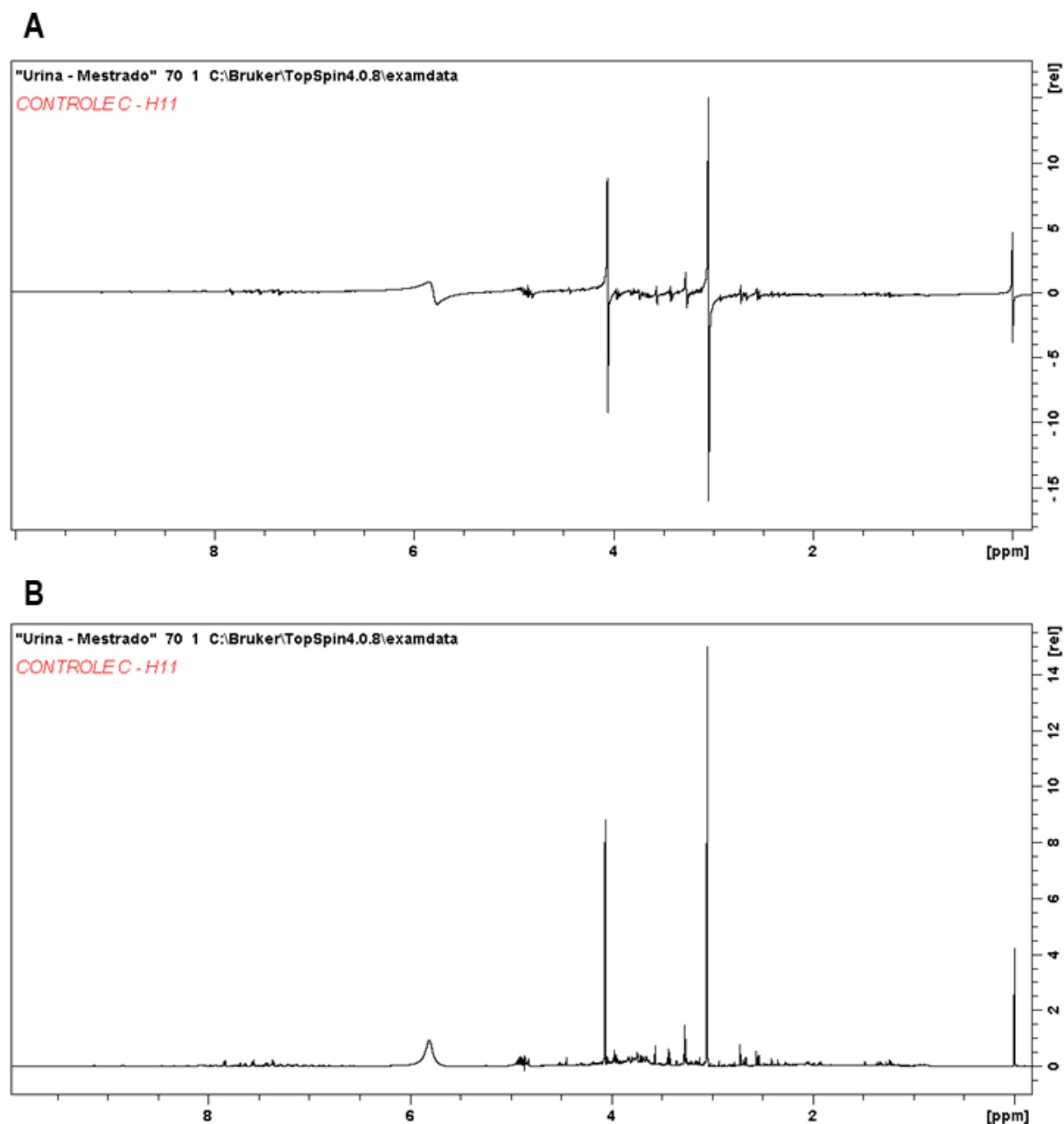
Os espectros de RMN foram adquiridos usando um espectrômetro Bruker 600 MHz Avance III (Bruker BioSpin, Alemanha) operando na frequência de 600,13 MHz e equipado com a sonda PA BBO 600S3 BBF-H-D-05 Z SP. Os experimentos com as amostras urina foram realizados utilizando a sequência de pulso Nuclear Overhauser Effect (NOESY), com pré-saturação do sinal da água (*noesypr1d*). Os parâmetros experimentais foram definidos com tamanho do FID de 65536 pontos, largura espectral com 20.0290 ppm, tempo de aquisição de 2,7 segundos, tempo de relaxação de 4 segundos, 4 scans fictícios e 256 scans, e temperatura controlada a 298 Kelvin (BECKONERT et al., 2007; KIM et al., 2019).

Os espectros de ^1H RMN das amostras de plasma foram adquiridos usando sequência de pulso Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) com pré-saturação de água (programa de pulso: *cpmgpr1d*), implementando um filtro T2 para suprimir os sinais amplos de proteínas e outras macromoléculas. Essa sequência de RMN permite a detecção seletiva de sinais provenientes apenas de metabólitos de baixa massa molecular. Para todos os experimentos, 256 scans foram registradas após 16 simuladas, tamanho do FID de 65536 pontos, uma largura espectral de 20,0290 ppm, tempo de relaxação de 4 segundos, tempo de aquisição de 2,7 segundos e alargamento da linha de 0,3 Hz (BECKONERT et al., 2007; KIM et al., 2019).

5.3.1 Processamento espectral

O processamento espectral foi realizado por meio do software TopSpinTM 4.0.8, incluindo ajuste de fase (Figura 3) e calibração do TSP em 0.00 ppm. A correção de fase foi aplicada para maximizar a simetria de todos os sinais em todas as regiões do espectro, minimizando a distorção dos picos, especialmente os de baixa intensidade e o sinal residual do solvente. (EMWAS et al., 2018). A Figura 3 mostra os efeitos da correção de fase em um espectro de ^1H RMN.

Figura 3: Efeito da correção de fase no espectro ^1H RMN de urina. (A) antes; (B) depois



Fonte: O autor, 2021.

5.4 Processamento dos dados

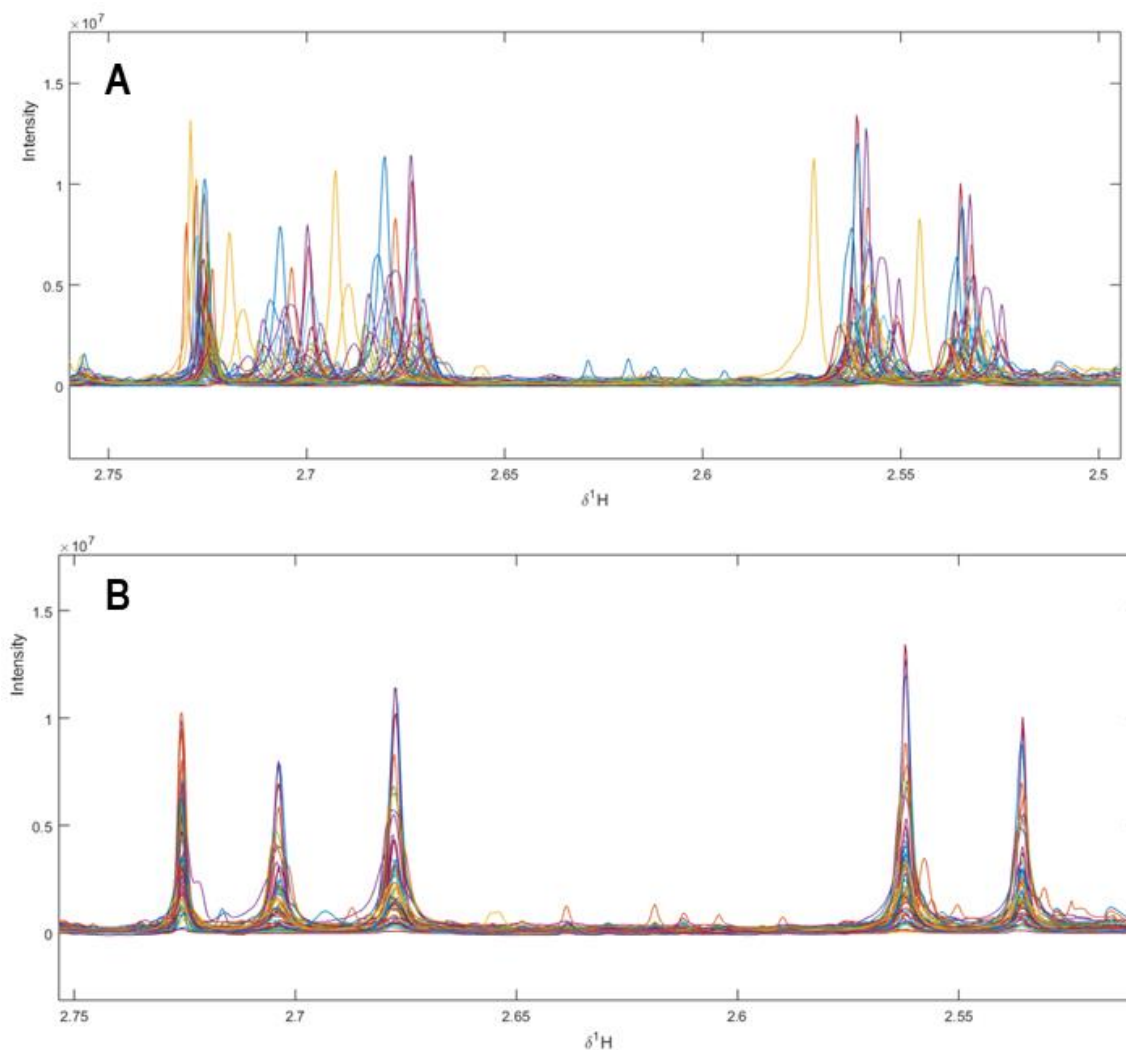
Utilizando o software MATLAB v13.1, foi realizado o processamento dos dados com etapas de alinhamento espectral (Figura 4), filtragem e seleção subspectral (Figura 5), e normalização (Figura 6).

5.4.1 Alinhamento espectral

O alinhamento espectral é um processo que altera as posições dos sinais em todos os espectros de modo que os sinais correspondentes aos mesmos metabólitos passam ser devidamente sobrepostos. Essa etapa é necessária para garantir que os mesmos sinais, dos mesmos compostos, possam ser comparados e quantificados em vários espectros de diferentes amostras (EMWAS et al., 2018).

O motivo de sinais dos mesmos metabólitos apresentarem descolamento químico diferente em diferentes espectros, está associado aos efeitos de mudanças química em decorrência a variação do pH entre as amostras e temperatura da sonda do equipamento (DEFERNEZ & COLQUEHOUN, 2003; CLOAREC et al., 2005). A região entre δ 2.50 – 2.75 ppm (Figura 4), foi selecionada apenas para melhor visualizar o processo de alinhamento antes e depois.

Figura 4: Região entre δ 2.50 – 2.75 ppm de 50 espectros ^1H RMN de urina. (A) antes; (B) depois do alinhamento



Fonte: O autor, 2021.

5.4.2 Filtragem e seleção subspectral

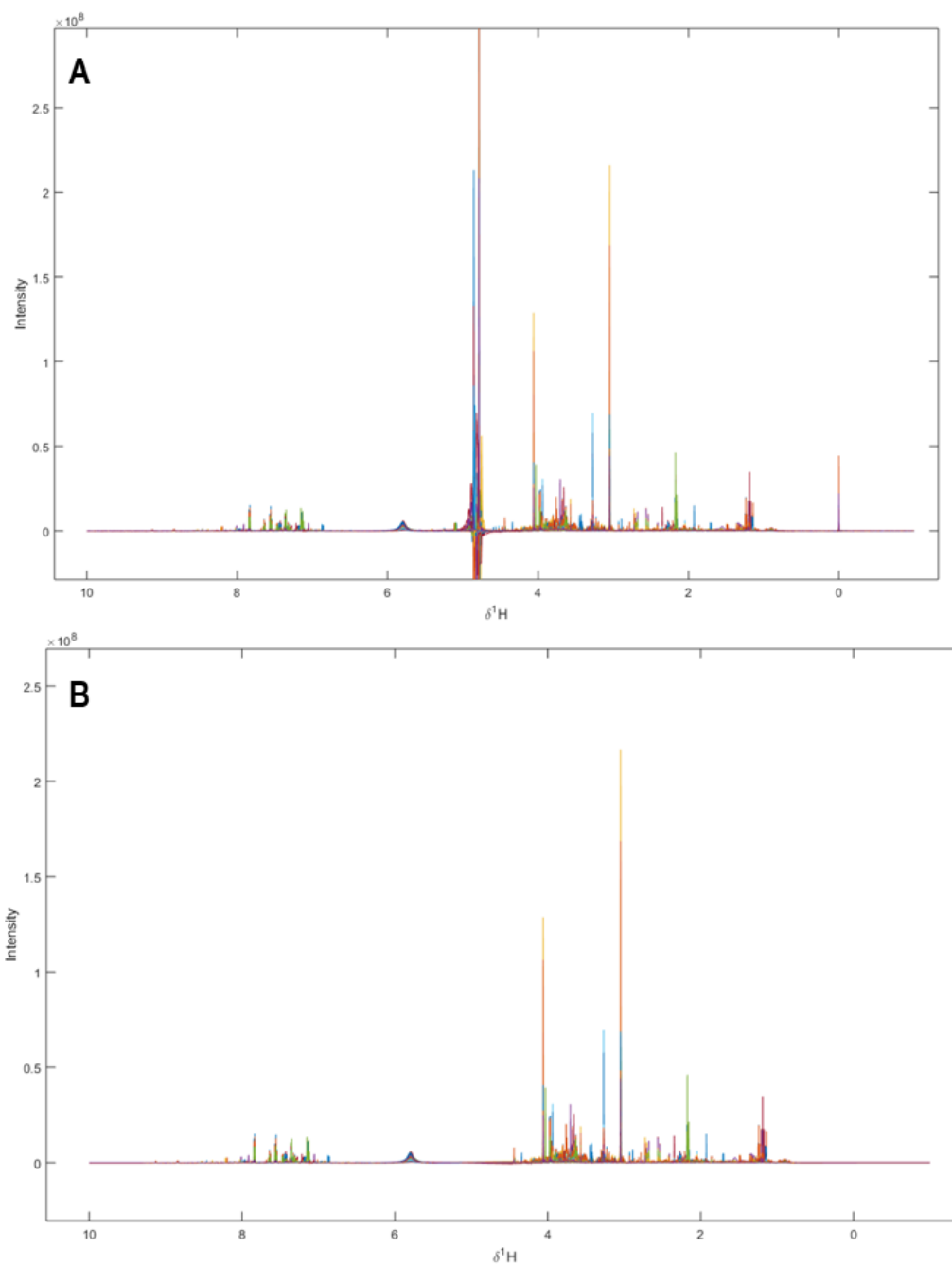
A seleção subspectral é baseado na filtragem, selecionando apenas as regiões de interesse e descartando áreas não informativas do espectro de ^1H RMN. Em geral, algumas regiões do espectro registrado não é importante para identificar e quantificar metabólitos, sendo necessário realizar cortes e colheitas de pontos.

