



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



JEFERSON SANTANA URSULINO

**ANÁLISE METABOLÔMICA DE ÁGUAS FECAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DE
PERFIS BIOQUÍMICOS DE PACIENTES DIAGNÓSTICADOS COM DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Maceió
2018

JEFERSON SANTANA URSULINO

**ANÁLISE METABOLÔMICA DE ÁGUAS FECAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DE
PERFIS BIOQUÍMICOS DE PACIENTES DIAGNÓSTICADOS COM DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à banca examinadora do Instituto de Química e Biotecnologia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano

Maceió
2018

Este trabalho é dedicado primeiramente a Deus, por ser precípuo em minha vida e presente nas horas de angústia, ao meu pai que Deus o tenha por ser uma referência de superação e força, e a minha mãe Quitéria que nunca me abandonou e tornou-se um exemplo a ser seguido pelos seus filhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, saúde e pela capacidade de acreditar que cada sonho é uma realidade em potencial, esperando ser transformada em meta. A minha família, em especial minha mãe que se abdicou da vida para viver em prol de seus filhos que tanto a ama. Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano pela confiança em mim depositada, paciência e conhecimento. E que me ensinou não apenas a ser pesquisador, mas também a ser professor. Obrigado pela amizade e dedicação! Aos meus amigos que o universo acadêmico proporcionou que tanto me ajudaram. Gratidão!

“Eu, um universo de átomos, um átomo no universo.”

Richard Feynman.

RESUMO

Compreender o funcionamento do metabolismo da microflora intestinal é de extrema importância para elaboração de um potencial perfil bioquímico, pois as perturbações metabólicas fecais realizadas por microrganismos patogênicos causam desequilíbrio a microflora intestinal gerando a disbiose intestinal, beneficiando um quadro de inflamação do trato gastrointestinal (TGI). Atualmente, o diagnóstico da Doença Inflamatória Intestinal (DII) baseia-se em aspectos clínicos, endoscópicos, histológicos e técnicas radiológicas, onde, mesmo dentro de tais ferramentas, estão métodos invasivos que geram desconforto ao paciente. Devida a baixa sensibilidade dos exames tradicionais, torna-se difícil em algumas situações o diagnóstico preciso dentro dos dois subtipos da doença; a doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU). Por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio é possível analisar todos os metabólitos presentes nas amostras fecais, em que, aliada a quimiometria estabelece condições essenciais para a extração do máximo de informações verídicas e, de maneira precisa, interpretar os dados gerados pela PCA (Análise dos componentes principais), O-PLS-DA (Análise discriminante de projeções ortogonais para estruturas latentes) e ANOVA (Análise de variância) e desta forma criar o Grupo controle (GC) para obtenção um perfil bioquímico padrão e assim comparar com os perfis dos pacientes do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes – HUPAA diagnosticados com DC e RCU. A análise da metabolômica de biomarcadores relacionados a doença, além de ser uma prática não invasiva, nos proporciona a criação de um poderoso método eficaz com alta sensibilidade para o diagnóstico de pacientes com DC e RCU.

Palavras-chaves: Perfil bioquímico. Microflora intestinal. Metabólitos. Metabolômica. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

ABSTRACT

To understand the functioning of the metabolism of the intestinal microflora is extremely important for the planning of a potential biochemical profile, because the disturbances of metabolic faecal held by pathogenic microorganisms cause imbalance in the intestinal microflora generating the disbiose intestinal, benefitting from a frame of an inflammation of the Gastrointestinal tract (GIT). Currently, the diagnosis of Inflammatory Bowel Disease (IBD) is based on clinical features, endoscopic, histological and x-ray techniques, where the same, within such tools, which are invasive methods that generate discomfort to the patient. Due to the low sensitivity of the traditional examination, it becomes difficult in some situations, the precise diagnosis within two subtypes of the disease; Crohn's disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC). Through the technique of Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen (NMR ^1H) it is possible to analyse all the metabolites present in the fecal samples, in which combined with chemo metrics establishes the essential conditions for the extraction of the maximum of true information and accurately interpret the data generated by PCA (Principal component analysis), O-PLS-DA (Discriminant analysis of orthogonal projections to latente structures) and ANOVA (Analysis of variance) and in this way create the control Group (CG) to obtain a biochemical profile pattern and to compare with the profiles of the patients of the Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes – HUPAA diagnosed with CD and UC. The analysis of the metabolômica of biomarkers related to disease, in addition to being a practical non-invasive, provides us with the creation of a powerful and effective method with a high sensitivity for the diagnosis of patients with CD and UC.

Keywords: Biochemical profile. Intestinal microflora. Metabolites. Metabolomics. Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema demonstrando a complexidade e mutualidade entre as reações metabólicas dos organismos.....	20
Figura 2: Metabolismo significativamente alterado.....	22
Figura 3: Free Induction Decay - FID.....	23
Figura 4: Demonstração esquemática dos spins dos núcleos após aplicação de campo magnético.....	24
Figura 5: Representação das possibilidades de orientação do núcleo em relação ao campo magnético aplicado.....	25
Figura 6: ‘Cartão de urina’ publicado em 1506 por Ullrich Pinder no seu livro Epiphanie Medicorum. Relaciona cores, odores e gostos da urina com diagnósticos de doenças.....	29
Figura 7: Emoji - Fezes.....	33
Figura 8: Almofariz e Pistilo.....	33
Figura 9: Eppendorf.....	33
Figura 10: Tubo de RMN.....	34
Figura 11: RMN Bruker.....	34
Figura 12: Espectro de RMN ¹H.....	34
Figura 13: MATLAB v13.1.....	35
Figura 14: Comparação dos espectros de RMN ¹H de 400MHz das amostras do GC e RCU.....	36
Figura 15: Comparação dos espectros de RMN ¹H de 400MHz das amostras do GC e DC.....	37
Figura 16: Espectro de RMN ¹H de 400MHz das amostras fecais dividido em 3 partes, sendo δ 0,00 a 2,00; δ 2,10 a 3,90; δ 6,00 a 8,30.....	39
Figura 17: Análise do Componente Principal de 30 amostras de águas fecais (GC vs DC) de acordo com PC1 e PC2.....	41
Figura 18: Análise do Componente Principal de 28 amostras de águas fecais (GC vs RCU) de acordo com PC1 e PC2.....	42
Figura 19: OPLS-DA GC vs DC.....	43
Figura 20 Validação Cruzada - GC vs DC -.....	44
Figura 21: OPLS-DA GC vs RCU.....	45
Figura 22: Validação Cruzada - GC e RCU -.....	45
Figura 23: ANOVA (p<0.05) GC vs DC.....	46
Figura 24: ANOVA (p<0.05) GC vs RCU.....	47
Figura 25: Complexa rede metabólica criada através de amostras fecais para obtenção de um perfil bioquímico do GC e pacientes diagnosticados com DC e RCU.....	48

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Deslocamento químico dos metabólitos identificados	37
Tabela 2: Metabólitos discriminantes entre os grupos GC vs DC obtidos após o teste de ANOVA (p<0.05)	46
Tabela 3: Metabólitos discriminantes entre os grupos GC vs RCU obtidos após o teste de ANOVA (p<0.05)	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ – Deslocamento químico

μ - Micro

DC – Doença de Crohn

DII – Doença inflamatória intestinal

FID – Free Induction Decay

GC – Grupo controle

HUPAA – Hospital Universitário Professor Alberto Antunes

Hz – Hertz

J – Constante de acoplamento

L - Litro

MHz – Megahertz

MVA – Análise multivariada

NAPRMN – Núcleo de Análise e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear

O-PLS – Projeções ortogonais para estruturas latentes

O-PLS-DA – Análise discriminante de projeções ortogonais para estruturas latentes

PCA – Análise de componente principal

pH – potencial Hidrogeniônico

PLS – Mínimos quadrados parciais

PLS-DA – Análise discriminante de mínimos quadrados parciais

ppm – Parte por milhão

RCU – RetoColite Ulcerativa

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RPM – Rotações por minuto

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TGI – Trato gastrointestinal

TSP - 3-trimetilsilil-2,2,3,3-propionato-d₄ de sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Gerais	14
2.2. Específicos	14
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1. Doença Inflamatória Intestinal.....	15
3.1.1. Microbiota Intestinal	16
3.1.2. Disbiose Intestinal	18
3.2. Metabolismo	19
3.2.1. Metabolismo Intestinal	21
3.3. Ressonância Magnética Nuclear.....	23
3.3.1. Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear	24
3.3.2. Transformada de Fourier	25
3.3.3. Deslocamento Químico	25
3.3.4. Aplicação Clínica da RMN ¹ H	26
3.4. Análise quimiométrica.....	26
3.4.1. Análise de Componentes Principais	27
3.4.2. Análise Discriminante	27
3.5. Análise Metabolômica.....	28
4. METODOLOGIA	31
4.1. Obtenção das amostras de fezes.....	31
4.2. Preparação de amostras.....	31
4.3. Espectroscopia RMN ¹ H.....	31
4.4. Análise dos dados	32
4.5. FLUXOGRAMA – METODOLOGIA.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.2. Investigação dos espectros de RMN ¹ H.....	36
5.2. Identificação dos sinais nos espectros de RMN ¹ H.....	37
5.3. Quimiometria	40
5.3.1. Pré-processamento dos dados.....	40
5.3.2. PCA	40
5.3.2.1. PCA GC vs DC.....	40
5.3.2.2. PCA GC vs RCU	41

5.3.3.	O-PLS-DA	42
5.3.3.1.	O-PLS-DA GC vs DC	43
5.3.3.2.	OPLS-DA GC vs RCU	44
5.3.4.	ANOVA ($p < 0,05$)	46
5.3.4.1.	ANOVA ($p < 0,05$) GC vs DC	46
5.3.4.2.	ANOVA ($p < 0,05$) GC vs RCU	47
5.3.5.	Perfil Bioquímico	47
6.	CONCLUSÃO	49
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
	ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)	57
	ANEXO II – PROTOCOLO DE PESQUISA	59

1. INTRODUÇÃO

Os dois maiores subtipos da doença inflamatória intestinal (DII), as doenças de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU), são enfermidades crônicas que acomete toda mucosa do aparelho digestivo na qual sua etiopatogenia continua com a elucidação incompleta (KASPER, *et al.*, 2005). Atualmente o diagnóstico depende de técnicas endoscópicas, histológicas e radiológicas, podendo ser muitas das vezes demoradas e desconfortáveis para os pacientes. Exames endoscópicos, ocasionam riscos, em que para cada 1000 endoscopias, 1 paciente sofre perfuração intestinal (CRISPIN, *et al.*, 2009). A realização de exames endoscópicos por parte de alguns grupos de pacientes chega tornar impossível sua realização, especialmente os pediátricos (ANGRIMAN, *et al.*, 2012).