Os cortes foram realizados em espectros (^1H RMN) das amostras de urina: O primeiro, na região de δ 9.3 até 10.0 ppm; o segundo, na região do sinal de água δ 4.70 - 5.05 ppm; e o terceiro, entre δ 0.0 a 0.5 ppm.

Assim como nos resultados das amostras de urina, também foram realizados cortes em espectros (^1H RMN) das amostras de plasma, porém em diferentes regiões: O primeiro, na região de δ 8.50 até 10.0 ppm; o segundo, na região do sinal de água δ 4.70 - 5.20 ppm; e o terceiro, entre δ 0.0 a 0.5 ppm.

O procedimento deve ser realizado com segurança, sendo uma etapa fundamental no processamento de dados. Os cortes são estratégicos e necessários, pois remove regiões (ruídos, sinal residual da água, contaminantes ou mesmo xenobióticos) que podem interferir na análise metabolômica (EMWAS et al., 2018). A Figura 5 ilustra o antes e depois de regiões selecionadas para análise e cortes.

Figura 5: 50 espectro de urina sobrepostos para selecionar regiões para cortes e análise. **(A)** antes; **(B)** depois dos cortes



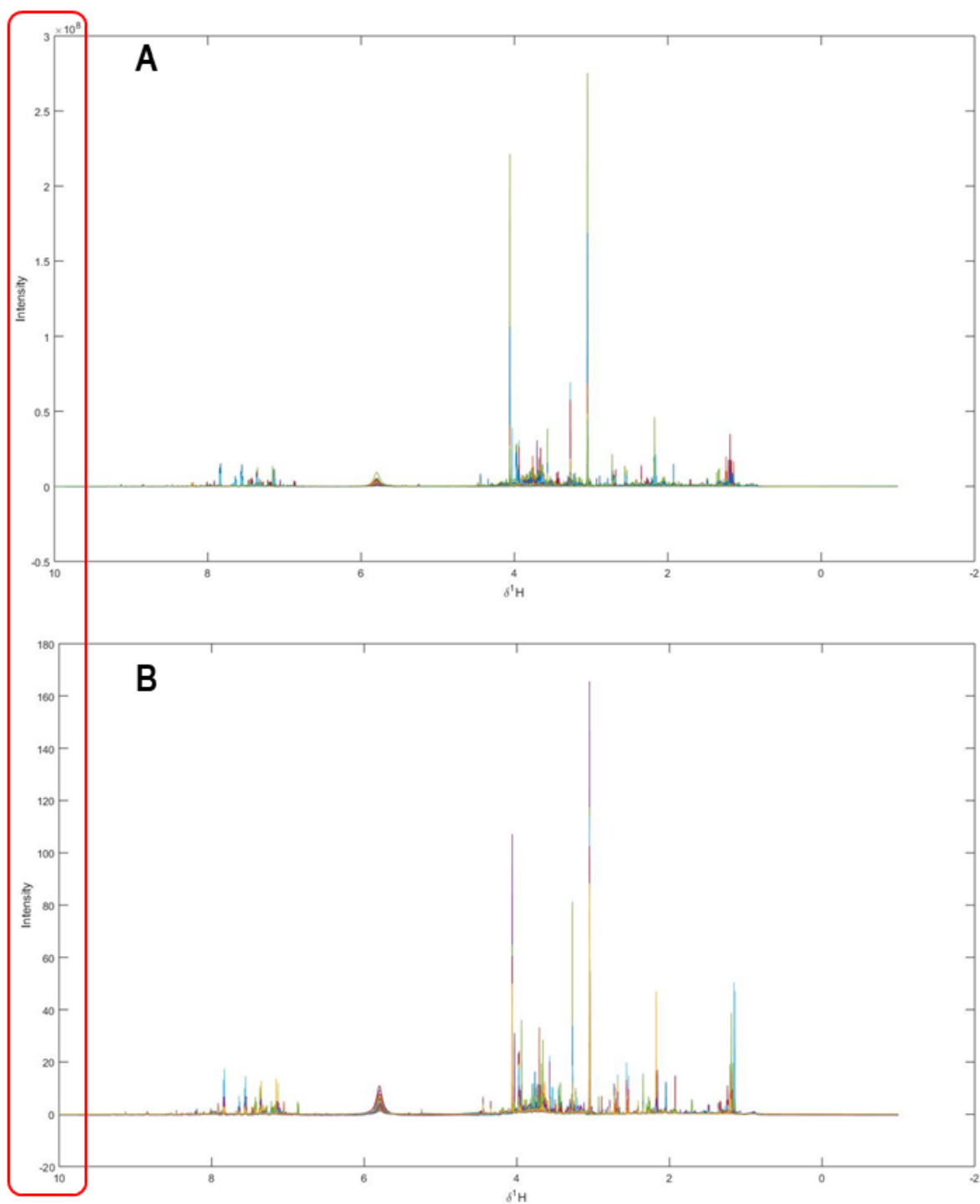
Fonte: O autor, 2021.

5.4.3 Normalização

Após o alinhamento dos sinais e seleção de regiões de interesse, a próxima etapa consistiu na correção das diferentes concentrações apresentada em cada amostra. Por exemplo,

as concentrações de metabólitos endógenos na urina (no mesmo indivíduo) pode variar significativamente em função da ingestão de líquidos, podendo assim influenciar no volume da urina, por fim no quão diluída ou concentrada. A melhor abordagem para minimizar tais efeitos em diferentes tipos de amostras biológicas (plasma, soro, urina, fezes ou saliva) é a normalização, que visa tornar todas as amostras comparáveis. Os dados (plasma e urina) foram normalizados pela mediana (EMWAS et al., 2018). A Figura 6 demonstra o efeito da normalização na intensidade dos sinais.

Figura 6: 50 espectro de urina sobrepostos para realizar a normalização. (A) antes; (B) depois da normalização pela mediana.



Fonte: O autor, 2021.

5.4.4 Tratamento estatístico

Os conjuntos de dados espectrais foram analisados usando a plataforma online MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) (CHONG et al., 2019). Inicialmente foi realizado a análise não supervisionada (PCA) no intuito de se obter uma perspectiva preliminar dos dados e facilitar uma visão geral de ambos os grupos (Controle e Exposto) por meio dos componentes principais (PC1 vs. PC2), revelar tendências e potenciais outliers, bem como fornecer uma visão sobre os pesos das variáveis em cada componente. O mapa de calor foi construído utilizando um método de agrupamento euclidiano.

O formalismo OPLS-DA foi realizado para avaliar a capacidade dos dados metabolômicos em distinguir os grupos analisados. A região de confiança foi de 95% e 2000 permutações foram realizadas para avaliar o modelo. Metabolitos significativos (biomarcadores) foram selecionados pela combinação baseada no gráfico de vulcão considerando o \log_2 (alteração de dobra) além de 1,0 ou abaixo de - 1,0 e valor $p < 0,05$. A Área Sob as Características de Operação do Receptor (AUROC) foi realizada com base em um algoritmo multivariado de máquinas de vetor de suporte (SVM), usando o método de classificação SVM para avaliar a sensibilidade e especificidade.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

Os limites máximos de concentração de mercúrio na população em geral, preconizados pela organização mundial da saúde (OMS), são respectivamente $4 \mu\text{g L}^{-1}$ e $8 \mu\text{g L}^{-1}$ para urina e sangue, respectivamente (WHO, 1990).

O laboratório LINQA quantificou e forneceu os valores máximos e mínimos de concentração de mercúrio encontrados no sangue (mínimo – Controle: $0,290$ vs. Exposto: $0,730 \mu\text{g L}^{-1}$ e máximo – Controle: $17,30$ vs. Exposto: $48,38 \mu\text{g L}^{-1}$). E na urina (mínimo – Controle: $0,210$ vs. Exposto: $0,430 \mu\text{g L}^{-1}$ e máximo – Controle: $2,65$ vs. Exposto: $10,15 \mu\text{g L}^{-1}$) (SILVA-FILHO et al., 2021).

Indicativos de toxicidade química são vitais para desenvolver uma avaliação precisa dos riscos ambientais. Os perfis metabólicos representam um parâmetro útil do fenótipo rico em informações para epidemiologia, podendo elucidar as interações entre o ser humano e o meio ambiente. Nesse contexto, biomarcadores servem como assinaturas metabólicas causadas por perturbações no metabolismo, e mostramos aqui que a metabolômica pode ser aplicada com sucesso ao projeto de pesquisa com caráter ambiental.

6.1 Análise populacional

Os pescadores participantes do estudo pertenciam a duas colônias ribeirinhas (Pontal e Barra) da cidade de Maceió. Os voluntários convocados para formação do grupo controle não moravam na região circunvizinha do CELMM. A Tabela 1 apresenta o resumo da população estudada.

Tabela 1: Resumo da população estudada

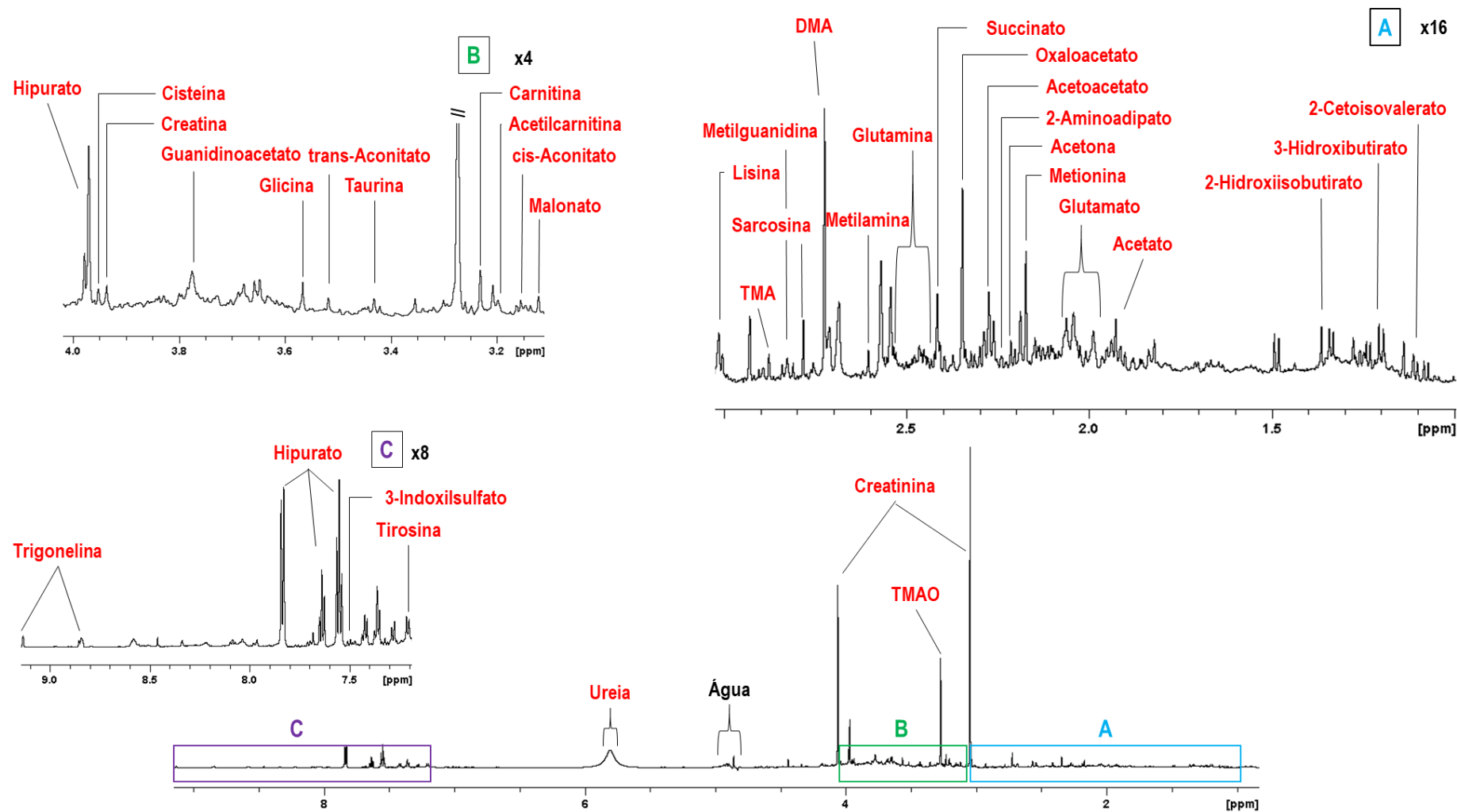
(n = 50)	Urina	
	Controle (18)	Exposto (32)
Idade:	41,33 ± 14,36	49,96 ± 11,61
Feminino:	7	17
Masculino:	11	15
Tabagismo:	2	5
Etilismo:	8	13
Hipertensão:	6	15
Diabetes:	0	2
Exposição:	0	30
Alimentação	3	28
<i>Sururu ou Peixe:</i>		
<i>Idade: Média ± Desvio Padrão</i>		

6.2 Análise metabólica geral com os dados de **urina**

6.2.1 Perfil metabólico das amostras de **urina**

Um espectro característico de ^1H RMN de uma amostra de urina é apresentada na Figura 7. A identificação de vários metabólitos foi realizada por meio de espectros bidimensionais ^1H - ^1H COSY (do inglês, *Correlation spectroscopy*) e ^1H - ^{13}C HMQC (do inglês, *Heteronuclear multiple quantum coherence*), STOCSY (do inglês, *Statistical total correlation spectroscopy*) (CLOAREC, O. et al., 2005), com o auxílio do software ChenomxTM v8.4 em modo de avaliação e dos bancos de dados HMDB (<https://hmdb.ca/>) e Kegg (<https://www.genome.jp/kegg/>) (WISHART et al., 2018). Em adição, foi possível constatar a presença de etanol em 4 espectros de urina, ainda que os voluntários declarassem jejum de 10 horas. As mesmas amostras foram associadas ao etilismo apresentado na Tabela 1.

Figura 7: Espectro representativo de ^1H RMN obtido a partir de uma amostra de urina.



Fonte: O autor, 2021. DMA (Dimetilamina); TMA (Trimetilamina); TMAO (Óxido de Trimetilamina)

No total foram identificados 35 metabólitos (listados no Apêndice C) com valores de deslocamento químico (δ ^1H ppm), multiplicidade e ID do HMDB.