A utilização de recursos clínicos convencionais com caráter invasivo, embora proporcione riscos, ainda é insuficiente para a diferenciação de ambas doenças, em que muitas das vezes o resultado do diagnóstico é descrito como DII inclassificável (PRIDEUX, *et al.*, 2012). Quando possível sua classificação, a diferenciação se dá principalmente pela profundidade e extensão do acometimento. A DC é uma inflamação crônica específica (granulomatosa), caracterizada pela presença de uma agregação de macrófagos morfológicamente alterados e acomete todas as camadas da parede intestinal, podendo trazer comprometimento universal do trato digestório, enquanto a RCU acomete o intestino grosso e somente a mucosa e submucosa (SUARAWICZ, 1988).

Os principais agentes etiológicos como bactérias, vírus e parasitas, alimentos com aditivos, citotóxicos industriais, poluentes atmosféricos, produtos químicos e o stress, por exemplo, promovem uma mudança nos padrões epidemiológicos tornando as DII não exclusivas para gênero, área geográfica ou grupo étnico (CARDOZO, 2015).

Recentemente, a metabolômica foi introduzida para estudar as diferenças fisiopatológicas da DII (MARCHESE, 2007). Seus estudo científico que visa identificar e quantificar o conjunto de metabólitos - o metaboloma - produzidos e/ou modificados por um organismo (VILLAS-BÔAS, 2006). Metabólitos são produtos de mecanismos fisiológicos que podem indicar caminhos reacionais específicos e distinguir patologias distintas de manifestações clinicamente semelhantes (PATTI, *et al.*, 2012).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) para análise do metaboloma de tecidos e biofluidos aliada a quimiometria com a aplicação da PCA, O-PLS-DA, ANOVA e Validação Cruzada, viabilizam biomarcadores para discriminação entre as DII, mostrando a habilidade em gerar previsões testáveis com alta reprodutibilidade e

identificar metabólitos para diferenciação entre DC e RCU a partir de grupo controle. A criação de um perfil metabolômico pode ser usado para compreender as rotas do metabolismo em condições saudáveis, tal como, em circunstâncias que foram instigadas por microrganismos patogênicos a um distúrbio metabólico, interrompendo o metabolismo em determinada etapa que não condiz com o produto final. Estudos evidenciam moléculas irregulares como aminoácidos, intermediários do Ciclo de Krebs e ácidos graxos como produto na DII (STORR, *et al.*, 2013).

Atualmente, fica evidente que a metabolômica é um meio bem-sucedido para extrair informações complexas, pois combina a RMN ^1H de biofluidos com análises multivariadas, reconhecendo padrões e possivelmente biomarcadores discriminantes de doenças, de maneira não invasiva.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Encontrar biomarcador da DII em águas fecais usando a técnica de RMN ^1H combinado com análises estatísticas multivariadas e análise de discriminante para desenvolver um perfil metabólico comparativo entre grupo controle (GC) com pacientes do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes (HUPAA), diagnosticados com DC e RCU.

2.2. Específicos

- I. Coletar as amostras de fezes de pacientes com DC, RCU.
- II. Coletar as amostras de fezes de pessoas com TG saudável, criando o GC.
- III. Obter os espectros de RMN ^1H a partir das amostras fecais.
- IV. Discriminar as amostras de pacientes com DC e RCU com GC por meio de análises multivariadas pelos métodos de PCA e OPLS-DA dos espectros de RMN ^1H ;
- V. Identificar nos resultados de RMN ^1H os sinais responsáveis pela discriminação com ANOVA ($p < 0.05$) da DC e RCU.
- VI. Construir um modelo de classificação, que seja capaz de classificar novas amostras fecais corretamente, de acordo com seu perfil metabólico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Doença Inflamatória Intestinal

A DII é uma desordem crônica do trato gastrointestinal devido à sua inflamação e lesões epiteliais (LEE, *et al.*, 2015). Suas principais formas de apresentação são a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) (RODA, *et al.*, 2012), entretanto a gravidade dos quadros se diferencia pela sua fisiopatologia. Enquanto que a RCU afeta somente a mucosa intestinal e é tipicamente restrita ao cólon, a DC afeta todas as camadas intestinais e pode afetar qualquer segmento do trato gastrointestinal, sendo assim mais severa (MARCHESI, *et al.*, 2006).

A RCU é diagnosticada pela inflamação na camada de células que forra a superfície interna do intestino grosso, podendo vir acompanhada por lesões superficiais em tecido cutâneo, úlceras (VERONESI, 2003). Seus principais sintomas são dores abdominais, diarreia que pode ser acompanhada por sangue e em alguns casos hemorragia retal (STEPHEN, 2013). Cerca de 10% dos pacientes com inflamação do cólon, no entanto, não conseguem ser claramente classificados em ambos os grupos, e se dá o diagnóstico de colite indeterminada (DALAL; KWON, 2010).

A manifestação clínica da DC é extremamente inconstante, pois depende da localização no trato gastrointestinal e da intensidade da inflamação, assim como a presença de possíveis complicações intestinais e extra intestinais. Os sinais mais corriqueiros apresentados pela DC são dores abdominais, diarreia, febre, perda de peso (FELDMAN, 2002).

A etiologia da DII ainda não é integralmente compreendida, no entanto tem sido amplamente aceito que múltiplos fatores, incluindo genéticos, ambientais e fatores microbiológicos, contribuem para a ocorrência e subsistência da doença (STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P., 2007). São levantadas hipóteses de que há uma disbiose da microbiota intestinal (BOURLIOUX, 2014) devido a uma hiperatividade dos linfócitos T contra antígenos da microbiota, fato que modifica a síntese de ácidos graxos de cadeia curta envolvidos na renovação epitelial e origina uma inflamação do local (MARCHESI, *et al.*, 2006).

O diagnóstico da DII é comumente baseado numa abordagem multidisciplinar, envolvendo aspectos da história clínica, endoscopia, radiologia, histologia, microbiologia e hematologia. Esse processo revela uma considerável desvantagem por sua natureza invasiva, tempo despendido e o fato de 10% dos pacientes ainda permanecerem sem classificação diagnóstica (GEBOES, *et al.*, 2008).

Entretanto, esses métodos somente funcionam tardiamente, onde há uma clínica para auxiliar a interpretação dos exames. Um diagnóstico preciso que diferencie a DC e a RCU são de extrema importância para as decisões terapêuticas. O diagnóstico precoce está relacionado com um melhor prognóstico e diferenciação entre as doenças, evidenciando, assim, a necessidade do desenvolvimento de novos métodos (MARCHESI; HOLMES; KHAN et al, 2006).

3.1.1. Microbiota Intestinal

Devido à evolução simultânea entre as comunidades de bactérias (microbioma) e o ser humano, criou-se uma relação simbiótica, tornando as comunidades de bactérias suportáveis pelo sistema imunológico (THOMAS, *et al.*, 2017).

O interesse da comunidade científica sobre microbioma intestinal aumentaram exponencialmente na última década. Uma vez negligenciado, este constituinte do Trato Gastrointestinal (TGI) está agora ganhando reconhecimento por sua importância na busca pela saúde ideal (CRESCI, 2015). O microbioma, termo impresso por Joshua Lederberg, é uma comunidade ecológica de microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos que compartilham nosso corpo (LEDERBERG, 2001).

Conforme Cresci (2015), em 1900, Eli Metchnikoff, um cientista russo do Pasteur Institute in Paris, associou a longevidade dos búlgaros rurais ao consumo de produtos lácteos fermentados, e pôde concluir que as bactérias em alimentos lácteos fermentados ingeridas pelos camponeses que viviam em climas severos proporcionavam um efeito antienvelhecimento. Na atualidade a indústria de alimentos se manifestou produzindo uma infinidade de alimentos e suplementos de produtos “probióticos” ou “alimentos fermentados” que povoam as prateleiras das lojas (CRESCI, 2015).

Uma baixa diversidade de microrganismos está associada a uma infinidade de doenças, incluindo alergia, diabetes, obesidade, artrite, doenças inflamatórias intestinais e até distúrbios neuropsiquiátricos (THOMAS, *et al.*, 2017). Para cada etapa da vida, o ser humano está relacionado a determinados microrganismos. A humanidade evoluiu com bactérias no meio, e cada parte do corpo tem uma comunidade (COSTELLO, *et al.*, 2009).

Acredita que o corpo humano é composto por 30 trilhões células eucarióticas e 39 trilhões microrganismos colonizadores, de tal forma que as células hospedeiras e a microbiota sejam aproximadamente o mesmo número num indivíduo (SENDER, 2016). No que diz respeito ao genoma coletivo, ou metagenoma, da microbiota entérica contém mais de 100 vezes

o número de genes no genoma humano, e há aproximadamente 10 vezes mais genes em cada um dos nossos microbiomas do que em um ser humano, codificando a maior fonte de potencial antígenos com os quais o sistema imunológico deve lidar (MAYNARD, *et al.*, 2012).

As bactérias que promovem a saúde do TGI, utilizam material fermentável como substrato energético, tais como as fibras. Por isso, uma alimentação rica em fibra, com verduras, legumes, cereais como arroz integral e milho são fundamentais para regulamentação da saúde intestinal, proporcionando o equilíbrio da microflora (ALMEIDA, *et al.*, 2009; SANTOS, 2010).

Alguns nutrientes são fundamentais para o nosso organismo como as vitaminas, principalmente as do complexo B e os ácidos graxos essenciais, a ausência pode levar à disbiose, devido às carências nutritivas (MACHADO, 2008).

As comunidades de bactérias que acomoda todo o TGI, juntas integra um ecossistema onde microrganismos de espécies distintas atuam em ciclos vitais. Algumas espécies vivem dos produtos gerados pela atividade metabólica das primeiras, e por sua vez beneficiam a proliferação de outras com seus subprodutos (REIG; ANESTO, 2002).

De fato, há uma grande biodiversidade de bactérias colonizadoras do intestino, porém há uma prevalência bastante restrita entre os gêneros, sendo estes: bacteroides, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus*. Existem dois tipos de espécies: as benéficas, como os lactobacilos e a bifidobactérias; e as prejudiciais, como as do gênero *Enterobacteriaceae* e *Clostridium ssp* (VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008)

É universalmente aceito que a microbiota tem um papel importante no desenvolvimento da DII, sendo estes agentes microbianos fazerem parte da patogênese da DII. Alterações qualitativas e quantitativas da microbiota resulta na disbiose, podendo levar à inflamação e lesão do tecido da mucosa, que apresentam relação com infecção por *Clostridium difficile*. (CASH, *et al.*, 2006).

Dentro dos microrganismos benéficos, estão aqueles envolvidos na produção de butirato, como *Faecalibacterium* (KHAN, 2012). Este mesmo microrganismo não está ausente em RCU, podendo torna-se um potencial biomarcador útil para discriminação entre pacientes com DC e RCU. *Fusobacterium* e *Esherichia* são microrganismos abundantes em amostras fecais de pacientes diagnosticados com DC, num entanto, quase ausente em GC e RCU. Quando comparado DC e RCU, a *Collinsella*, mostrou ser discriminante entre os dois subtipos da DII, sendo encontrada principalmente em casos de RCU (PASCAL, *et al.*, 2017).

Em pacientes com DC e RCU, ocorre a diminuição da biodiversidade bacteriana (SOKOL, *et al.*, 2016), o que leva a disbiose – um desequilíbrio na composição – do microbioma intestinal. O Microbioma mais o seu hospedeiro representa o “holobionte” (grego, *holos*, inteiro), o organismo por completo em seu genoma é o “hologenoma” (BORDENSTEIN, 2017). Qualquer mudança no holobionte pode causar impacto significativo a complexa rede de sinalização, influenciando o hologenoma, podendo melhorar a saúde ou levar a doença. (THOMAS, *et al.*, 2017).

3.1.2. Disbiose Intestinal

Qualquer desajuste entre as comunidades de bactérias, pode ocasionar uma desordem na microbiota caracterizado pelo o predomínio de bactérias nocivas sobre as benéficas (SANTOS, 2010). Este distúrbio é conhecido como disbiose intestinal, em que vem sendo considerado objeto de estudo relevante no diagnóstico de doenças como diarreias, letargia, depressão e artrite reumatoide (ALMEIDA, *et al.*, 2009).

O equilíbrio da microflora intestinal é fundamental para a saúde e o bem-estar do corpo humano, qualquer perturbação a este equilíbrio pode proporcionar a proliferação de fungos, bactérias e outros patógenos que são capazes de produzir toxinas metabólicas que são absorvidas pela corrente sanguínea, ocasionando processos inflamatórios (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006).

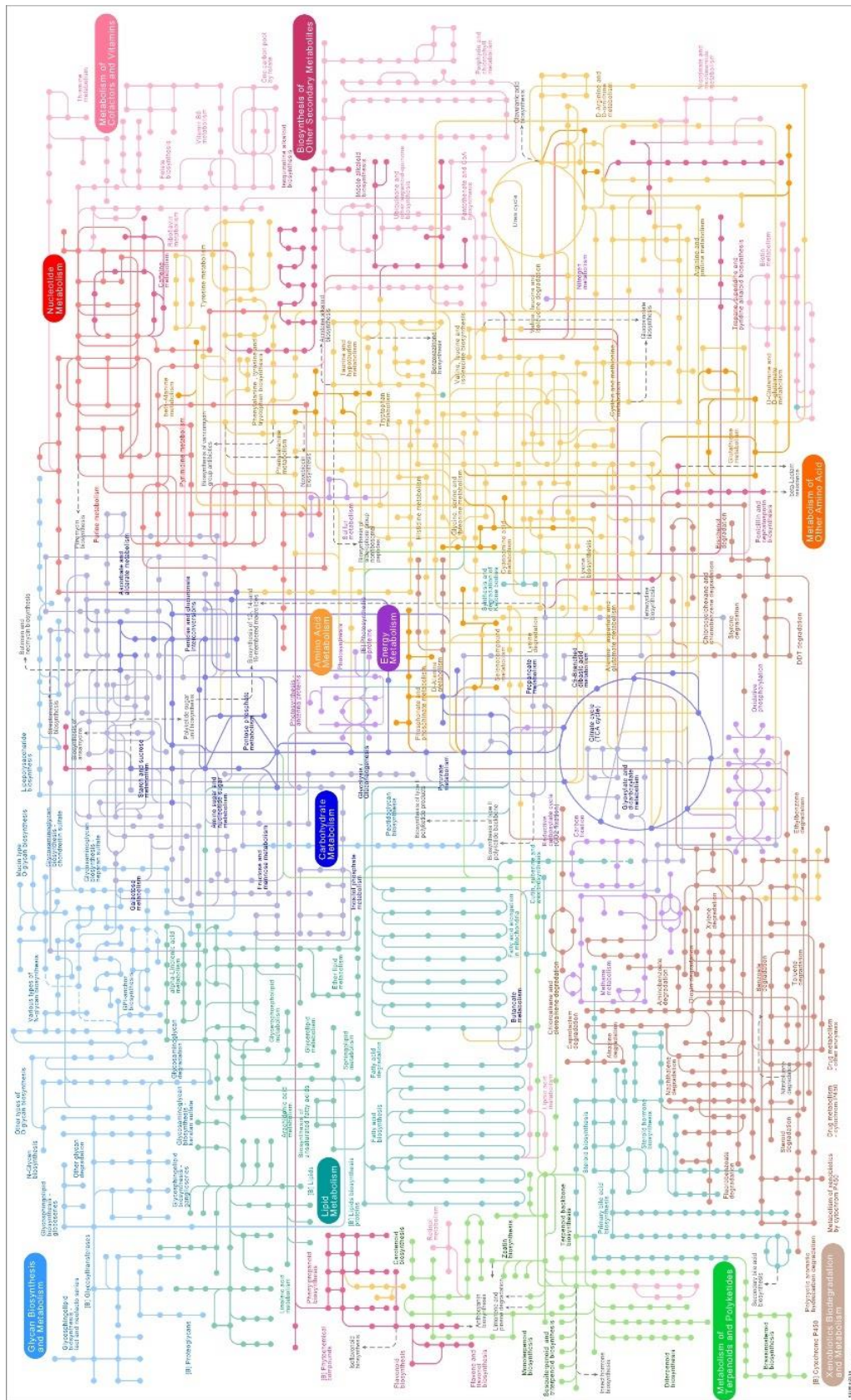
Entre as principais causas está o uso indiscriminado e irracional de fármacos, sobretudo os antibióticos de amplo espectro como, ampicilina, amoxicilina, cefalosporina e clindamicina (ANTUNES, *et al.*, 2007). Outros fármacos envolvidos na causa da disbiose são os anti-inflamatórios hormonais e não-hormonais, e os laxantes (SANTOS, 2010).

A influência do pH é crucial, uma vez que, o estômago não está ácido o bastante para acabar com as bactérias patogênicas. Por produzirem uma quantidade menor que o normal, idosos e pacientes diabéticos estão sujeitos a este tipo de ataque. Estudos recentes mostram que o estresse diminui significativamente a ação do sistema imunológico, facilitando a instalação de microrganismos oportunistas que mandam para o cérebro toxinas que inibem a síntese de serotonina (ALMEIDA, *et al.*, 2009).

3.2. Metabolismo

Quaisquer organismos vivos apresentam, em sua constituição, um sistema estável de reações químicas e de processos físico-químicos mantidos à custa de energia. A forma como obtêm, armazenam e utilizam a energia, e a transformam em precursores adquiridos do meio em compostos característicos de cada organismo são efetuados por uma complexa rede de milhares de reações químicas e constituem o que conhecemos por metabolismo (Figura 1) (BERG, *et al.*, 2002).