6.2.2 Análise exploratória multivariada com dados de **urina**

A matriz foi então criada seguindo todas as etapas de pré-processamento (descritos nas seções 5.3 e 5.4), com os devidos ajustes na linha de base e fase, cortes e normalização. Nas colunas da matriz foram contidas as amostras (espectros) e nas linhas as variáveis (*peak picking*) com valores extraídos de sua intensidade, em regiões de deslocamento químico.

6.2.2.1 Análise não supervisionada - **Urina**

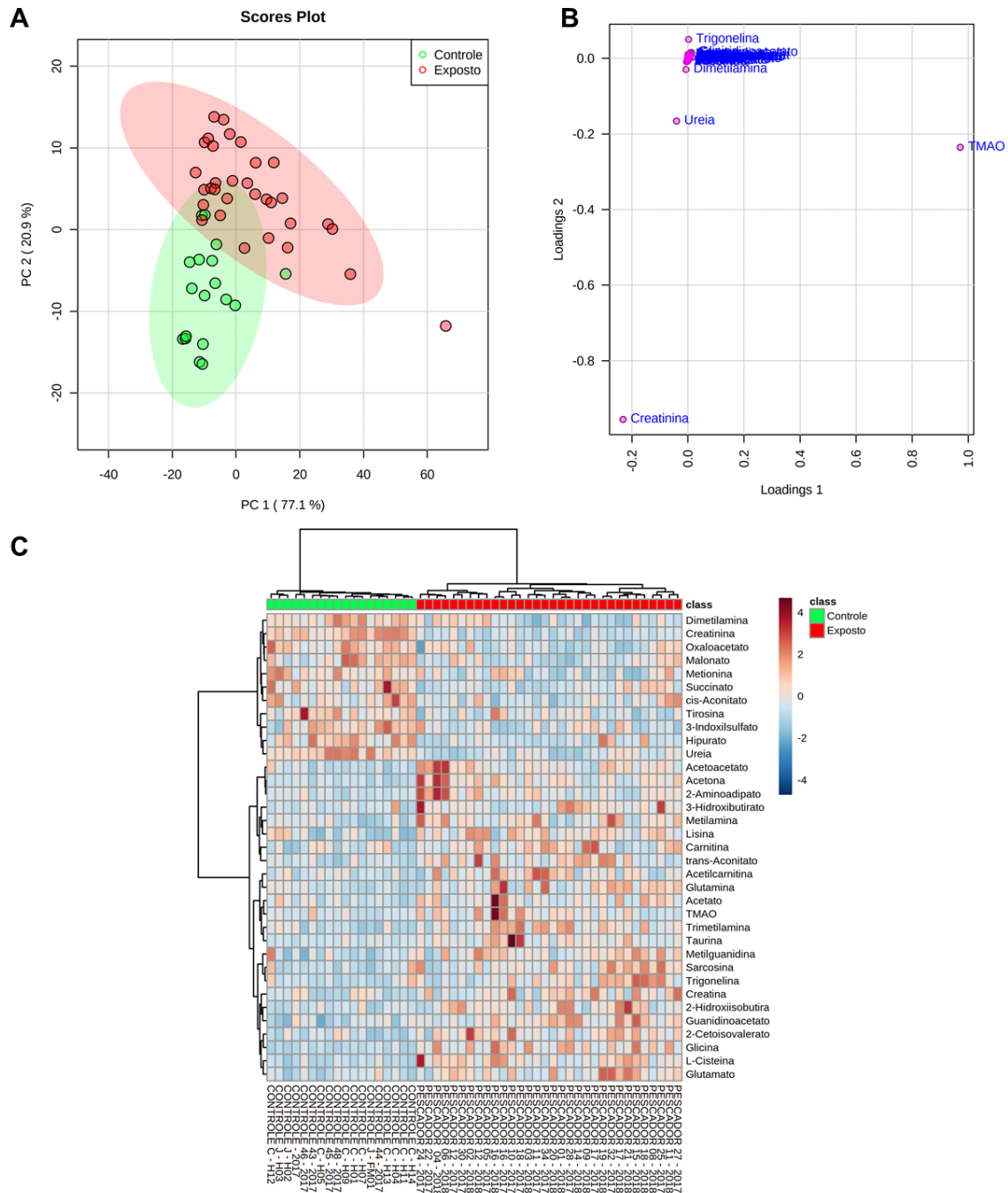
Inicialmente, foi realizado a análise exploratória por PCA das 50 amostras de urina, sendo 18 do grupo Controle e 32 do grupo Exposto. Pela análise bidimensional das componentes principais (PC1 \times PC2) não foi possível observar nenhuma separação entre os grupos Controle \times Exposto analisados. Também foi analisado o gráfico tridimensional (PC1 \times PC2 \times PC3), porém nenhuma separação entre os grupos ainda foi observada.

Contudo, de acordo com a Figura 8, podemos observar algumas tendências e padrões, a qual incorporou todas as amostras e usou os 35 metabólitos identificados e quantificados relativamente (Figura 8a). Nenhum outliers foi identificado em toda a população. As cargas de PC1 (Figura 8b), as quais definem a direção da separação metabólica entre os grupos Exposto e Controle, foram dominadas pelos sinais da creatinina, ureia e TMAO, estando consistentes com observações anteriores descritas na literatura envolvendo metais potencialmente tóxicos, especialmente, mercúrio (BRIDGES & ZALUPS, 2017; SUN et al., 2017).

O mapa de calor (Figura 8c) demonstrou uma mudança marcante no perfil metabólico dos voluntários do grupo Exposto, sendo observados dois aglomerados de metabólitos urinários e dois aglomerados de amostra, devidamente classificadas.

Figura 8: Análise não supervisionada do conjunto de dados espectrais de ^1H RMN - Urina. **(A)**; Gráfico de pontuação de PCA mostrando controles (verde) e expostos (vermelho), representando as duas componentes principais (PCs) do PCA usando os 35 metabólitos urinários identificados e quantificados. **(B)** Gráficos de carregamento dos metabólitos, mostrando as 3 principais variáveis (metabólitos) com a maior contribuição para as duas PCs do PCA. **(C)** Mapa de calor com cluster para os controles (verde) e amostras do grupo exposto

(vermelho). A cor corresponde ao valor da intensidade do pico do metabólito (vermelho, regulado para cima; azul, regulado para baixo).



Fonte: O autor, 2021.

É importante destacar que uma amostra do grupo exposto ficou fora da região de confiança de 95% (elipse). As regiões de confiança de 95% são centradas nos valores médios de cada grupo, e o tamanho é determinado pela variância de cada grupo. Uma análise individual do espectro observou a intensidade do TMAO elevada, e assim, comparado com outros

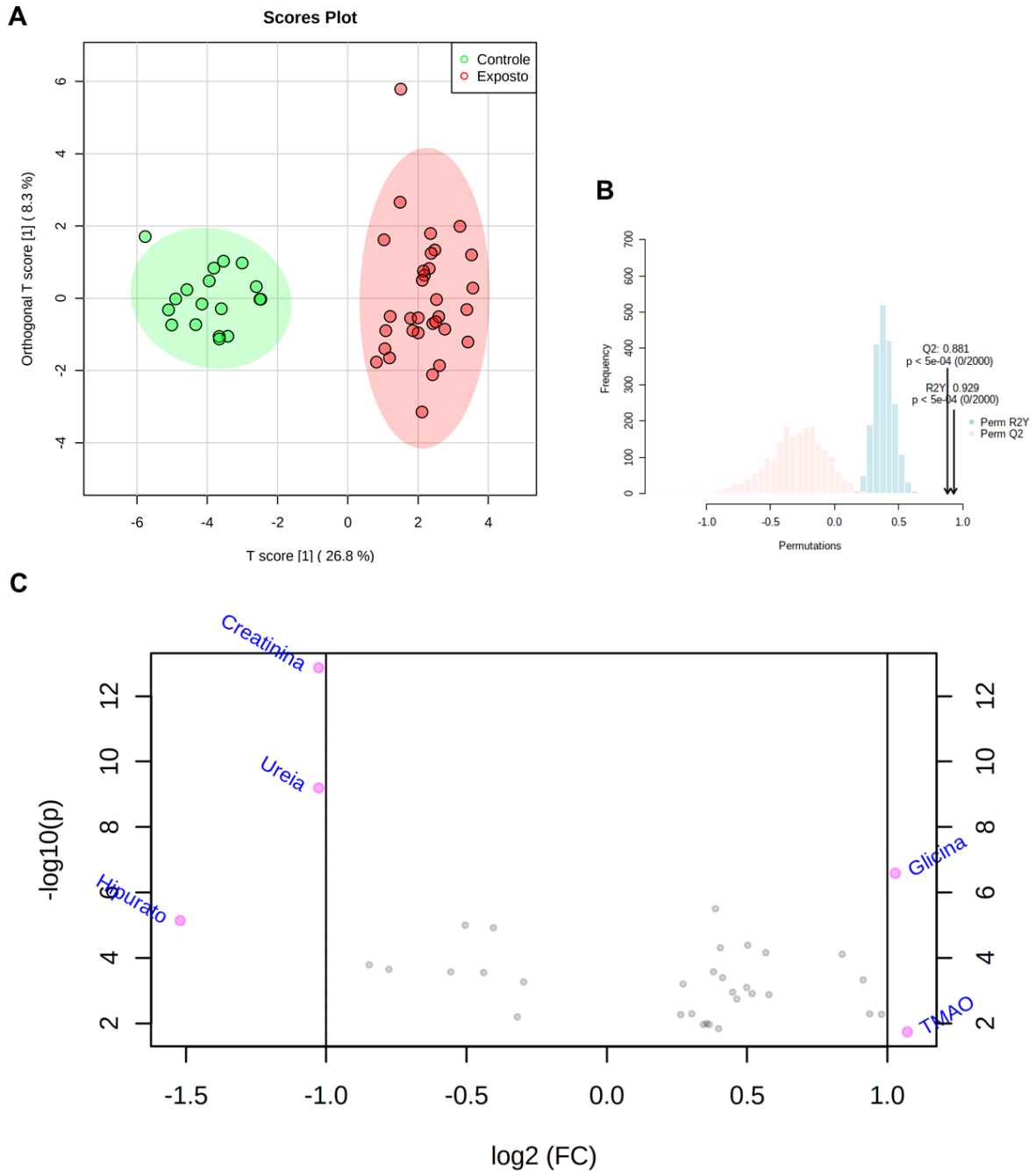
espectros (vide Apêndice D) é possível constatar apenas o TMAO elevado como anomalia presente no espectro. Buscando informações que justifique a intensidade do TMAO, o voluntário em questão é do gênero masculino, idoso (65 anos) e foi encontrado 36,02 µg de Hg por litro de sangue. Em razão disso, alguns estudos já apontam que os idosos apresentam maior sensibilidade aos potenciais efeitos tóxicos do Hg (BRIDGES & ZALUPS, 2017), e que as manifestações podem ser visualizadas na urina por espectros de ^1H RMN, no qual o TMAO elevado é um indicativo de nefrotoxicidade (SUN et al., 2017).

6.2.2.2 Análise supervisionada - **Urina**

As tendências e padrões observados pela PCA foram evidenciados por projeções ortogonais para análise discriminante de estruturas latentes (OPLS-DA), revelando distúrbios do metaboloma em voluntários do grupo Exposto. Usando um componente preditivo e um ortogonal, o modelo OPLS-DA (Figura 9a) teve um desempenho interessante, o qual revelou separação significativa entre os grupos, apresentando excelente desempenho, que foi demonstrado pelo teste de permutação 2000x (Q2 0,881, R2Y 0,929 e $p < 0,0005$) (Figura 9b).

As principais características discriminatórias entre os grupos foram creatinina, ureia, hipurato, glicina e TMAO. Os metabólitos que apresentaram concentrações maiores no grupo Exposto foram glicina e TMAO. Por outro lado, creatinina, ureia e hipurato apresentaram níveis elevados no grupo Controle (Figura 9c).

Figura 9: Análise supervisionada do conjunto de dados espectrais de ^1H RMN - Urina. **(A)** O gráfico de pontuação de OPLS-DA entre controles (verde) e expostos (vermelho) mostra o componente preditivo e o componente ortogonal. **(B)** Teste de permutação 2000x. **(C)** Gráfico de vulcão para os dados metabolômicos. Metabólitos com \log_2 (alteração de dobra) além de 1,0 ou abaixo de -1,0 com valor de $p < 0,05$ foram considerados significativamente alterados.



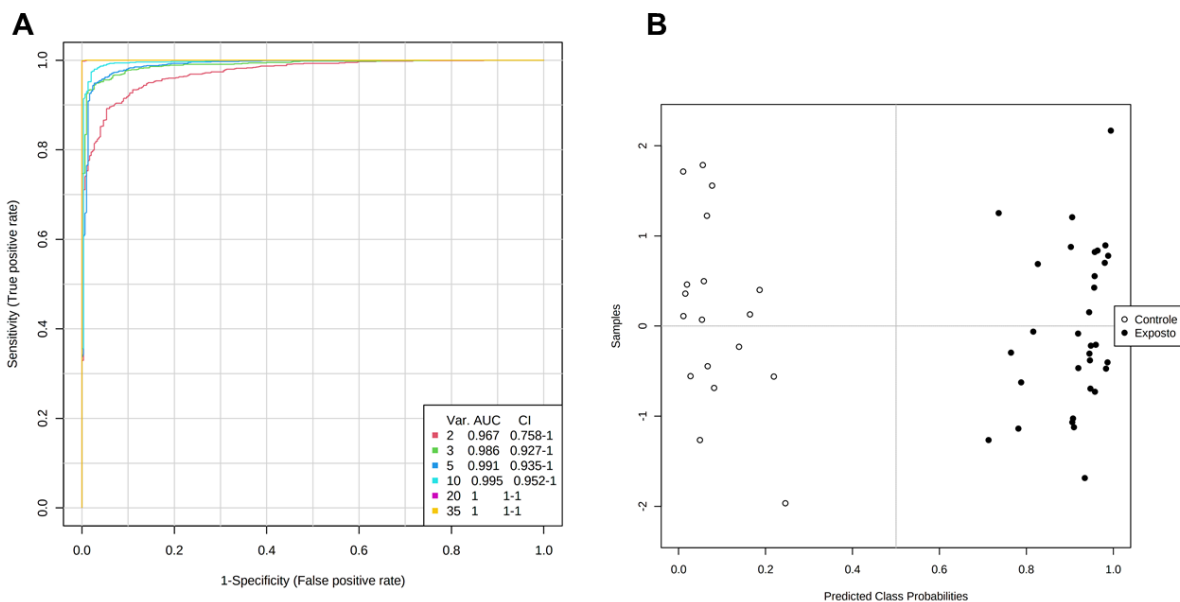
Fonte: O autor, 2021.

6.2.2.3 Curva ROC - Urina

A fim de avaliar o modelo metabolômico criado a partir das amostras de urina, foi realizado o teste por meio de análise de regressão logística via curva ROC (Figura 10) baseando-se na análise da matriz de contingência, isso é, através de uma validação cruzada entre a classe determinada e a classe prevista pelo modelo criado. A área sob as características operacionais do receptor (AUROC) foi realizada com base em um algoritmo multivariado de máquinas de vetor de suporte (SVM), usando o método de classificação SVM para calcular a precisão, sensibilidade e especificidade, no intuito de se determinar a eficácia classificatória do modelo. A figura 10a mostra o desempenho dos modelos criados a partir da contribuição dos metabólitos via Curva ROC, e a figura 10b mostra a probabilidade da classe prevista (eixo x) de cada amostra (eixo y).

Assim, é possível observar que os modelos com 20 e 35 metabólitos demonstraram o melhor desempenho, no qual cada um obteve $AUC = 1$ (Figura 10a). A validação do modelo criado pelo formalismo OPLS-DA foi realizada (Figura 10b), sendo possível observar que todas as amostras foram classificadas de maneira adequada, considerando a classe determinada, a observada durante a coleta das amostras, e a classe prevista, a que o modelo considera. Esse método de validação foi utilizado para o treinamento do modelo, como perspectiva de avaliar amostras futuras usando o mesmo modelo metabolômico com dados de urina. Com o resultado da validação cruzada (Figura 10b) foi criada a Tabela 2 com a matriz de contingência.

Figura 10: Curva ROC - Urina. **(A)** Modelo de metabólitos de combinação calculado a partir da análise de regressão logística. **(B)** Probabilidades de classe previstas para cada amostra usando o melhor classificador (baseado em AUC). Como uma abordagem de subamostragem balanceada é usada para o treinamento do modelo, o limite de classificação está sempre no centro ($x = 0,5$, a linha pontilhada).



Fonte: O autor, 2021.

Tabela 2: Matriz de contingência

	PREDITO		TOTAL
REAL	18 VP (Controle)	0 FN (Controle)	18 POS
	0 FP (Exposto)	32 VN (Exposto)	32 NEG
	18 P	32 N	50

VP = Verdadeiro positivo; FP = Falso positivo; FN = Falso negativo; VN = Verdadeiro negativo; P = Positivo; N = Negativo.; POS = Exemplos positivos (Controle); NEG = Exemplos negativos (Exposto).

Um novo subconjunto de amostras para fins de validação extra, bem como para prever a classe de novas amostras (amostras sem rótulos de classe) foi adicionado à matriz de dados seguindo o mesmo protocolo de coleta, preparação, análise por ^1H RMN, processamento espectral e de dados, e análise estatística descritos no capítulo 5 desta dissertação.

O novo subconjunto foi formado por 3 amostras controles reais (2 do sexo masculino, 1 feminino) de não moradores de regiões circunvizinhas ao CELMM, não fumantes, mas que

declararam que consomem bebida alcoólica raramente, com faixa etária varia entre 26 – 49 anos, e não diabéticos. Entre os voluntários recrutados para formação do novo subconjunto, apenas a mulher é hipertensa. Os resultados da validação extra do modelo podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3: Validação extra: Previsões de novas amostras

Amostra	Classe – Real	Probabilidade	Classe – Prevista
TDM_01	Controle	51,69%	Controle
TDM_02	Controle	66,51%	Controle
TDM_03	Controle	70,80%	Controle

Fonte: O autor, 2021.

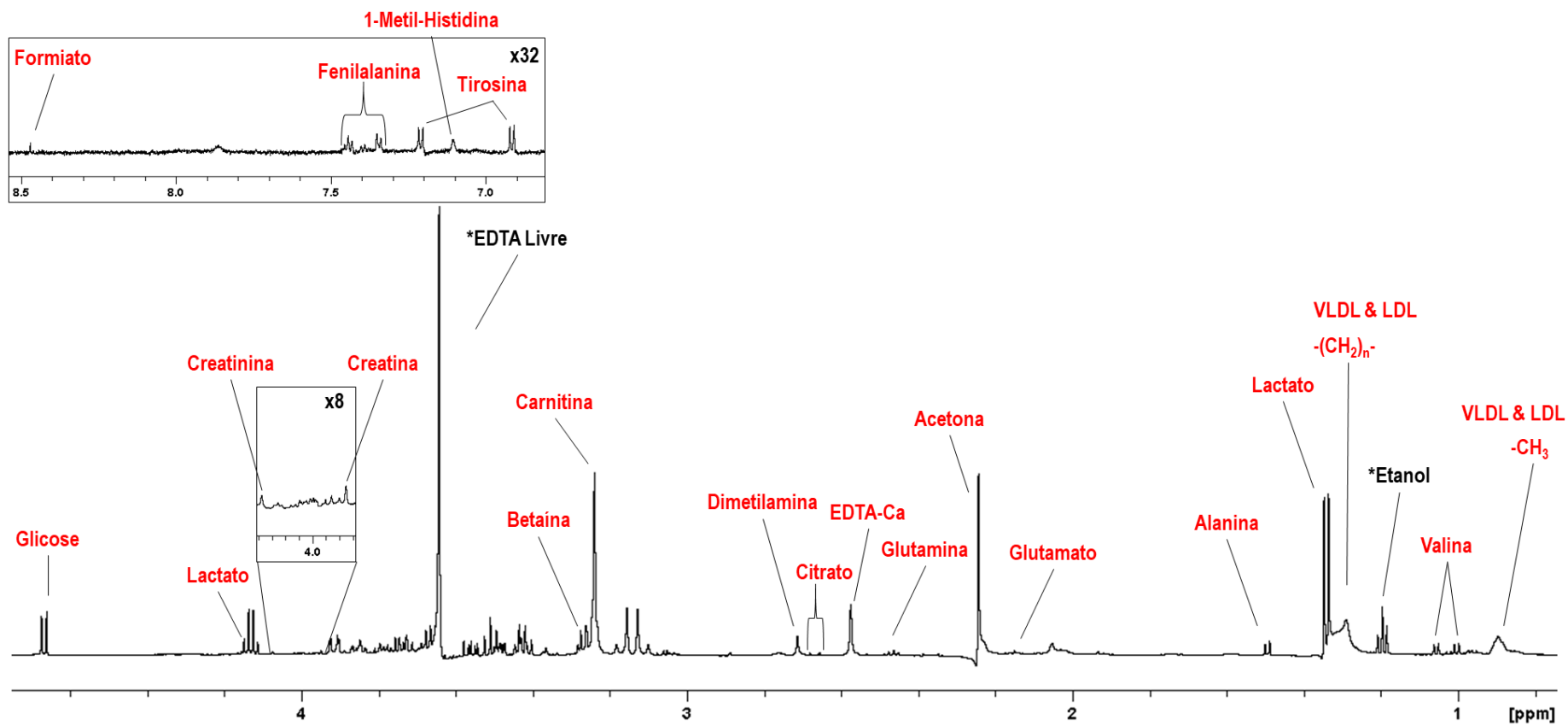
6.3 Análise metabolômica geral com os dados de **plasma**

6.3.1 Perfil metabólico das amostras de **plasma**

O perfil metabólico das amostras plasma analisado é apresentado na Figura 11. O procedimento de identificação dos metabólitos foi semelhante ao realizado com os espectros de urina. Com auxílio de espectros bidimensionais (^1H - ^1H COSY e ^1H - ^{13}C HMQC), STOCSY (CLOAREC, O. et al., 2005), ChenomxTM v8.4 em modo de avaliação, HMDB e Kegg (WISHART et al., 2018). Sinais do etanol também foram encontrados nas amostras de plasma.

Por diferentes razões alguns voluntários participaram da coleta de urina, contudo não participaram da coleta de sangue. Portanto, o número de total de amostra de plasma analisado foi 43, dos quais 16 foram controles e 27 foram moradores de regiões circunvizinhas a Laguna Mundaú, ou seja, grupo Exposto.

Figura 11: Espectro representativo de ^1H RMN obtido a partir de uma amostra de plasma.



Fonte: O autor, 2021.

No total foram identificados 19 metabólitos (listados no Apêndice C) com valores de deslocamento químico (δ ^1H ppm), multiplicidade e ID do HMDB.

6.3.2 Análise exploratória multivariada com dados de **plasma**

Após a coleta e a criação de um banco de dados apropriado, a planilha de dados com a matriz foi então criada respeitando todas as etapas de pré-processamento (descritos nas seções 5.3 e 5.4). Dessa forma, foi realizado análises multivariadas não supervisionada, supervisionada e curva ROC, tal como descrito em toda seção 6.2.2 com os dados de urina.

6.3.2.1 Análise não supervisionada – **Plasma**

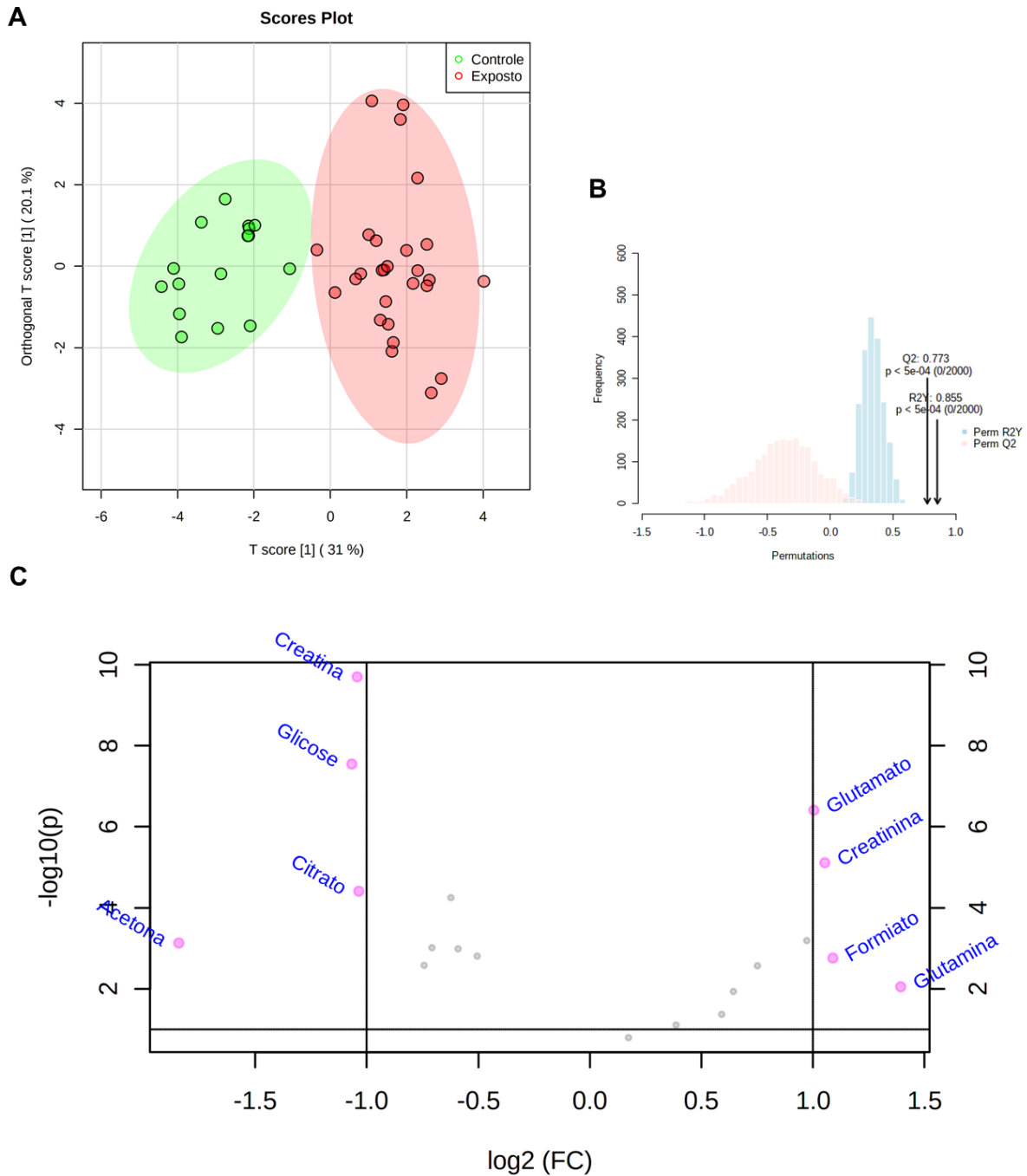
Selecionamos 2 PCs para os espectros de ^1H RMN que explicaram 82,9% da variância total usando os 19 metabólitos identificados. É possível observar que os dois grupos são separados principalmente ao longo da direção PC1, que carrega 57% da variância total nos dados de RMN. Contudo, não há limites distintos entre os dois grupos, logo há uma sobreposição entre os grupos avaliados (Figura 12a). No gráfico Loading (Figura 12b), biomoléculas como VLDL & LDL, carnitina e lactato são consideradas com maior peso, para classificação dos grupos de maneira não supervisionada. O mapa de calor (Figura 12c) permitiu a fácil exploração dos dados fornecendo informações úteis sobre características desreguladas de metabólitos e agrupamento de amostras. Este agrupamento foi realizado usando a medida de similaridade (Pearson), onde no universo de duas amostras, uma do grupo Exposto foi prevista como “Controle”, e uma do grupo Controle, como “Exposto”.

6.3.2.2 Análise supervisionada – **Plasma**

Os resultados do OPLS-DA forneceram evidências claras da presença de perturbações metabólicas. Conforme o formalismo OPLS-DA pôde extrair a variação máxima entre os grupos, demonstrando separação entre as classes estudadas (Figura 13a), e apresentando excelente desempenho demonstrado pelo teste de permutação 2000x (Q2 0,773, R2Y 0,855 e $p < 0,0005$), conforme figura 13b.

Os metabólitos discriminatórios entre os grupos em dados de plasma, estão identificados via gráfico de vulcão (Figura 13c). Os que apresentaram concentrações maiores no grupo Exposto foram glutamato, creatinina, formiato, glutamina. Em adição, os metabólitos creatina, glicose, citrato e acetona também apresentaram níveis elevados no grupo controle.

Figura 13: Figura 9: Análise supervisionada do conjunto de dados espectrais de ^1H RMN - Plasma. (A) O gráfico de pontuação de OPLS-DA entre controles (verde) e expostos (vermelho) mostra os componentes preditivos e os componentes ortogonais. (B) Teste de permutação 2000x (C) Gráficos de vulcão para os dados metabolômicos. Metabólitos com \log_2 (alteração de dobra) além de 1,0 ou abaixo de -1,0 com valor de p inferior a 0,05 foram considerados significativamente alterados.