Figura 1: Esquema demonstrando a complexidade e mutualidade entre as reações metabólicas dos organismos



Fonte: BERG, et al., 2002

A divisão de reações químicas em locais diferentes pode também influenciar este mecanismo regulatório, uma vez que são reações opostas, como por exemplo, a oxidação dos ácidos graxos, que ocorre na mitocôndria, em oposição à sua síntese no citosol (BERG, *et al.*, 2002).

3.2.1. Metabolismo Intestinal

Elucidar os mecanismos biológicos da microbiota intestinal é um desafio. Estudos em animais mostram evidências de que o microbioma intestinal pode afetar mecanicamente os níveis lipídicos do hospedeiro. É o que acontece com os ácidos biliares produzidos por bactérias anaeróbias no intestino grosso a partir de sais biliares secretados para o intestino. Uma pequena quantidade destes ácidos biliares derivados da bactéria é absorvida na corrente sanguínea e pode modular o metabolismo hepático e/ou mecanismos dos lipídios e glicose através de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (GHAZALPOUR, *et al.*, 2016).

O organismo humano não é capaz de metabolizar muitas formas comuns de carboidratos complexos, por isso, outra forma da microbiota intestinal afetar o metabolismo envolve a fermentação de carboidratos não digeríveis (GHAZALPOUR, *et al.*, 2016). Uma vez ausente este subconjunto de bactérias, o intestino absorve e libera para corrente sanguínea podendo ocasionar um quadro pró-inflamatório.

Os AGCC (Ácidos Graxos de Cadeia Curta), como Acetato, Propionato e Butirato, regulam o equilíbrio imunitário intestinal e servem como fonte de energia para as células epiteliais do cólon. Outro benefício metabólico está intimamente relacionado a gliconeogênese intestinal. Os mesmos também podem ser absorvidos pelo intestino e ter efeitos na sensibilidade à insulina em tecidos metabólicos periféricos através de diferentes GPCRs, como GPR41 e GPR43 (GHAZALPOUR, *et al.*, 2016).

Pesquisas mostram a associação de níveis altos de N-óxido de trimetilamina (TMAO) à aterosclerose tanto em camundongos quanto em humanos (WANG, *et al.*, 2011). O TMAO é um derivado secundário através da oxidação hepática do metabólito trimetilamina (TMA), que é produzido através do metabolismo da colina e da L-carnitina (KOETH, *et al.*, 2013).

Marchesi, *et al.*, (2007) observaram em pacientes com DC a redução do butirato, acetato, metilamina e trimetilamina comparado aos resultados obtidos com GC, assim como

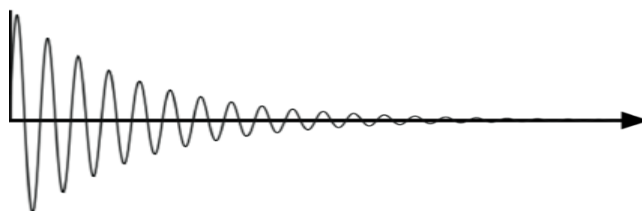
Os resultados de Lin, et al., 2016, apresentaram metabólitos (Figura 2) em vermelho com maior quantidade e metabólitos em azul em menor quantidade quando comparado com os resultados das amostras controle.

3.3. Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é sem dúvida uma das ferramentas mais poderosas e versáteis para a elucidação estrutural de compostos orgânicos. É baseada na aplicação de forte campo magnético e pulsos de radiofrequência ao núcleo dos átomos. Para núcleos com número atômico ou massa atômica ímpar, como ^1H e ^{13}C respectivamente, a presença de um campo magnético externo fará com que estes núcleos possuam um spin, denominado spin nuclear. A absorção da energia gerada pelo pulso de radiofrequência permitirá a promoção de estados de spin de baixa energia para alta energia, e subsequente emissão de energia durante o processo de relaxação é detectada na forma de FID (Free Induction Decay) no domínio do tempo (SILVERSTEIN, 2006).

Desde o surgimento em 1945, a RMN tem passado por grandes transformações, tais como, o desenvolvimento de ímãs supercondutores, que permitiram obter campos magnéticos cada vez mais intensos, a transformada de Fourier que possibilitou o uso da técnica pulsada e com isso acumular FIDs (Figura 3), sondas com gradiente de campo, as quais permitiram melhorar significativamente a qualidade dos experimentos e mais recentemente as sondas criogênicas, que aumentaram muito a sensibilidade da técnica. Todo este desenvolvimento acumulado ao longo do tempo possibilitou ampliar o campo de atuação da RMN, tornando a elucidação estrutural apenas uma das inúmeras aplicações da técnica.

Figura 3: Free Induction Decay - FID



Fonte: Google imagens, 2018

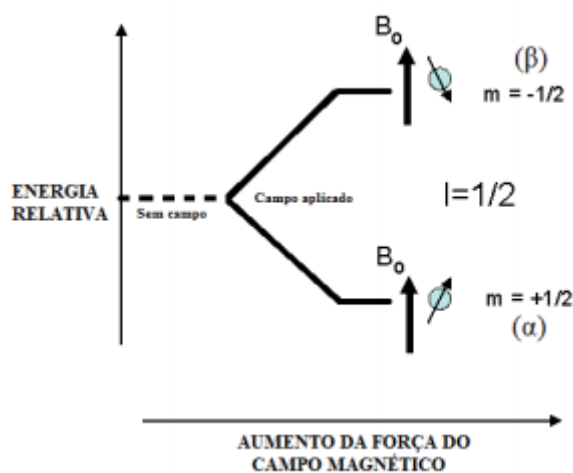
3.3.1. Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear

A RMN é uma técnica de investigação da matéria baseada no conceito de que certos núcleos atômicos são intimamente magnéticos. Somente um número limitado de isótopos apresenta esta propriedade denominada *spin*, dentre os quais destacamos o hidrogênio (^1H), carbono (^{13}C), nitrogênio (^{15}N) e oxigênio (^{17}O) (BERG, *et al.*, 2002).

Em análises de biofluidos, comumente é utilizado o núcleo do próton ^1H . A RMN baseia-se na alteração do eixo de rotação do *spin* deste núcleo quando submetido a um campo magnético. De acordo com o modelo vetorial clássico, o *spin* do núcleo atômico, sob a ação de um campo magnético, gera um momento magnético representado pela soma dos vetores M_0 . Para núcleos como H^1 e C^{13} , o número quântico *spin* (I) pode ter duas orientações (m) para este momento magnético (SANDERS; HUNTER, 1993).

A exposição dos núcleos dos prótons a um campo magnético externo (B_0), faz com que os momentos magnéticos dos núcleos se alinhem com este campo, obtendo $2I + 1$ orientações. O estado α apresenta uma quantidade de energia ligeiramente inferior, portanto, é mais populoso, pelo fato de estar alinhado ao campo. Um próton em *spin* α pode ser elevado ao estado de β através da aplicação de um pulso de radiação eletromagnética (radiofrequência), desde que a frequência corresponda à diferença de energia entre os estados α e β (Figura 4). Para estas condições o *spin* se transformará de α para β , obtendo-se, assim, a ressonância (BERG, *et al.*, 2002).

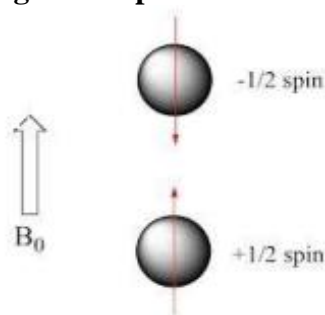
Figura 4: Demonstração esquemática dos spins dos núcleos após aplicação de campo magnético.



Fonte: Google imagens, 2018

A técnica de RMN não observa apenas um único núcleo, mas examina o efeito global gerado por todos os núcleos presentes na amostra do material a ser feito a análise. O vetor magnetização total nunca é nulo (Figura 5), sendo assim possível mensurá-lo através da diferença entre as populações entre os estados energéticos gerados pela distribuição de orientações possíveis (SANDERS; HUNTER, 1993)

Figura 5: Representação das possibilidades de orientação do núcleo em relação ao campo magnético aplicado.



Fonte: Google imagens, 2018

3.3.2. Transformada de Fourier

O resultado obtido pelo equipamento representa a soma dos termos que oscilam com a forma de uma função sinusoidal (Figura 1) da distribuição da densidade dos prótons do volume adquirido. Esta função que varia de acordo com o tempo é transformada em uma nova função variando de acordo com a frequência. Esta transformação é denominada de Transformada de Fourier e permite a decomposição de um sinal diferencial em uma soma infinita de sinusoidais (termos) com frequências, amplitudes e fases diferentes da função inicial (SANDERS; HUNTER, 1993).

3.3.3. Deslocamento Químico

Os núcleos presentes nas amostras que são expostos ao campo magnético da RMN, absorvem a radiação eletromagnética em uma frequência passível de medição. As diferentes frequências, denominadas deslocamentos químicos são expressas em unidades fragmentais δ (deslocamento químico), partes por milhão – ppm, em relação ao deslocamento de um composto padrão (BERG, *et al.*, 2002).

A posição do sinal no espectro da RMN depende da densidade da nuvem eletrônica ao redor do núcleo estudado. A alta densidade de elétrons ao redor dos núcleos atua como uma

blindagem magnética, a qual irá se opor ao campo B_0 . Esta blindagem faz com que o núcleo apresente menor frequência e, portanto, esteja localizado em regiões de menor frequência do espectro. Como exemplo temos um radical $-CH_3$ o qual exibe, comumente, um deslocamento químico de 1.0 ppm, enquanto um próton aromático localiza-se em 7.0 ppm (BERG, *et al.*, 2002).