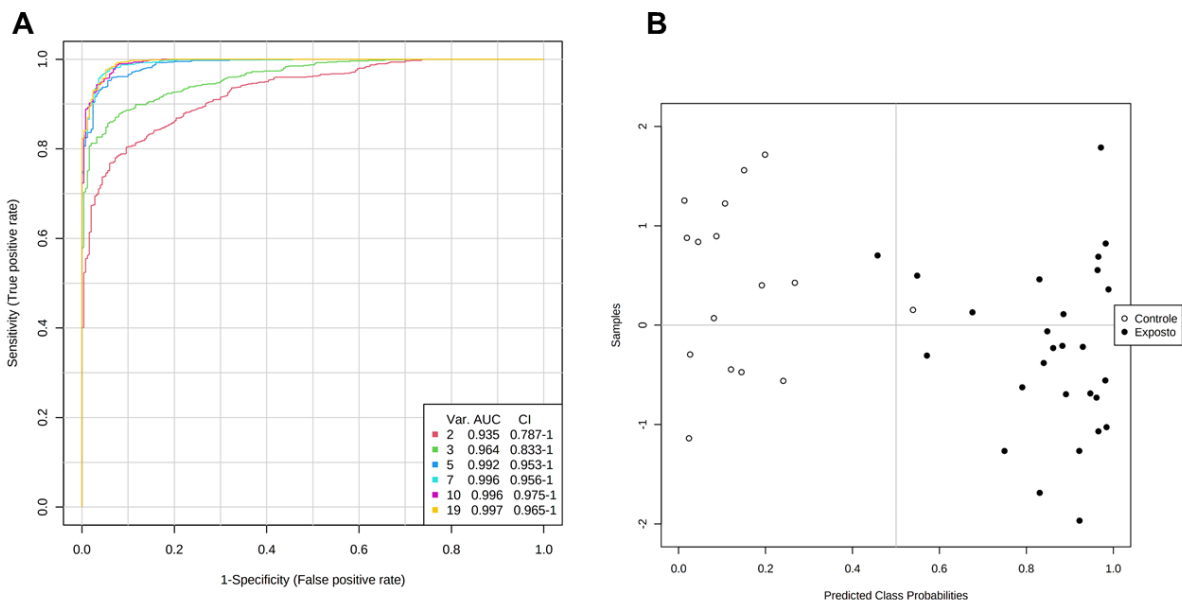


Fonte: O autor, 2021.

6.3.2.3 Curva ROC – Plasma

Assim como foi detalhado com os dados de urina (seção 6.2.2.3), os mesmos critérios para a curva ROC foram aplicados com os dados de plasma. Conforme observado na figura 14a, o modelo com 19 metabólitos apresentou $AUC = 0.997$. A Figura 14b mostrou que uma amostra do grupo Controle foi prevista como grupo Exposto, assim como uma amostra do grupo Exposto foi prevista como Controle. Com o resultado da validação cruzada (Figura 14b) foi criada a Tabela 4 com a matriz de contingência.

Figura 14: Curva ROC - Plasma. (A) Modelo de metabólitos de combinação calculado a partir da análise de regressão logística. (B) Probabilidades de classe previstas para cada amostra usando o melhor classificador (baseado em AUC). Como uma abordagem de subamostragem balanceada é usada para o treinamento do modelo, o limite de classificação está sempre no centro ($x = 0,5$, a linha pontilhada).



Fonte: O autor, 2021.

Tabela 4: Matriz de contingência

	PREDITO		TOTAL
REAL	15 <i>VP</i> (Controle)	1 <i>FN</i> (Controle)	16 POS
	1 <i>FP</i> (Exposto)	26 <i>VN</i> (Exposto)	27 NEG
	16 <i>P</i>	27 <i>N</i>	43

VP = Verdadeiro positivo; FP = Falso positivo; FN = Falso negativo; VN = Verdadeiro negativo; P = Positivo; N = Negativo.; POS = Exemplos positivos (Controle); NEG = Exemplos negativos (Exposto).

DISCUSSÃO

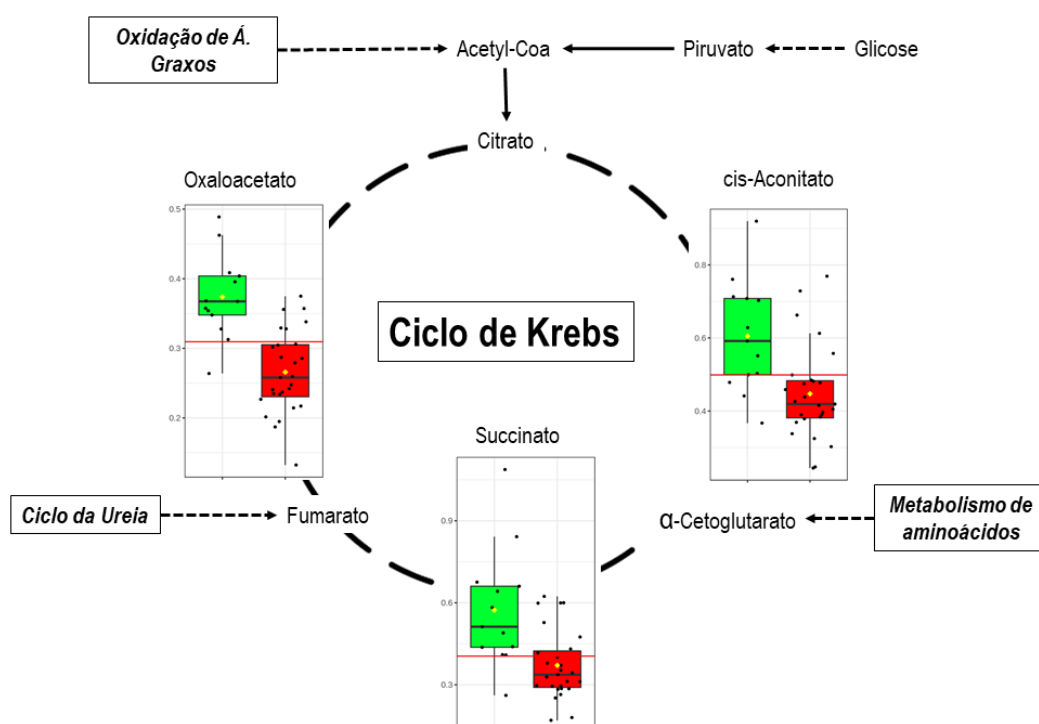
7 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que fatores ambientais, como a exposição ao CELMM, podem influenciar significativamente no metaboloma humano. A fim de dar sentido a esse grande volume de dados, empregamos os resultados em bancos de dados importantes como o Kegg (<https://www.genome.jp/kegg/>) e SMPDB (<https://smpdb.ca/>). Assim, os resultados foram capazes de gerar uma compreensão intuitiva e profunda sobre como certos metabólitos contribuem para processos biológicos específicos ou fenômenos fisiológicos importantes (WISHART, 2019).

7.1 Ciclo de Krebs

A ingestão de mercúrio inorgânico afeta adversamente as vias metabólicas relacionadas ao metabolismo energético (NICHOLSON et al., 1985; WEI et al., 2008). Investigando os níveis dos metabólitos encontrados na urina e plasma, identificamos a diminuição nos níveis de metabólitos associados ao ciclo de Krebs no grupo Exposto, incluindo cis-aconitato, succinato, oxaloacetato e citrato, onde tal fato pode implicar alterações no metabolismo energético (Figura 15).

Figura 15: Perturbações no ciclo de Krebs



Fonte: O autor, 2021. *Boxplot com quartis mediano e extremos ilustrado pelo valor da intensidade do pico do metabólito (eixo y), entre os grupos Controle (verde) e Exposto (vermelho). O losango em amarelo indica o valor médio de cada metabólito.*

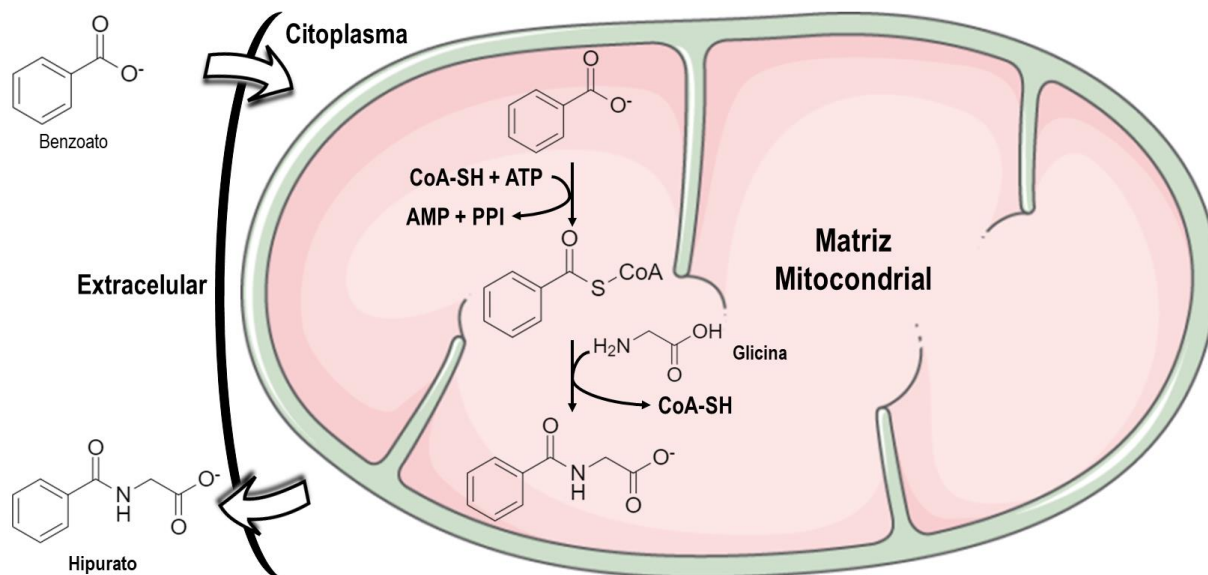
Assim, variações nas concentrações destes marcadores indicam uma perturbação na produção de energia, em particular, a inibição de certas enzimas do ciclo de Krebs, levando à diminuição na utilização de cis-aconitato, succinato, oxaloacetato e citrato pelas células tubulares renais. Em adição, esta hipótese é apoiada com o aumento expressivo da via beta-oxidação de ácidos graxos.

7.2 Oxidação de ácidos graxos

Os transportadores de ácidos graxos através da membrana mitocondrial (carnitina e acetilcarnitina) foram encontrados com maior quantidade para o grupo Exposto, os quais indicam ativação da oxidação de ácidos graxos. Em adição, encontramos acetato, 2-cetoisovalerato e 2-hidroxi-isobutirato com níveis elevados neste mesmo grupo. Além disso, é provável que a acetil-CoA produzida pela oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias do fígado estejam participando da cetogênese, com a conversão de acetil-CoA em acetoacetato e 3-hidroxi-butirato, os quais juntos com a cetona, são apresentados como corpos cetônicos, e a quantificação relativa de seus respectivos sinais demonstraram maior quantidade para o grupo Exposto em amostras de urina.

As perturbações observadas no metabolismo energético indicam deficiência ou diminuição da atividade mitocondrial em voluntários do grupo Exposto. Em adição, outro indicativo de dano mitocondrial é a diminuição de hipurato acompanhada pelo aumento da glicina na urina do grupo Exposto. A conversão do benzoato em hipurato ocorre dentro da matriz mitocondrial em duas etapas. A primeira o benzoato entra na mitocôndria e é convertido em benzoil-CoA. Por conseguinte, é convertido em hipurato pela conjugação com a glicina catalisada pela Glicina-N-aciltransferase (GLYAT) e, em seguida, sai da mitocôndria (Figura 16). Aciltransferase mitocondrial transfere o grupo acila do benzoil-CoA para o nitrogênio da glicina, desse modo desintoxicando xenobióticos, como ácido benzoico e ácidos orgânicos endógenos. GLYAT está localizada nas mitocôndrias do fígado e rim de mamíferos e pertence à família das enzimas N-acil-transferases (BADENHORST et al., 2013; IRWIN et al., 2016).

Figura 16: Metabolismo do benzoato, glicina e hipurato



Fonte: O autor, 2021.

7.3 Estresse oxidativo

É de se esperar que as implicações causadas pelo mercúrio no metabolismo energético levem a uma mudança na produção de EROS associado ao estresse oxidativo. A glutathiona reduzida (GSH) é considerada uma das principais biomoléculas presente no citoplasma, a qual possui capacidade de desintoxicar as EROS e metais potencialmente tóxicos por meio, principalmente, da presença do grupo tiol (SH-) no resíduo da cisteína, servindo como doador de prótons (DICKINSON & FORMAN, 2002; JOZEFCAK et al., 2012).

Silva-Filho e colaboradores (2021) publicou um estudo o qual faz parte do mesmo projeto de pesquisa e mostrou que nas células sanguíneas do grupo Exposto linfomonucleares produziram altos níveis de espécies reativas de oxigênio (61,7%), e os eritrócitos apresentaram aumento da peroxidação lipídica (151%), oxidação de proteínas (41,0%) e diminuição do tiol total (36,5%), GSH e o estado REDOX (16,5%). Além disso, mostrou que a atividade das enzimas do sistema antioxidante (SOD, GPx e GST) também foi reduzida no grupo exposto em 26,9%, 28,3% e 19,0%, respectivamente.