3.3.4. Aplicação Clínica da RMN 1H

A espectroscopia de RMN tem sido empregada na análise de amostras de tecidos humanos (biopsia) inclusive de carcinomas, tais como os de tireoide, mama, ovário, próstata e tecidos cerebrais, entre outros (HAHN, *et al.*, 1997; IORIO, *et al.*, 2005; MOUNTFORD, *et al.*, 2001; ODUNSI, *et al.*, 2005; RUSSEL, *et al.*, 1994). Por outro lado, a espectroscopia de RMN de alta resolução, principalmente a RMN de 1H aliada a quimiometria, tem sido empregada com sucesso, na análise de amostras de biofluidos (plasma, soro e urina), visando à identificação ou diagnóstico de várias patologias (HOLMES, *et al.*, 2000; LINDON, *et al.*, 2003; SALEK, *et al.*, 2007).

3.4. Análise quimiométrica

A quimiometria, análise quimiométrica ou ainda análise multivariada, é uma das subáreas mais recentes da Química, que tem desenvolvendo diversos modelos matemáticos para a interpretação e análise de dados obtidos pelos diferentes métodos instrumentais disponíveis em laboratório. Este recurso trata do desenvolvimento e a aplicação de métodos estatísticos e matemáticos no planejamento, otimização de procedimentos ou na obtenção de informações químicas através de análise de dados (VOGEL, *et al.*, 2002).

Espectros de RMN de alta resolução de amostras biológicas tais como biofluidos e tecidos, podem ser muito complexos, pois tratando-se de espectros de RMN de 1H , pode conter inúmeros sinais de frequências e assim apresentando sobreposições dos sinais, tornando a mera inspeção visual de tais espectros insuficiente para revelar todas informações. Por isso, tem-se usado métodos estatísticos computadorizados para extrair o máximo de informações de espectros complexos. Por muitos anos métodos estatísticos tem sido aplicados a dados de RMN, no entanto a primeira aplicação real de análise quimiométrica a espectros de RMN na área biomédica foi a classificação de espectros de RMN de 1H de urina de ratos de acordo com o

tipo de órgão alvo da toxina administrada aos animais, provendo um meio não-invasivo de avaliar possíveis drogas tóxicas (LINDON, *et al.*, 2001).

Para extrair informações dos dados de um experimento é preciso a análise de um considerável número de variáveis. Sendo que é comum apenas um pequeno número destas variáveis apresentarem informações relevantes, o que pode resultar em um conjunto de dados repetitivos ou mesmo não desperte interesse para o objetivo do experimento. A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é um dos principais métodos em quimiometria, no qual o objetivo é diminuir o número de dados sem a perda de informações relevantes, de modo a se obter um número menor de novas variáveis – componentes principais – que facilite a elucidação e interpretação dos dados. Por meios de gráficos, o PCA pode fornecer informações de similaridade existentes em um conjunto de dados das amostras analisadas (SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004).

3.4.1. Análise de Componentes Principais

O PCA é um recurso da quimiometria que possibilita a junção de informações relevantes em um número pequeno de novas variáveis, com base em um determinado conjunto de dados (MATOS, *et al.*, 2003). Ao aplicarmos um algoritmo de PCA em um conjunto primitivo de resultados obtidos através da RMN ^1H (variáveis), como por exemplo, o conjunto primitivo destas variáveis é substituído por um novo conjunto de variáveis denominado de Componentes Principais (CPs). A principal característica deste novo conjunto é a ortogonalidade, que está relacionada com a decomposição perfeita entre as variáveis do conjunto primitivo sem sofrer influência significativa em suas principais informações. O relevante deste benefício é o novo conjunto de variáveis que podemos chamar de CPs, que normalmente concentra a maior parte da informação (variância) em poucas variáveis, reduzindo assim a dimensionalidade dos dados, sem perda significativa da informação química. (SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004).

O método de PCA tem sido amplamente utilizado para obtenção de um perfil bioquímico em análises metabolômicas de pacientes diagnosticados com câncer colorretal (LIN, *et al.*, 2016) e para discriminação e identificação de metabólitos presentes em águas fecais na doença inflamatória intestinal (PRETER, *et al.*, 2017).

3.4.2. Análise Discriminante

A aplicação do algoritmo PCA não supervisionado fornece apenas um meio de reduzir as variáveis aos CPs, sua aplicação revela a estrutura do grupo quando a variação intragrupo é necessariamente menor do que a variação entre os grupos (WOLD; SJOSTROM; ERIKSSON, 2001). Logo, recursos supervisionados de análise discriminante, como Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) comumente vem sendo aplicados em dados experimentais. A utilização das variáveis originais, como por exemplo os espectros de RMN ^1H , formam a matriz “X” podendo ser expressa como uma combinação linear específica das componentes principais, logo a aplicação do PLS, em que diferente do PCA é um método supervisionado, é utilizado para o desenvolvimento de modelos de calibração em que uma tabela de dados é fornecida, a matriz “Y”, com valores referentes aos dados fornecidos. Análogo ao PLS, a versão PLS-DA (Análise discriminante de mínimos quadrados parciais) fornece a matriz “Y” formada por apenas uma coluna com informações descritivas identificando as amostras. Se considerarmos dois grupos de amostras distintas – grupo controle e grupo doente – designando as amostras do primeiro grupo de “zero” e as do segundo grupo de “um”, sendo assim separação entre os grupos é melhorada em relação ao PCA, mediante a rotação dos componentes do PCA de maneira a obter o máximo de separação entre os grupos. Dessa maneira tenta encontrar a melhor relação de interdependência entre as matrizes “X” e “Y” utilizando relevantes combinações lineares das variáveis nestas duas matrizes, buscando a parte da variância na matriz “X”, a matriz dos resultados de RMN ^1H , que melhor se encaixa aos dados da matriz “Y” (Manual AMIX, 2008).

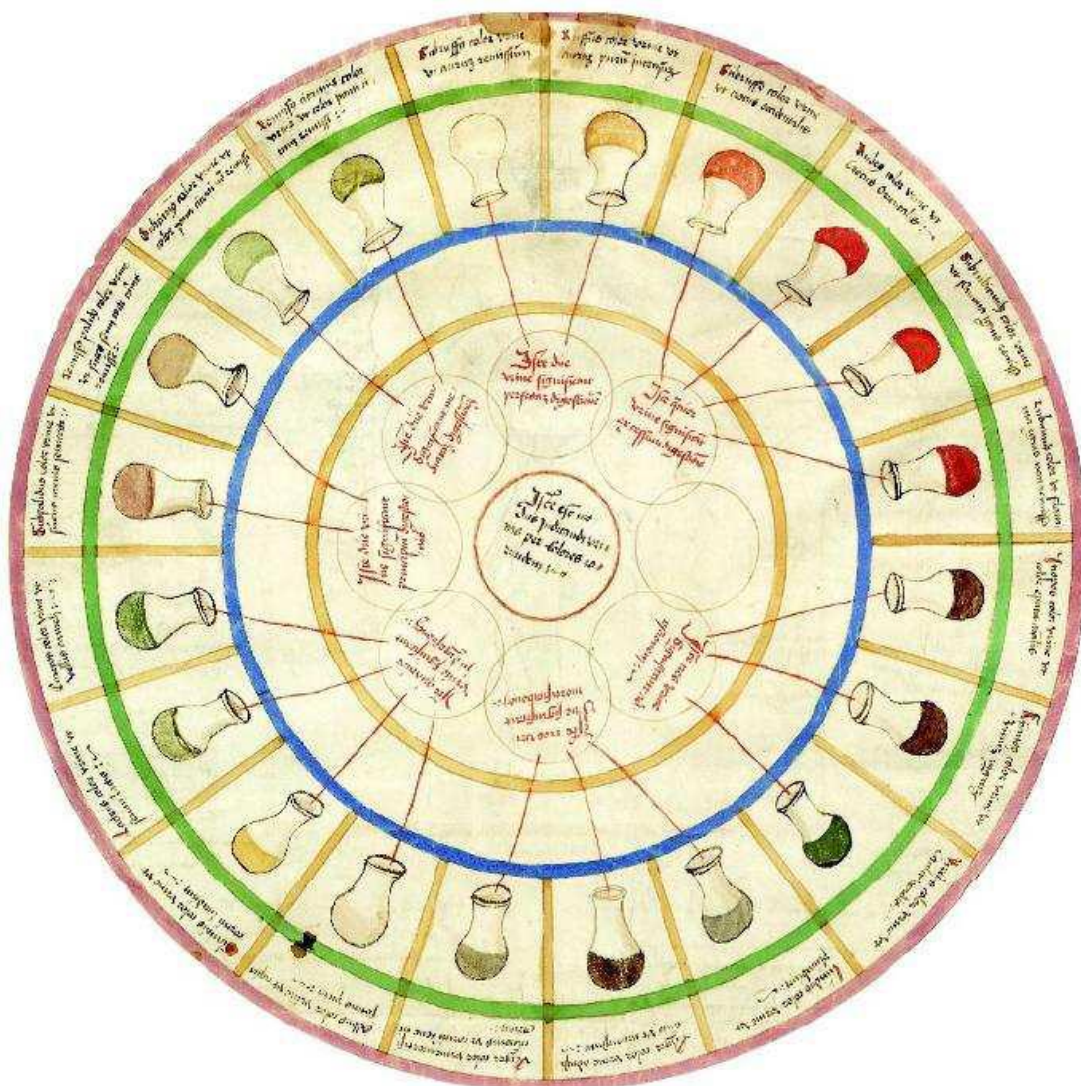
Em 2002, um novo método foi publicado, chamado projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS, do inglês *Orthogonal Projections to Latente Structures*). Em O-PLS, as variáveis são separadas em informações preditivas e sem relação interdependentes, isso leva a análises aprimoradas, além de facilitar a visualização e melhorar a interpretação reduzindo a possibilidade de interpretação enganosa. Da mesma forma, O-PLS-DA (Projeções Ortogonais para Estruturas Latentes – Análise Discriminante) pode ser aplicado quando se trabalha com variáveis discretas, como em estudos de caracterização de biomarcadores (WESTERHUIS, *et al.*, 2009).