Esses resultados corroboram com os nossos achados, porquanto a redução da atividade da biomolécula GSH deve ser compensado por sua biossíntese, a qual ocorre através de um processo organizado, e que precisa de três aminoácidos não essenciais – cisteína, glutamato e

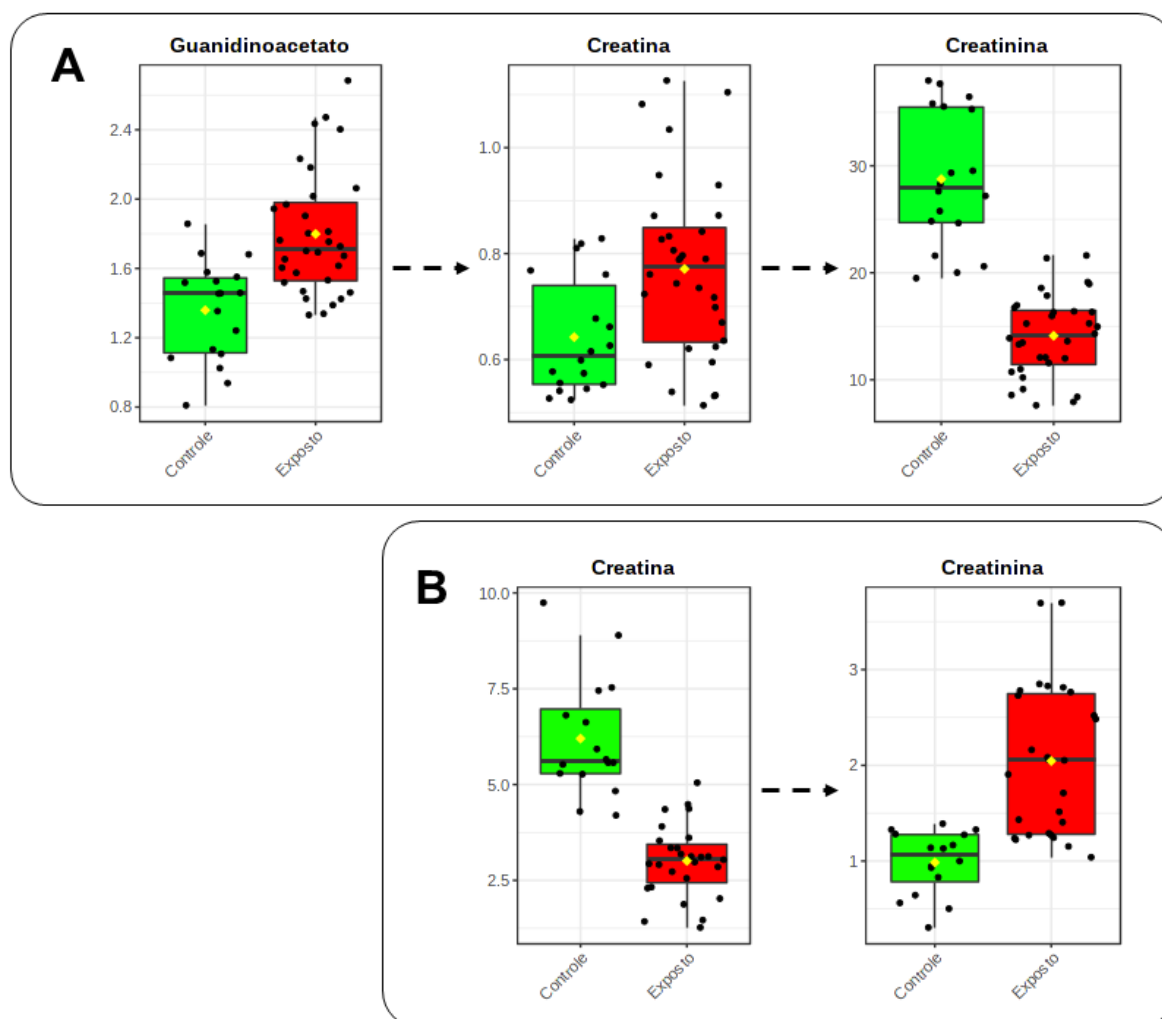
glicina. Esses três foram encontrados com níveis elevados na urina do grupo Exposto, e glutamato e glutamina com níveis elevados em amostras de plasma também do grupo Exposto.

7.4 Metabolismo creatina e creatinina

Foi observado que os metabólitos guanidinoacetato e creatina apresentaram maior quantidade na urina do grupo Exposto, complementado pela diminuição da creatinina (Figura 17a). A creatina é fosforilada pela enzima creatina quinase (CK) em fosfocreatina, porém essa reação pode ser revertida em casos de estresse oxidativo, provocando o aumento de guanidinoacetato e creatina na urina (ALMAR et al., 2002; WANG et al., 2005). Além disso, por meio da corrente sanguínea, a creatinina é transportada até os rins, sendo eliminada do corpo por filtração glomerular e excreção tubular parcial pela urina. Assim, os baixos níveis na urina indicam acúmulo no plasma e baixa taxa de filtração (LEVEY et al., 2020; WANG et al., 2005). Tal fato se encontra em consoante com os achados no plasma, visto que foram encontrados níveis elevados de creatinina, e creatina com concentração baixa, exatamente o contrário que encontramos na urina (Figura 17b).

Esses indicativos fomentam uma disfunção renal, visto que as perturbações causadas no metabolismo da via creatina e creatinina foram consideráveis, tanto que a creatinina não é devidamente eliminada do corpo, gerando acúmulo no sangue.

Figura 17: Perturbações na via da Creatina. (A) Metabólitos quantificados na urina. (B) Metabólitos quantificados relativamente no plasma.



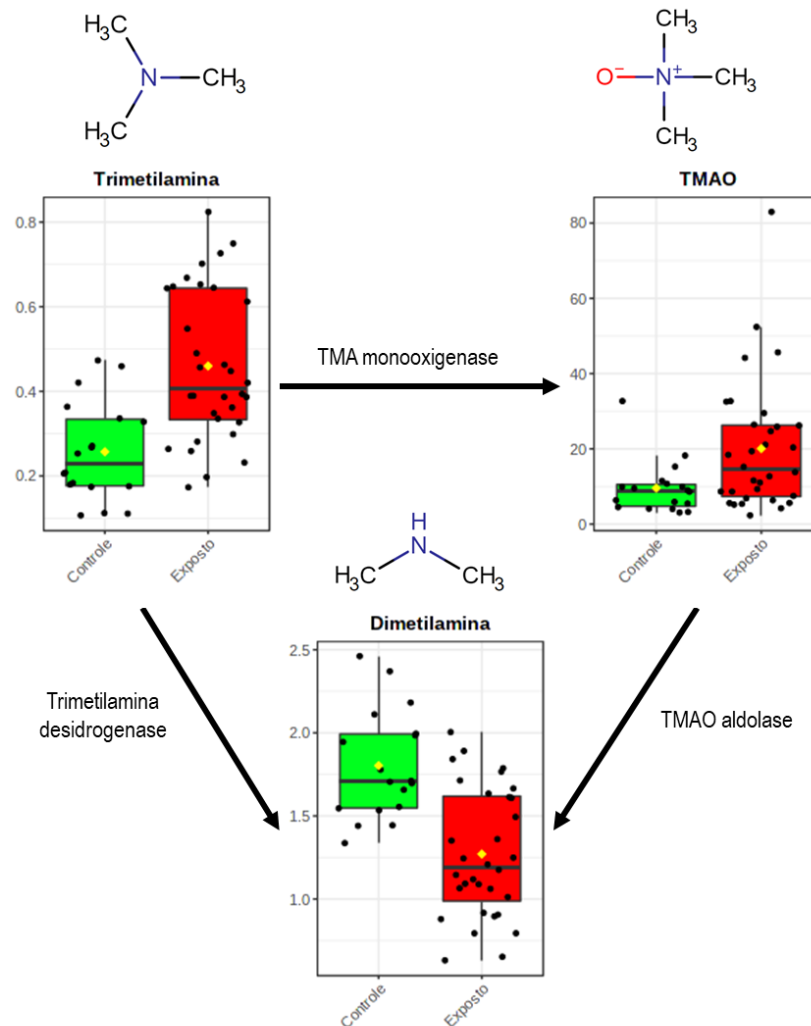
Fonte: O autor, 2021. *Boxplot com quartis mediano e extremos ilustrado pelo valor da intensidade do pico do metabólito (eixo y), entre os grupos Controle (verde) e Exposto (vermelho). O losango em amarelo indica o valor médio de cada metabólito.*

7.5 Metabolismo da TMA, DMA e TMAO

O metabolismo da trimetilamina (TMA) pode ocorrer por duas vias envolvendo bactérias intestinais. A primeira envolve a oxigenação do TMA, seguido pela demetilação de sua forma oxigenada para produzir dimetilamina (DMA). Essa via é catalisada pela TMA monooxigenase e TMAO aldolase. A segunda via, acontece envolvendo uma n-desmetilação direta, e energeticamente mais favorável, produzindo DMA e formaldeído catalisada pela TMA desidrogenase (FENNEMA et al., 2016).

Finalmente, foi descrito que a exposição ao CELMM, o qual influência na dieta, hábitos e aspectos culturais em moradores de regiões circunvizinhas e apresenta contaminantes inorgânicos, afeta a microbiota e prejudica a barreira intestinal, assim como o metabolismo da microbiota intestinal. A partir da digestão de alimentos contendo carne e aminas quaternárias na dieta, como fosfatidilcolina, colina, betaína ou L-carnitina o TMAO é gerado, tornando-o tentador a especulação que o mercúrio promove o aumento nos níveis de TMAO, modificando a microbiota intestinal. Tal hipótese é apoiada pela diminuição da dimetilamina em amostra do grupo Exposto. Alguns estudos consideraram o TMAO como marcador biológico envolvendo metais potencialmente tóxicos, especialmente arsênio e mercúrio, causadores de danos renais (GARTLAND et al., 1989; BAIRAKTARI et al., 2002; WEI et al., 2009).

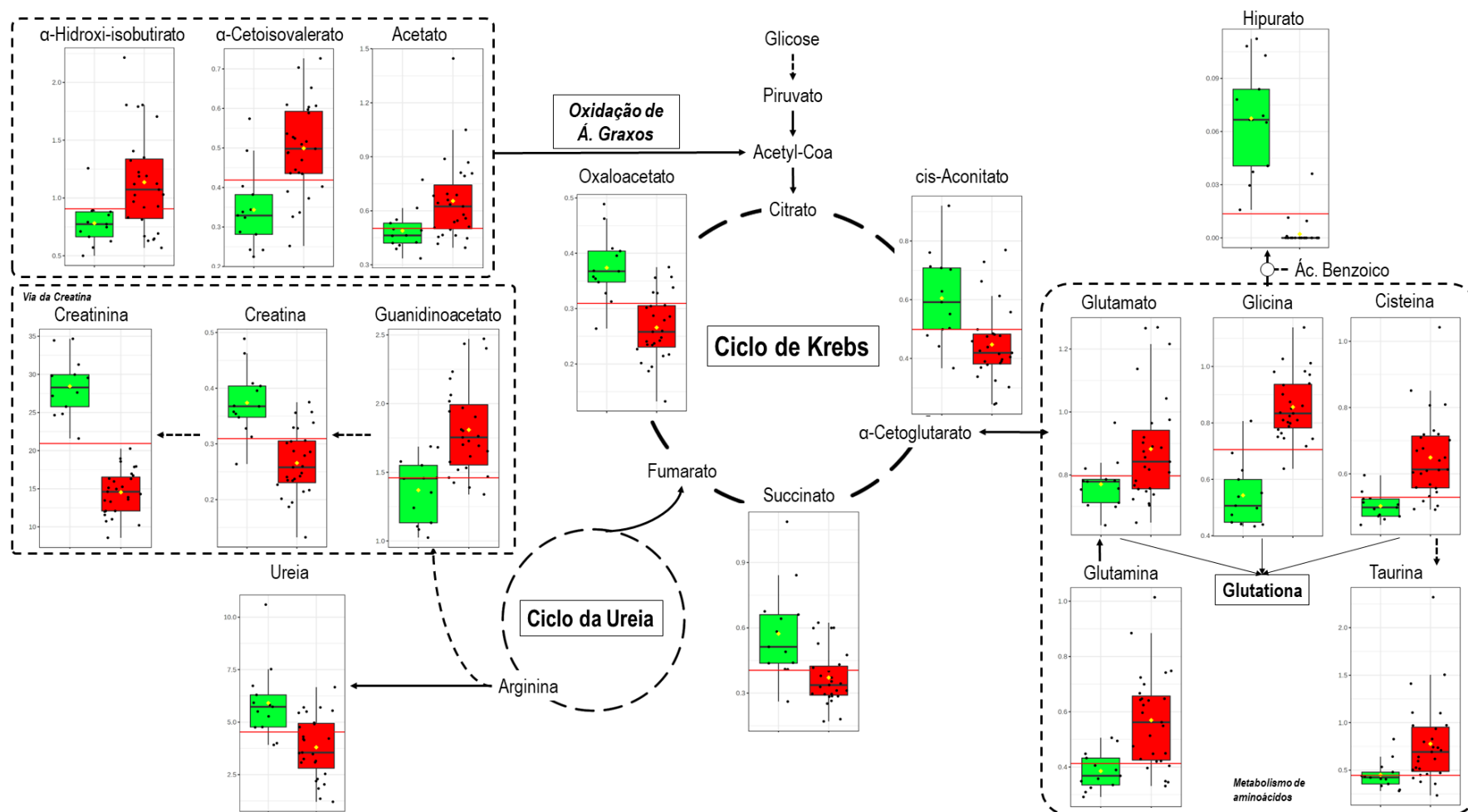
Figura 18: Metabolismo da TMA, DMA e TMAO



Fonte: O autor, 2021. *Boxplot com quartis mediano e extremos ilustrado pelo valor da intensidade do pico do metabólito (eixo y), entre os grupos Controle (verde) e Exposto (vermelho). O losango em amarelo indica o valor médio de cada metabólito.*

Por fim, um resumo das alterações metabólicas observadas neste trabalho está ilustrada na figura 19, onde observamos perturbações no ciclo de Krebs, oxidação de ácidos graxos, via da creatina e metabolismo de aminoácidos.

Figura 19: Rede metabólica.



Fonte: O autor, 2021. *Boxplot com quartis mediano e extremos ilustrado pelo valor da intensidade do pico do metabólito (eixo y), entre os grupos Controle (verde) e Exposto (vermelho). O losango em amarelo indica o valor médio de cada metabólito.*

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Nosso estudo observou perturbações no metabolismo energético e estresse oxidativo em pescadores que vivem ao redor da Lagoa Mundaú (Alagoas, Brasil). Os modelos metabômicos criados foram capazes de discriminar o grupo Exposto do Controle, e assim revelar biomarcadores de exposição ambiental a agentes tóxicos. Além disso, identificamos padrões metabólicos relacionados a contaminantes inorgânicos e hábitos alimentares. Por fim, este estudo pode contribuir para o entendimento dos efeitos em pessoas expostas a ambientais contaminado, visto que existem poucos estudos sobre o assunto, e na região da Lagoa Mundaú, não há trabalho semelhante que correlacione metabólitos endógenos com a contaminação ambiental.

PERSPECTIVAS

9 PERSPECTIVAS

A presente pesquisa abordando a metabolômica baseada em ^1H RMN deu apenas os seus primeiros passos, com a demonstração de seu potencial. Existem algumas melhorias e modificações a fazer nos modelos criados em estudos futuros, especialmente, em ampliar o n amostral levando em consideração alguns critérios de exclusão, como não ser fumante, não consumir álcool ou possuir alguma patologia, uma vez que esses fatores podem influenciar na resposta aos metabólitos. Neste sentido, considera-se esta pesquisa o primeiro passo para monitorar o efeito da contaminação na laguna Mundaú nos níveis dos metabólitos presentes na urina e plasma de pescadores expostos ao meio.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155-171, 2002.

OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends Biotechnol.** v. 16, n. 9, p. 373-378. 1998.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**. v. 29, n. 11, p. 1181-1189, 1999.

FIEHN O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**. v. 2, n. 3, p. 155-168. 2001.

RAPPAPORT, S. M. et al. The blood exposome and its role in discovering causes of disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 122 p. 769–774, 2014.

JONES, O. A. H. et al. Metabolic profiling of *Mytilus galloprovincialis* and its potential applications for pollution assessment. **Marine Ecology Progress Series**, v. 369, p. 169-179, 2008.

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R.; GARCÍA-BARRERA, T.; GÓMEZ-ARIZA, J. L. Metabolomic study of lipids in serum for biomarker discovery in Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 98, p. 321-326, 2014.

WEI, L. et al. Toxicological effects of cinnabar in rats by NMR-based metabolic profiling of urine and serum. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 227, n. 3, p. 417-429, 2008.

ERRY, B. V. et al. Arsenic contamination in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and bank voles (*Clethrionomys glareous*) on abandoned mine sites in southwest Britain. **Environmental Pollution**, v. 110, p. 179–187, 2000.

GARCÍA-SEVILLANO, M. A. et al. Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As₂O₃ based on integrated -omics approaches. **Metallomics**, v. 5, p. 1644–1655, 2013a.

SILVA-FILHO, R. et al. Impact of environmental mercury exposure on the blood cells oxidative status of fishermen living around Mundaú lagoon in Maceió - Alagoas (AL), Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 219, 2021.

DOS SANTOS, M. C. et al. Evaluation of potentially toxic elements in Mundaú Lagoon (Maceió, AL-Brazil): systematic environmental monitoring of water and food quality (in press) **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 32, p. 1762-1772, 2021.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. **Chemical Reviews**. v. 113, n. 4, p. 2437-2468, 2013.

HEIDEN, M. G. V.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**. v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, 2009.

FREZZA, C. et al. Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase. **Nature**. v. 477, n. 7363, p. 225-228, 2011.

YUN, J. et al. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. **Science**. v. 350, n. 6266, p. 1391-1396, 2015.

WANG, X. et al. Serum metabolomics reveals that arsenic exposure disrupted lipid and amino acid metabolism in rats: a step forward in understanding chronic arsenic toxicity. **Metallomics**, v. 7, n. 3, p. 544-552, 2015.

GARCÍA-SEVILLANO, M. A.; GARCÍA-BARRERA, T.; GÓMEZ-ARIZA, J. L. Application of metallomic and metabolomic approaches in exposure experiments on laboratory mice for environmental metal toxicity assessment. **Metallomics**, v. 6, n. 2, p. 237-248, 2014a.

GARCÍA-SEVILLANO, M. A. et al. Metal interactions in mice under environmental stress. **Biometals**, v. 26, n. 4, p. 651-666, 2013b.

GOLDSMITH, P. et al. Metabonomics: a useful tool for the future surgeon. **Journal of Surgical Research**, v. 160 n. 1 p. 122-132. 2010.

ISSAQ, H. J.; ABBOTT, E.; VEENSTRA, T. D. Utility of separation science in metabolomic studies. **Journal of Separation Science**, v. 31 n. 11 p. 1936-1947, 2008.

VERPOORTE, R. et al. Metabolomics: back to basics. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 525–537, 2008.

WISHART, D. S. Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes. **Physiological Reviews**, v. 99, p. 1819 –1875, 2019.

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

LENZ, E. M.; WILSON, I. D. Analytical strategies in metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 443-458, 2007.

WISHART, D. S., Advances in metabolite identification. **Bioanalysis**, v. 3, p. 1769–1782, 2011.

KARGUL, J.; IRMINGER-FINGER, I.; LAURENT, G. J. Metabolomics: Taking snapshots of cellular physiology in health and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 93, p. 86, 2017.

KOSTIDIS, S. et al. Quantitative NMR analysis of intra- and extracellular metabolism of mammalian cells: a tutorial. **Analytical Chimica Acta**, v. 980, p. 1–24, 2017.

XIA, J., et al. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. **Metabolomics**, v. 9, p. 280–299, 2013.

MAHIEU, N. G.; GENENBACHER, J. L.; PATTI, G. J. A roadmap for the XCMS family of software solutions in metabolomics. **Current Opinion Chemical Biology**, v. 30, p. 87–93, 2016.

WISHART, D. S. Computational approaches to metabolomics. **Methods in Molecular Biology**, v. 593, p. 283–313, 2010.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current Protocols Bioinformatics**, v. 55, n. 14, p. 1-91, 2016.

GARCÍA-SEVILLANO, M. Á. et al. A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. **Journal Proteomics**. v. 104, p. 66-79. 2014b

LI, X. et al. Heavy metal exposure causes changes in the metabolic health-associated gut microbiome and metabolites. **Environment International**. v. 126, p. 454-467, 2019

LIN, H. et al. Correlations of fecal metabonomic and microbiomic changes induced by high-fat diet in the pre-obesity state. **Scientific Reports**, v. 6, a. 21618, p. 1-14, 2016.

LI, S. et al. Predicting network activity from high throughput metabolomics. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 7, a. 1003123, p. 1-11, 2013.

HOLMES, E.; WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K. Metabolic phenotyping in health and disease. **Cell**, v. 134, p. 714–717, 2008.

VASILOPOULOU, C. G.; MARGARITY, M.; KLAPA, M. I. Metabolomic analysis in brain research: opportunities and challenges. **Frontiers in Physiology**, v. 7, a. 183, p. 1-8, 2016.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**. 2009.

SUGIMOTO, M. et al. Bioinformatics Tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. **Current Bioinformatics**. v. 7, e. 1, p. 96-108. 2012.

HUGHES, G. et al. Mutual Information as a Performance Measure for Binary Predictors Characterized by Both ROC Curve and PROC Curve Analysis. **Entropy (Basel)**. v. 22(9), e. 938. 2020.

KAMMENGA, J. E. et al. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 164, p. 93-147. 2000.

JAISHANKAR, M. et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**. v. 7, n. 2, p. 60-72. 2014.

BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. The aging kidney and the nephrotoxic effects of mercury. **Journal of Toxicology and Environmental Health B, Critical Reviews**. v. 20, n. 2, p. 55-80, 2017.

GENCHI G, et al. Mercury Exposure and Heart Diseases. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 14, n. 74, 2017.

MORRISON, N. et al. Standard reporting requirements for biological samples in metabolomics experiments: environmental context. **Metabolomics**, v. 3, p. 203–210, 2007.

GARCÍA-SEVILLANO, M. Á.; GARCÍA-BARRERA, T.; GÓMEZ-ARIZA, J. L. Environmental metabolomics: Biological markers for metal toxicity. **Electrophoresis**, v. 36, n. 18, p. 2348-2365, 2015.

BRUNETTI, C. et al. Metabolomics in plant environmental physiology. **Journal of Experimental Botany**, v. 64 n. 13, p. 4011-4020, 2013.

GORDON, B. R.; LEGGAT, W. Symbiodinium-invertebrate symbioses and the role of metabolomics. **Marine Drugs**, v. 8, n. 10, p. 2546-2568, 2010.

ARBONA, V. et al. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3 p. 4885-4911, 2013.

MACEL, M.; VAN, D. N. M.; KEURENTJES, J. J. Metabolomics: the chemistry between ecology and genetics. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 4, p. 583-593, 2010.

PARK, S.; SEO, Y. S.; HEGEMAN, A. D. Plant metabolomics for plant chemical responses to belowground community change by climate change. **Journal of Plant Biology**, v. 57, n. 3, p. 137-149, 2014.

SUN, X. et al. The responses of *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure explored via metabolite profiling. **Chemosphere**, v. 78 n. 7, p. 840-845. 2010.

NAGATO, E. G. et al. (1)H NMR-based metabolomics investigation of *Daphnia magna* responses to sub-lethal exposure to arsenic, copper and lithium. **Chemosphere**. v. 93, n. 2, p. 331-337, 2010.

BAO, Y., LIU, X., ZHANG, W. et al. Identification of a regulation network in response to cadmium toxicity using blood clam *Tegillarca granosa* as model. **Scientific Reports**, 6, a. 35704, 2016.

BRANDÃO, F. et al. Unravelling the mechanisms of mercury hepatotoxicity in wild fish (*Liza aurata*) through a triad approach: bioaccumulation, metabolomic profiles and oxidative stress. **Metallomics**. n. 7 e. 9, p. 1352-1363, 2015.

ELLIS, J. K. et al. Metabolic profiling detects early effects of environmental and lifestyle exposure to cadmium in a human population. **BMC Medicine**. v. 10, n. 61, p. 1-10, 2012.

GAO, Y. et al. Identifying early urinary metabolic changes with long-term environmental exposure to Cadmium by Mass-Spectrometry-based metabolomics. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 11, p. 6409–6418, 2014.

LEIPZIG J. A review of bioinformatic pipeline frameworks. **Brief Bioinformatics**. v. 18, n. 3, p. 530-536, 2017.

VIDAL M. A unifying view of 21st century systems biology. **FEBS Lett.** n. 583, p. 3891–3894, 2009.

NIELSEN J. Systems Biology of Metabolism. **Annual Review of Biochemistry**. n. 86, p. 245-275, 2017.

WU, F. et al. Arsenic exposure from drinking water and urinary metabolomics: Associations and long-term reproducibility in Bangladesh adults. **Environmental Health Perspectives**, v. 126, n. 1, a. 017005, 2018.

WANG, Z. et al. The impact of chronic environmental metal and benzene exposure on human urinary metabolome among Chinese children and the elderly population. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 232-239, 2019.

GARTLAND, K. P.; BONNER, F. W.; NICHOLSON, J. K. Investigations into the biochemical effects of region-specific nephrotoxins. **Molecular Pharmacology**, v. 35, n. 2, p. 242-250 1989.

HOLMES, E. et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition analysis of the biochemical processes associated with the progression of and recovery from nephrotoxic lesions in the rat induced by mercury(II) chloride and 2-bromoethanamine. **Molecular Pharmacology**, v. 42, n. 5, p. 922-930, 1992.

SUN, G. et al. Gut microbial metabolite TMAO contributes to renal dysfunction in a mouse model of diet-induced obesity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493, n. 2, p. 964-970, 2017.

WEI, L. et al. Metabolic profiling studies on the toxicological effects of realgar in rats by (1)H NMR spectroscopy. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 234, n. 3, p. 314-325, 2009.

GARCÍA-SEVILLANO, M. A. et al. Metabolomic study in plasma, liver and kidney of mice exposed to inorganic arsenic based on mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406 n. 5, p. 1455-1469, 2014c.

LEE, Y. K. et al. Evaluation of cadmium-induced nephrotoxicity using urinary metabolomic profiles in sprague-dawley male rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, v. 77, n. 22-24, p. 1384-1398, 2014.

GRIFFIN, J. L. et al. The initial pathogenesis of cadmium induced renal toxicity. **FEBS Letters**, v. 478, n. 1-2, p. 147-150. 2000.

ELLIS, J. K. et al. Metabolic profiling detects early effects of environmental and lifestyle exposure to cadmium in a human population. **BMC Medicine**, v. 10, n. 61, 2012.

DUDKA, I. et al. Metabonomic analysis of serum of workers occupationally exposed to arsenic, cadmium and lead for biomarker research: a preliminary study. **Environment International**. v. 68 p. 71-81, 2014.

ÅKESSON, A. et al. Non-renal effects and the risk assessment of environmental cadmium exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n. 5, p. 431-438, 2014.

WU, F. et al. Arsenic Exposure from Drinking Water and Urinary Metabolomics: Associations and Long-Term Reproducibility in Bangladesh Adults. **Environmental Health Perspectives**, v. 126, n. 1, a. 017005. 2018.

ELLIS, D. I. et al. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. **Pharmacogenomics**, v. 8, p. 1243–1266, 2007.

WISHART, D. S. Metabolomics in monitoring kidney transplants. **Current Opinion Nephrology and Hypertension**. v. 15 p. 637-642, 2006.

KELL, D. B. et al. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 557-565, 2005.

BOGUSZEWICZ, J. et al. NMR-based metabolomics in real-time monitoring of treatment induced toxicity and cachexia in head and neck cancer: a method for early detection of high risk patients. **Metabolomics**, v. 15, n. 110, 2019.

KIM, R. E. et al. Urine-NMR metabolomics for screening of advanced colorectal adenoma and early stage colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 4786, 2019.

GRATTON, J. et al. An optimized sample handling strategy for metabolic profiling of human feces. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 9, p. 4661-4668, 2016.

BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocols**, v. 2, n. 11, 2693-2703, 2007.

EMWAS, A. H. et al. Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. **Metabolomics**, v. 14, n. 3, 2018.

CLOAREC, O. et al. Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in ¹H-NMR spectroscopic metabonomic studies. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 517–526, 2005.

DEFERNEZ, M., & COLQUHOUN, I. J. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ¹H-NMR spectra. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 1009–1017, 2003.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações. **Campinas: Unicamp**, 2015.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols Bioinformatics**, v. 68, n. 1, e, 86, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Methylmercury. Environmental health criteria 101. **Geneva: International Programme on Chemical Safety**. 1990

CLOAREC, O., et al. Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ^1H NMR data sets. **Analytical Chemistry**, v. 77 n. 5, p. 1282-1289, 2005.

TYNKKYNEN, T. et al. Proof of concept for quantitative urine NMR metabolomics pipeline for large-scale epidemiology and genetics. **International Journal of Epidemiology**, v. 48, n. 3, p. 978-993, 2019.

WANG, Z. et al. NMR-based metabolomic techniques identify potential urinary biomarkers for early colorectal cancer detection. **Oncotarget**, v. 8, n. 62, p. 105819-105831, 2017.

WISHART, D. S. et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Research, Nucleic Acids Research**. v. 46, n. D1, 4, p. D608–D617, 2018.

PAPANDREOU, C et al. Trimethylamine N-Oxide in Relation to Cardiometabolic Health-Cause or Effect?. **Nutrients**. v. 12, n. 1330, p. 1-36, 2020.

SEIBEL, B. A.; WALSH, P. J. Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. **The Journal of Experimental Biology**. v. 205, p. 297–306, 2002.

BAIRAKTARI, E. et al. Rhabdomyolysis-related renal tubular damage studied by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 1106-1109, 2002.

LEVEY, A. S. et al. Measured and estimated glomerular filtration rate: current status and future directions. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 51-64, 2020.

KIM, K. B. et al. Toxicometabolomics approach to urinary biomarkers for mercuric chloride (HgCl_2)-induced nephrotoxicity using proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 249 n. 2, p. 114-126, 2010.

NICHOLSON, J. K.; TIMBRELL, J. A.; SADLER, P. J. Proton NMR spectra of urine as indicators of renal damage. Mercury-induced nephrotoxicity in rats. **Molecular Pharmacology**, v. 27, p. 644-651, 1985.

BADENHORST, C. P. S. et al. Glycine conjugation: importance in metabolism, the role of glycine N-acyltransferase, and factors that influence interindividual variation. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 9, p. 1139-1153, 2013.

IRWIN, C. et al. Contribution towards a Metabolite Profile of the Detoxification of Benzoic Acid through Glycine Conjugation: An Intervention Study. **PLoS One**. v. 11, n. 12, e. 0167309, 2016.

DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. **Annals of The New York Academy of Science**. v. 973, p. 488-504, 2002.

JOZEFCAK, M. et al. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. **International Journal of Molecular Science**. v. 13, n. 3, p. 3145-3175, 2012

BRIDGES, C. C. et al. Glutathione status and the renal elimination of inorganic mercury in the Mrp2(-/-) mouse. **PLoS One**, v. 8, n. 9, e. 73559, 2013.

RUBINO, F. M. Toxicity of Glutathione-Binding Metals: A Review of Targets and Mechanisms. **Toxics**, v. 3, n. 1, p. 20-62, 2015.

GURER, H.; et al. Antioxidant effect of taurine against lead-induced oxidative stress. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 41, n. 4, p. 397-402, 2001.

SINHA, M.; MANNA, P.; SIL, P. C. Taurine protects the antioxidant defense system in the erythrocytes of cadmium treated mice. **BMB Reports**, v. 41, n. 9, p. 657-663, 2008.

JAGADEESAN, G.; SANKARSAMI PILLAI S. Hepatoprotective effects of taurine against mercury induced toxicity in rats. **Journal of Environmental Biology**. v. 28, n. 4, p. 753-756, 2007.

ALMAR, M, et al. Urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of oxidative damage in road cycling. **Free Radical Research**, v. 36, p. 247-253, 2002.

WANG, Y. et al. A metabonomic strategy for the detection of the metabolic effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) ingestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 191-196, 2005.

FENNEMA, D. et al. Trimethylamine and Trimethylamine N-Oxide, a Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3)-Mediated Host-Microbiome Metabolic Axis Implicated in Health and Disease. **Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals**. 2016

PROKOPIENKO, A. J. et al. Metabolic Activation of Flavin Monooxygenase-mediated Trimethylamine-N-Oxide Formation in Experimental Kidney Disease. **Scientific Reports**, v. 9, n. 15901, 2019.

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

(Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntári(o,a) da pesquisa e pelo responsável)

Eu, tendo sido convidad(o,a) a participar como voluntári(o,a) do estudo *Avaliação da exposição a contaminantes inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) no ambiente e parâmetros bioquímicos associados ao estresse oxidativo da população circunvizinha ao Complexo Lagunar Mundaú-Manguaba (Maceió-AL): correlação entre contaminação ambiental e qualidade da saúde humana*, recebi do Sr. Josué Carinhanha Caldas Santos, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

Que o estudo se destina a obtenção de amostras biológicas (sangue e urina) referentes à população que reside em torno do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM) do município de Maceió-AL para avaliação de contaminante inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) e biomarcadores do estresse oxidativo.

Que a importância deste estudo é a de gerar informações sobre a possível contaminação da população residente ou que trabalha no CELMM (Maceió-AL), sua relação com doenças relacionadas ao estresse oxidativo que estas espécies inorgânicas podem causar em função da exposição ambiental.

Que os resultados que se desejam alcançar são a concentração de contaminante inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) e de biomarcadores do estresse oxidativo nas amostras de sangue e urina, a fim de estabelecer uma relação entre estes parâmetros com o desenvolvimento de patologias e contaminação ambiental.

Que esse estudo começará em novembro/2016 e terminará em novembro/2019, considerando as oficinas informativas como primeira atividade relacionada a este projeto junto a comunidade.

Que o estudo será feito da seguinte inicialmente com ciclo de oficinas com palestras informativas visando o levantamento de possíveis voluntários, em seguida, serão realizadas a coleta das amostras de sangue e urina segundo práticas já estabelecidas, assim como, a aplicação de questionário epidemiológico. De posse das amostras e dos dados epidemiológicos serão realizadas as medidas laboratoriais baseadas em protocolos consolidados para quantificação de Hg, As, Se, Cd, Pb e produção de espécies reativas de oxigênio, glutathiona reduzida e oxidada, superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase, desidratase gama-aminolevulinato e 8-isoprostano. Por fim, estes dados serão avaliados com rigor estatístico sendo gerados relatórios, resumo e artigos com intuito de divulgar para sociedade os resultados obtidos. As amostras de sangue e urina coletadas podem ser utilizadas para medição de outros parâmetros químicos e bioquímicos que forem necessários para um melhor entendimento das hipóteses do projeto.

Que eu participarei das seguintes etapas: i) responder as questões específicas do estudo contidas no questionário epidemiológico de avaliação, ii) permitir medidas de peso e altura para calcular o índice de massa corpóreo, e iii) fornecer amostras de sangue e urina.

- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: possíveis desconfortos durante a coleta de sangue (punção venosa).
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental seriam possivelmente durante a coleta de sangue, na qual podem ocorrer dor, hematomas, acidente com perfurocortantes, punção acidental de uma artéria e lesão nervosa. Contudo, este procedimento será realizado por profissional da saúde com experiência e segundo as boas práticas individuais que seguem tal procedimento visando eliminar tais riscos.
- Que deverei contar com a assistência de profissionais da saúde com experiência comprovada, sendo responsáveis pela coleta das amostras de sangue.
- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são obtenção de resultados relacionados com contaminantes inorgânicos e biomarcadores do estresse oxidativo e a influência da contaminação ambiental quanto ao estado de saúde da população em estudo.
- Que a minha participação será acompanhada por profissionais da saúde para recolhimento das amostras de sangue e coordenador do projeto para esclarecimento sobre eventuais dúvidas que possam surgir durante a realização da pesquisa.
- Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que eu serei informado sobre o resultado final da pesquisa.
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
- O estudo não acarretará nenhuma despesa para o participante da pesquisa.
- Que eu serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a participação na pesquisa.
- Que eu receberei uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a).
 Domicílio: (rua, praça, conjunto)
 Bloco: /Nº: /Complemento:
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
 Ponto de referência:

Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):

Nome: Josué Carinhanha Caldas Santos
 Endereço: Rua Prof. Vital Barbosa, 1207.
 Complemento: Ed. Key West, Ap. 402
 Bairro: Ponta Verde, CEP 57035-400, Maceió-AL
 Telefones para contato: (82) 99660-1688 ou (82) 3214-1347
 Instituição: Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas
Prédio da Reitoria, 1º Andar, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária
Telefone: 3214-1041, Maceió-AL

Maceió,

Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal e rubricar as demais folhas	<p style="text-align: center;">Josué Carinhanha Caldas Santos <i>Responsável pelo estudo</i></p>

APÊNDICE B

Projeto: Avaliação da exposição a contaminantes inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) no ambiente e parâmetros bioquímicos associados ao estresse oxidativo da população circunvizinha ao Complexo Lagunar Mundaú-Manguaba (Maceió-AL): correlação entre contaminação ambiental e qualidade da saúde humana.

Chamada FAPEAL 06/2016-PPSUS, Programa Pesquisa para o SUS: Gestão compartilhada em Saúde.

Questionário epidemiológico

Dados pessoais

1. Nome:

Código de identificação: exemplo, M01 (mulher) ou H01 (homem)

2. Sexo: () () Mulher

Homem

3. Idade: 4. Altura: 5. Cor:

6. Índice de massa corpórea

(IMC):

7. Escolaridade (número de anos que estudou):

8. Pescador: () Sim () Não

9. Fumante:

() Sim Frequência (número de cigarros por
dia/semana):

() Não

10. Consome bebida alcoólica:

() Sim Frequência (número de dias por semana):

() Não

11. Histórico de doenças:

() () () Câncer

Diabetes Hipertensão

() () Outra:

Cardiopatia

Exposição ao ambiente

12. Tipo de contato com a água do CELMM (Maceió - AL):

<input type="checkbox"/> banho	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> pescar
	cozinhar	
<input type="checkbox"/> beber	<input type="checkbox"/> lavar	<input type="checkbox"/> limpeza
	roupa	da casa
<input type="checkbox"/> lavar	<input type="checkbox"/> Outros:	
prato		
<input type="checkbox"/> não tenho contato		
13. Frequência de contato com a água do CELMM (Maceió - AL):		
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 5-3 vezes na	<input type="checkbox"/> 1-2 vezes na
diário	semana	semana
14. Come sururu pescado no CELMM (Maceió - AL):		
<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
15. Frequência que come sururu pescado do CELMM		
(Maceió - AL):		
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 5-3 vezes na	<input type="checkbox"/> 1-2 vezes na
diário	semana	semana
16. Massa aproximada que consome sururu pescado do CELMM (Maceió - AL):		
<input type="checkbox"/> > 500 g	<input type="checkbox"/> 100-500	<input type="checkbox"/> < 100 g
	g	

Maceió ____ / ____ / ____

Declaro que estou de acordo com as informações fornecidas acima em função da minha anuência registrada pelo termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e que as mesmas são verdadeiras.

 Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a)

 Nome e assinatura do(s) responsável(eis) pelo estudo

APÊNDICE C

Lista de metabólitos identificados nas amostras de urina.

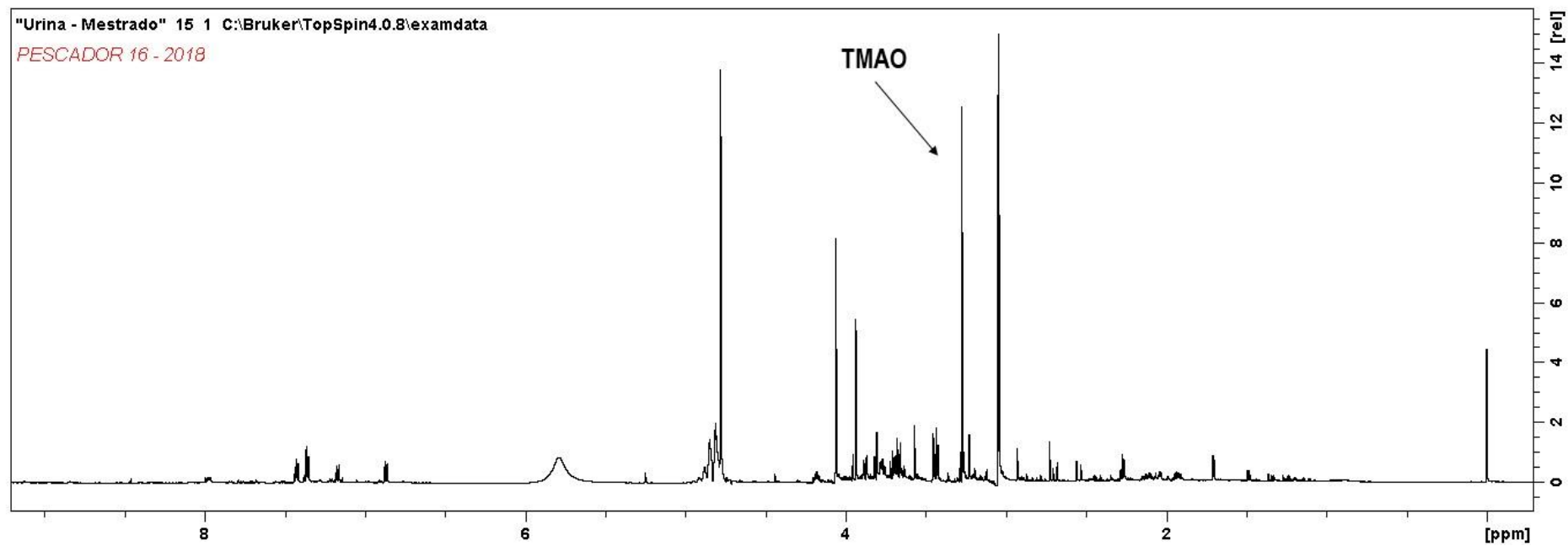
	Metabólito	δ ¹H ppm	Multiplicidade	ID do HMDB
1	2-Cetoisovalerato	1.1; 3.02	d; m	HMDB0000019
2	3-Hidroxi butirato	1.23	d	HMDB0000011
3	2-Hidroxi-isobutirato	1.36	s	HMDB0000729
4	Acetato	1.92	s	HMDB0000042
5	Glutamato	2.08	m	HMDB0000148
6	Metionina	2.16	s	HMDB0000696
7	Acetona	2.22	s	HMDB0001659
8	2-Aminoadipato	2.23	t	HMDB0000510
9	Acetoacetato	2.28	s	HMDB0000060
10	Oxaloacetato	2.35	s	HMDB0000233
11	Succinato	2.40	s	HMDB0000254
12	Glutamina	2.46	m	HMDB0000641
13	Metilamina	2.61	s	HMDB0000164
14	DMA	2.72	s	HMDB0000087
15	Sarcosina	2.74; 3.61	s	HMDB0000271
16	Metilguanidina	2.83	s	HMDB0001522
17	TMA	2.88	s	HMDB0000906
18	Lisina	3.02	t	HMDB0000182
19	Cisteína	3.08; 3.9	dd; t	HMDB0000574
20	Creatina	3.04; 3.94	s; s	HMDB0000064
21	Creatinina	3.05; 4.06	s; s	HMDB0000562
22	Malonato	3.12	s	HMDB0000691
23	cis-Aconitato	3.16; 5.68	s; s	HMDB0000072
24	Acetilcarnitina	3.20; 2.51	s; dd	HMDB0000201
25	Carnitina	3.23; 3.43	s; m	HMDB0000062
26	TMAO	3.27	s	HMDB0000925
27	Taurina	3.25; 3.41	t; t	HMDB0000251
28	trans-Aconitato	3.47; 6.62	s; s	HMDB0000958
29	Glicina	3.58	s	HMDB0000123

30	Guanidinoacetato	3.77	s	HMDB0000128
31	Hipurato	3.97; 7.55; 7.64; 7.84; 8.58	d; t; t; d; s	HMDB0000714
32	Ureia	5.81	s	HMDB0000294
33	Tirosina	6.89; 7.19	d; d	HMDB0000158
34	3-Indoxilsulfato	7.50; 7.70;	d; d	HMDB0000682
35	Trigonelina	4.44; 8.08; 8.84; 9.13	s; t; m; s	HMDB0000875

s-singleteo, d-dupleto, dd-duplo dupleto, t-tripleteo, q-q uarteto, m-multipleto

APÊNDICE D

Espectro ^1H RMN do potencial *outlier*.



Múltiplos espectros de ^1H RMN evidenciando a intensidade do sinal do TMAO em uma das amostras do grupo Exposto.