3.5. Análise Metabolômica

Desde a Grécia antiga há o conceito sobre o surgimento e desenvolvimento de uma patologia pode provocar alterações de um ou mais metabólitos na composição química dos tecidos e/ou biofluidos. Ainda na idade média, foi utilizado os Cartões de urina (Figura 6) que,

correlacionavam cores, odores e gostos da urina com condições médicas. Na realidade tais alterações eram de origem metabólica. É por meio da metabolômica que é possível realizar análises das amostras biológicas e assim compreender os distúrbios metabólicos e definir a patologia (NICHOLSON; LINDON, 2008).

Figura 6: ‘Cartão de urina’ publicado em 1506 por Ullrich Pinder no seu livro Epiphanie Medicorum. Relaciona cores, odores e gostos da urina com diagnósticos de doenças



Fonte: Nicholson e Lindon, 2008.

A metabolômica é definida como uma análise abrangente de todos os metabolitos num sistema biológico – o metaboloma – com a sua identificação e quantificação, sendo que o conteúdo de informações é incrivelmente alto que o torna um desafio de formar, eficientemente conclusões biologicamente relevantes a partir de um conjunto de dados. Este tipo de análise

envolve a combinação de dados experimentais com análise multivariada (MVA, do inglês *Multivariate Analysis*) como métodos PCA, PLS e O-PLS-DA, em que características espectrais podem ser amplamente interpretadas (WORLEY; POWERS, 2013).

Estratégias metabolômicas baseadas em dados obtidos através da espectroscopia de RMN de amostras de biofluidos ou tecidos podem atuar como perfis de diagnóstico, uma vez que geram compreensíveis *fingerprints* ou perfis bioquímicos característicos de metabólitos de baixa massa molecular. Em uma amostra de biofluido típica, todas as moléculas que contêm em sua estrutura átomos de hidrogênio, o que inclui aproximadamente todos os metabólitos, darão um espectro de RMN de ^1H . O espectro de RMN será, portanto, a superposição dos espectros de todos os metabólitos presentes no fluido, definindo o perfil característico da amostra. Uma vantagem é que estes perfis podem ser obtidos com o mínimo de preparo de amostra, dispensando assim a necessidade de laboriosos processos de extração e/ou purificação, consumidores de tempo e reagentes (NICHOLSON *et al.*, 1999; SUMNER *et al.*, 2003).

Entender e compreender a expressão fenotípica é de extrema importância para a elucidação de uma patologia, a análise metabolômica tem por alvo o metaboloma para a descrição analítica de amostras biológicas complexas, incluindo a caracterização e quantificação de todos os metabólitos presentes nas amostras, gerando assim um perfil bioquímico (NICHOLSON; LINDON, 2008).

Os componentes do metaboloma podem ser definidos como o conjunto de todos os metabólitos em um organismo biológico que são os produtos de sua expressão gênica, o processo pelo qual a informação contida em um gene é processada num produto gênico, tal como proteínas e RNA, e definem o fenótipo, ou as características observáveis, de uma célula ou tecido. A análise qualitativa e quantitativa de uma amostra biológica promove uma visão abrangente da situação fisiopatológica do perfil bioquímico de um organismo, podendo ser usado para monitorar a saúde (WECKWERTH, 2003).

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção das amostras de fezes

As amostras de fezes foram todas obtidas no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes – HUPAA por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.), como segue o ANEXO I, e foram submetidos ao questionário Protocolo de Pesquisa (ANEXO II).

Os pacientes foram recrutados no ambulatório de Gastroenterologia da seção médica do HUPAA, Maceió – Alagoas. Todos os pacientes de DC e RCU convocados subsequentemente tiveram seu diagnóstico verificado por critérios clínicos e laboratoriais. Para a criação do GC, foi utilizado como critério de classificação a ausência de qualquer enfermidade clínica e laboratorial presente no TGI e qualquer distúrbio neurológico (BJERRUM, 2015).

4.2. Preparação de amostras

As amostras fecais coletadas, foram colocadas em um recipiente de isopor com gelo e posteriormente, entregue ao laboratório onde foi realizado o processo de obtenção de águas fecais. Experiências anteriores (BEZABEH, et al., 2009) usando amostras cruas não extraídas resultaram em espectros de baixa resolução, enquanto Merchesi, et al. (2007) e Jacobs, et al. (2008) obtiveram excelentes resultados com águas fecais e um pH acima de 7.

As águas fecais foram extraídas dentro de uma capela microbiológica em um almofariz no qual foi adicionado nitrogênio líquido e trituradas com o pistilo até a sua homogeneização total. Assim o material é transferido para um eppendorf no qual em seguida é submetido a centrifugação por 15 minutos a 14000 rotações por minuto (RPM). Assim, com auxílio de uma micropipeta 350µL (microlitro) das águas fecais foram coletadas e finalmente adicionadas a uma mistura preparada em um tubo de RMN, com 50µL de D₂O e 350µL de tampão fosfato com 3-trimetilsilil-2,2,3,3-propionato-d₄ de sódio (TSP) a um pH (potencial Hidrogeniônico) de 7,44 (0.31g de NaH₂PO₄.H₂O, 1.09g de Na₂HPO₄ (anidro), 0.1L de água destilada e 0.1mM (0.0172g) de TSP).

4.3. Espectroscopia RMN ¹H

Todos os experimentos de RMN ¹H foram realizados a 298,15 K (Kelvin), usando um espectrômetro Bruker de 400 MHz (Megahertz) do laboratório Núcleo de Análises e Pesquisa

em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN). Os espectros foram adquiridos com 64K pontos, 128 transientes (*scans*) com a largura espectral de 10,5 ppm e supressão do sinal da água utilizando-se a sequência de pulsos *noesypr1d*, com tempo de relaxação de 2 segundos (s) e tempo de mistura de 100 milissegundo (ms). Os resultados foram processados no programa TOPSPIN com 64K pontos aplicando-se uma multiplicação exponencial Livre Decaimento por Indução (FID, do inglês *Free Induction Decay*) por um fator de 0,3 Hz. Os deslocamentos químicos (δ) foram calibrados em relação ao sinal do TSP a 0,0 ppm.

4.4. Análise dos dados

Todos os espectros unidimensionais de RMN ^1H foram corrigidos manualmente para distorções de fase e de linha de base utilizando o programa TOPSPIN 3.5 e referenciados ao sinal do TSP a 0,0 ppm. Com auxílio do programa MATLAB v13.1 o sinal da água 4.8 ppm foi removido de todos os espectros para análise multivariada (MVA), pois embora tenha sido realizado a supressão o sinal persistiu em aparecer.

Os espectros de RMN ^1H foram normalizados para o total da soma das integrais dos espectros, compensando as diferenças de concentração das amostras. A seguir, as análises quimiométricas foram realizadas utilizando o pacote de software MATLAB. Inicialmente foi realizada a análise PCA dos dados espectrais de RMN ^1H para visualizar a estrutura geral do conjunto de dados e assim identificar qualquer anormalidade (com base nos princípios de Hotelling T^2) e assim obter as componentes principais (PCs). Em seguida, para facilitar a interpretação do modelo obtido, foi realizada uma análise supervisionada para discriminação dos perfis bioquímicos de cada grupo em questão. Para validar e evitar o risco de ajuste excessivo do modelo O-PLS-DA, foi utilizada um Validação Cruzada de 10 vezes, ou seja, a construção iterativa de modelos, excluindo repetidamente um décimo das amostras, e prevendo-as de volta ao modelo. Este procedimento resulta em um parâmetro de validação cruzada, indicando a previsibilidade do modelo em relação à sua validade estatística. Um teste final de significância foi realizado com o uso da Análise de Variância, ANOVA ($p < 0,05$). Os metabólitos responsáveis pela diferença entre os perfis bioquímicos de cada grupo, indicando pesos variáveis discriminatórios, apresentam cor quente (vermelho) e correspondendo a nenhuma diferença entre os grupos a cor fria (azul) (Eriksson, *et al.*, 2008).

4.5. FLUXOGRAMA – METODOLOGIA

Figura 7: Emoji - Fezes



Fonte: WhatsApp Messenger, 2018



Figura 8: Almofariz e Pistilo



Fonte: Google Imagens, 2018



Figura 9: Eppendorf

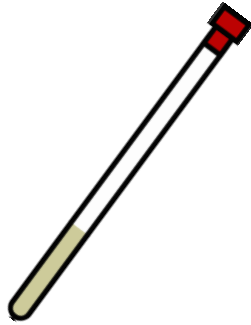


Fonte: Google imagens, 2018

As amostras de fezes foram coletadas de pacientes com DC, RCU e voluntários que não apresentam nenhuma enfermidade no TGI, através do TCLE (ANEXO I) e o Protocolo de Pesquisa (ANEXO II), no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes – HUPAA.

As extrações dos metabólitos foram efetuadas em almofariz, no qual as amostras são adicionadas com **nitrogênio líquido**, e trituradas com o pistilo, até a sua homogeneização total.

Após a realização da extração, as amostras foram armazenadas em eppendorfs, em seguida foram submetidas a centrifugação por 15min a 14krpm.

Figura 10: Tubo de RMN

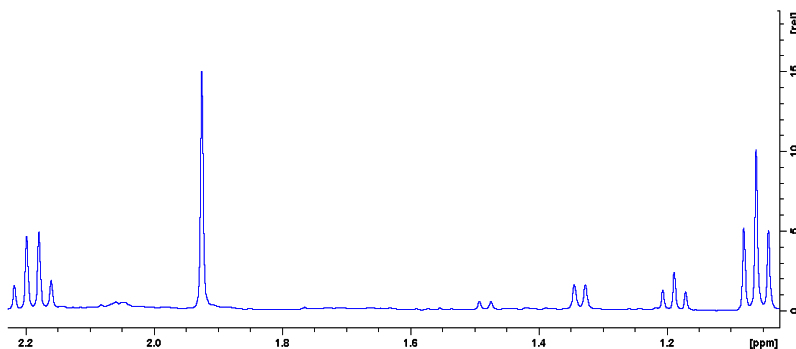
Com o auxílio de uma micropipeta foram adicionados em um tubo de **RMN** 350µl de águas fecais com 350µl de tampão mais 50µl de D₂O.

Fonte: Google imagens, 2018

**Figura 11: RMN Bruker**

Os tubos de RMN, foram submetidos a análise de RMN ¹H 400Mhz com supressão do sinal da água.

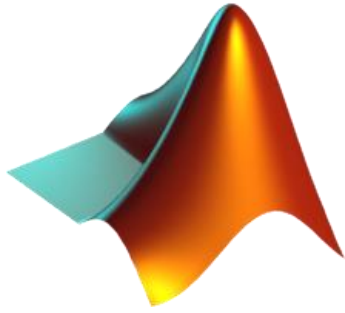
Fonte: Google imagens, 2018

**Figura 12: Espectro de RMN ¹H**

Os espectros obtidos foram processados e analisados no software TopSpin™ e os sinais dos metabólitos foram identificados com o auxílio da biblioteca de sinais do CHENOMX™ em modo de avaliação e a literatura científica.

Fonte: Próprio autor , 2017.

Figura 13: MATLAB v13.1



Fonte: Google imagens, 2018.

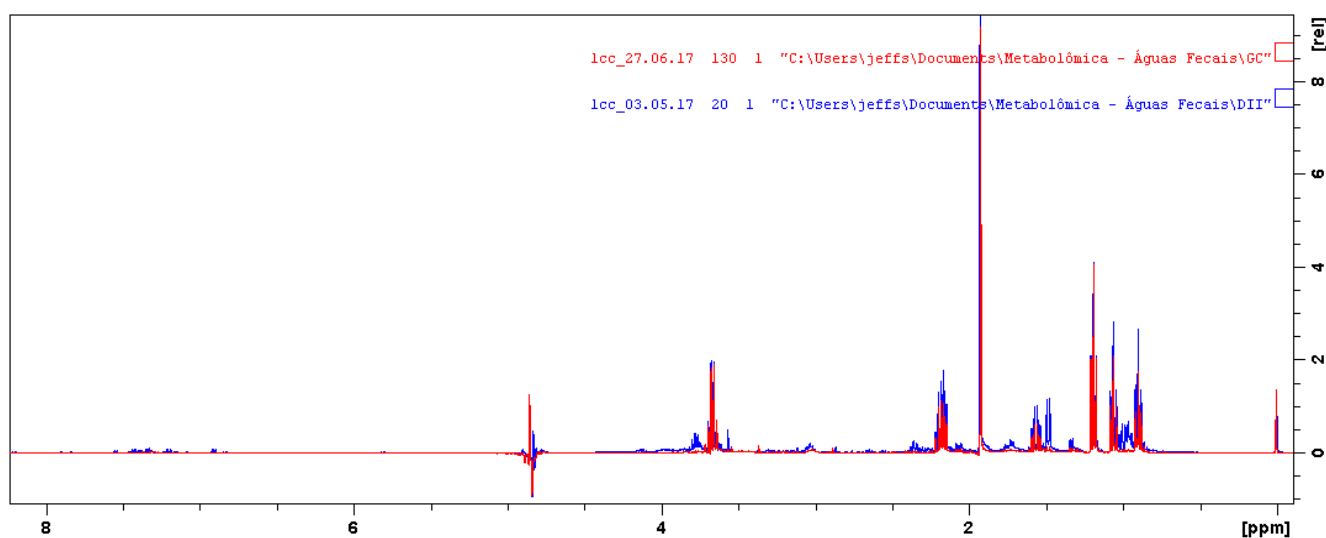
Para compreender e extrair o máximo de informações possíveis, foi aplicado recursos como OPLS-DA, ANOVA ($p < 0,05$) e validação cruzada por meio do MATLAB v13.1 para a discriminação entre os grupos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.2. Investigação dos espectros de RMN ^1H

A análise visual dos espectros de RMN ^1H de águas fecais não permitiu identificar sinais que diferenciem de maneira comprovada as amostras do GC com RCU e DC, o que é exemplificado com as figuras 14 e 15, nas quais se comparam espectros de RMN ^1H por meio da exibição múltipla dos mesmos. Também não é possível perceber visualmente um padrão de diferenças entre os espectros dos dois conjuntos (GC vs RCU e GC vs RCU). Assim tornou-se essencial a análise quimiométrica para identificar os metabolitos discriminantes entre as amostras sadia e doente.

Figura 14: Comparação dos espectros de RMN ^1H de 400MHz das amostras do GC e RCU

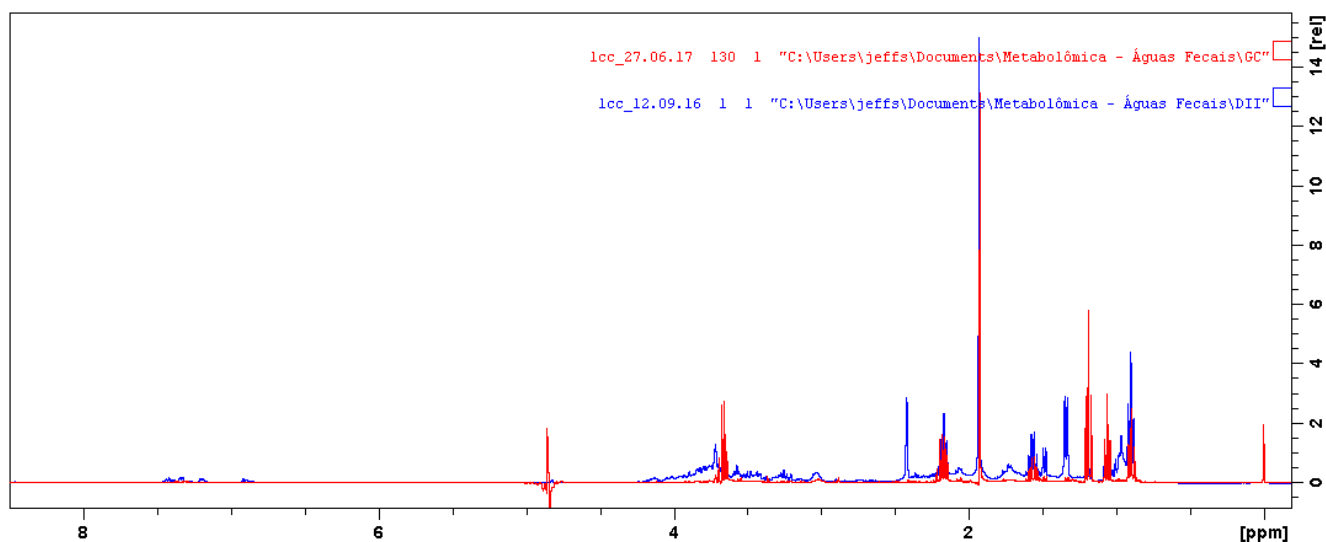


Fonte: Próprio autor, 2017

Azul: Espectro de RMN ^1H de amostras de pacientes com RCU

Vermelho: Espectro de RMN ^1H de amostras do GC

Figura 15: Comparação dos espectros de RMN ^1H de 400MHz das amostras do GC e DC



Fonte: Próprio autor, 2017

Azul: Espectro de RMN ^1H de amostras de pacientes DC

Vermelho: Espectro de RMN ^1H de amostras do GC

5.2. Identificação dos sinais nos espectros de RMN ^1H

Os espectros de RMN ^1H obtidos a partir das amostras fecais dos pacientes diagnosticados com DC e RCU e pertencentes ao GC apresentaram os sinais concentrados na região de δ 0,5 a 4,5, dificultando a identificação dos sinais devido a sobreposição. A região do sinal da água não foi considerada, uma vez que a sequência de pulsos utilizada foi *noesypr1d* com supressão do sinal da água. A região referente aos sinais de hidrogênios aromáticos, δ 6,0 a 9,0, apresentou sinais com baixa intensidade, sendo então insuficiente para identificar os sinais e distinguir cada um deles, tornou-se necessário a utilização de recursos como a quimiometria.

Os primeiros sinais atribuídos foram em relação aos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), como Acetato, Butirato e Propionato. A atribuição dos sinais encontra-se na Tabela 1, identificados com a biblioteca de metabolitos obtida através da Imperial College London e a utilização do CHENOMXTM no modo de avaliação.

Tabela 1: Deslocamento químico dos metabólitos identificados

Nome Molecular	Deslocamento Químico	Multiplicidade
Acetato	1,92	Singlete

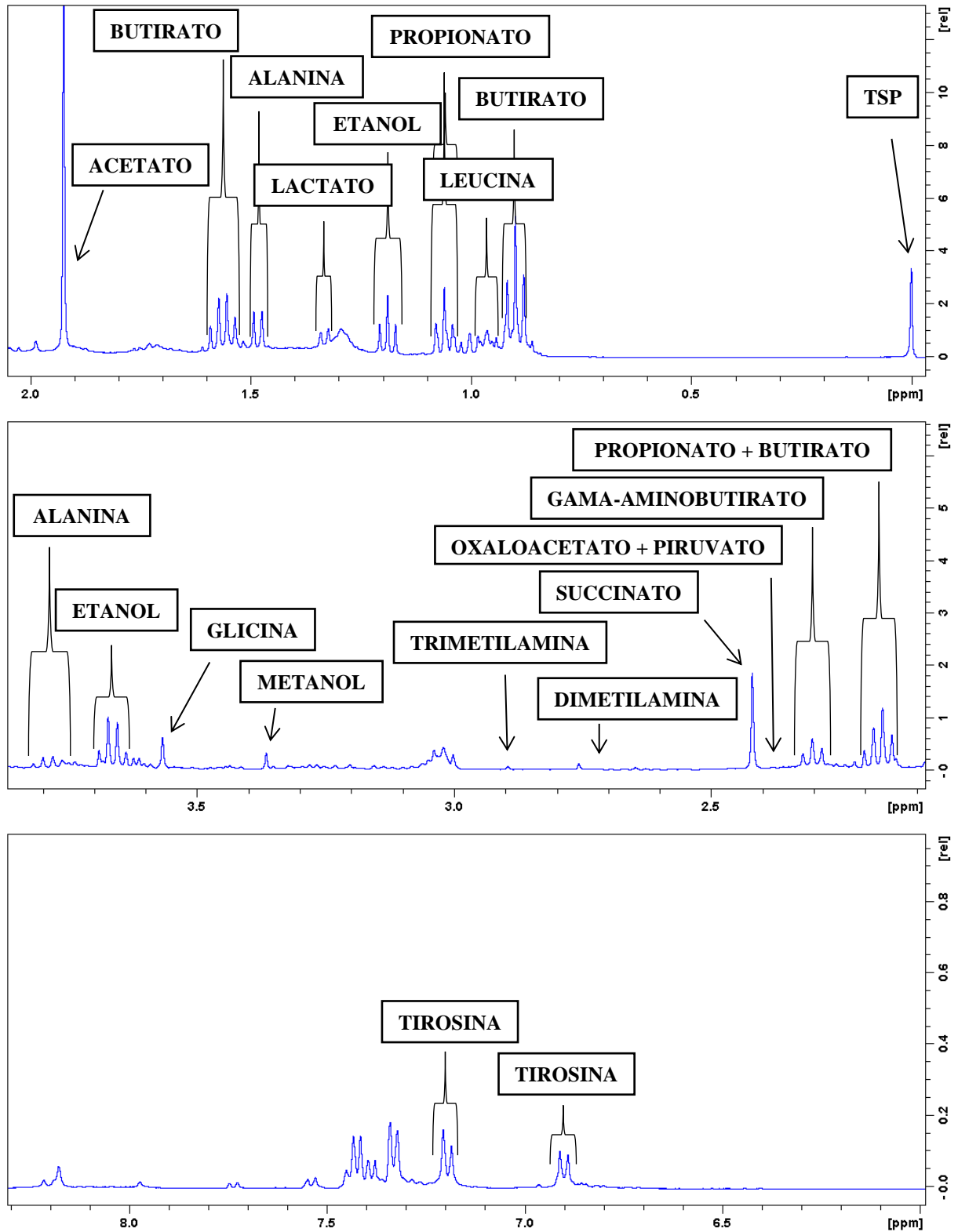
Alanina	1,48	Dupleto
Alanina	3,76	Quarteto
Butirato	0,90	Tripleto
Butirato	1,56	Dupleto
Butirato	2,16	Tripleto
Dimetilamina	2,72	Singleto
Etanol	1,19	Tripleto
Etanol	3,66	Quarteto
Gama-AminoButirato	2,30	Tripleto
Glicina	3,56	Singleto
Lactato	1,33	Dupleto
Lactato	4,12	Quarteto
Leucina	0,96	Tripleto
Leucina	1,71	Multipleteo
Leucina	3,73	Tripleto
Metanol	3,36	Singleto
Oxaloacetato	2,38	Singleto
Piruvato	2,38	Singleto
Propionato	1,06	Tripleto
Succinato	2,41	Singleto
Tirosina	6,91	Dupleto
Tirosina	7,2	Dupleto
Trimetilamina	2,89	Singleto

Os sinais dupleto com grande intensidade em δ 1,33 e o quarteto com baixa intensidade em δ 4,12 foram atribuídos ao Lactato, pois apresentam a constante de acoplamento (J) igual a 7,01 Hz, correlação entre os sinais.

Embora a Leucina apresente sinais em três regiões diferentes no espectro, a mera inspeção visual com a utilização de recursos do TopSpinTM, como integração do sinal e o J não foram suficientes para identificação de seu sinal, sendo possível apenas com a quimiometria.

Os metabolitos encontrados estão de acordo com a literatura, uma vez que aminoácidos intermediários do Ciclo de Krebs e AGCC foram identificados em amostras de águas fecais (SMIRNOV, *et al.* 2016). A Figura 16 mostra os metabolitos identificados na Tabela 1.

Figura 16: Espectro de RMN ^1H de 400MHz das amostras fecais dividido em 3 partes, sendo δ 0,00 a 2,00; δ 2,10 a 3,90; δ 6,00 a 8,30.



Fonte: Próprio autor, 2017.

Devido à complexidade dos resultados alguns sinais ainda não foram elucidados.

5.3. Quimiometria

Para discriminação das amostras por meio da criação de grupos, no qual possa ser possível a obtenção de informações verdadeiras para a interpretação, tornou-se vital o processamento da análise estatística multivariada como PCA, O-PLS-DA, ANOVA ($p < 0,05$) e Validação Cruzada no sentido de extrair o máximo de informações genuínas.

5.3.1. Pré-processamento dos dados

Em análises quimiométricas é preciso que as variáveis estejam em função apenas da composição química das amostras, sendo necessário o ajuste de fatores que possam interferir antes de iniciar a análise. O ajuste da linha de base dos espectros, que deve ser a mesma para todos os resultados, evitando assim imprecisões que podem gerar conclusões incoerentes, especificamente como falsos positivos e falsos negativos. Outro fator é a calibração de todos os espectros em relação ao sinal de referência, neste caso o sinal do TSP em δ 0,0 evitando assim variações nos deslocamentos químicos de um mesmo sinal em diferentes espectros.

5.3.2. PCA

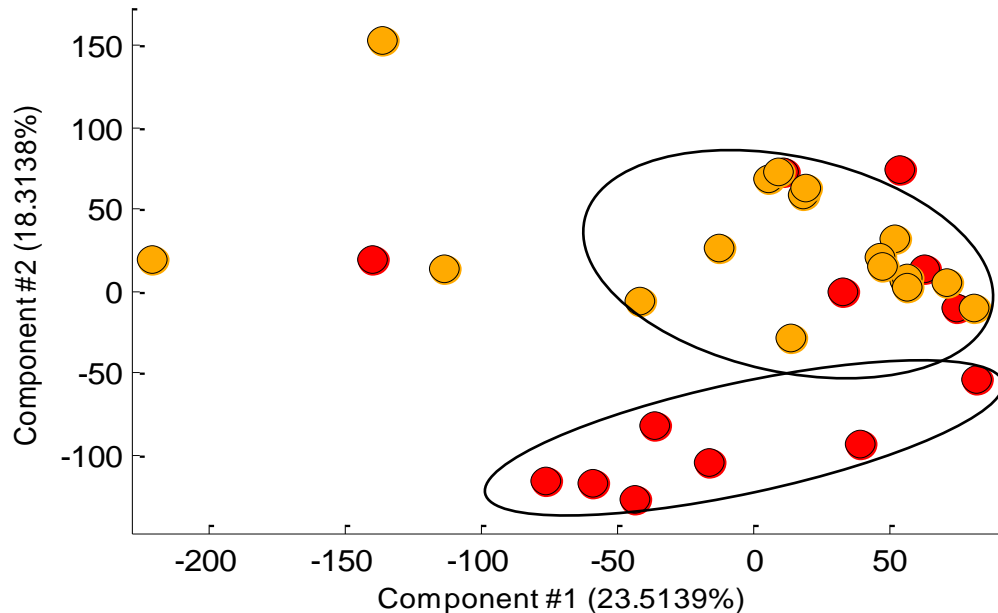
Inicialmente foi utilizado como método de classificação das amostras ou reconhecimento de padrões, a PCA, estratégia não supervisionada. Com PCA é possível realizar a classificação dos resultados e identificar o resultado com comportamento irregular, denominados *outliers*, e assim definir as PCs (Manual AMIX, 2008). A presença de *outliers*, deve ser investigada antes mesmo de sua retirada do modelo, identificar os fatores que levaram àquele resultado, como por exemplo, preparo inadequado, contaminação da amostra, pré-processamento heterogêneo do resultado em questão ou mesmo a presença de outro tipo de enfermidade nos pacientes com DC e RCU.

5.3.2.1. PCA GC vs DC

Através deste recurso matemático foi possível a criação de grupos distintos de indivíduos, bem como avaliar a variação dos metabólitos de toda extensão do espectro de RMN ^1H em relação aos grupos em questão. A Figura 17 mostra a PCA para primeira e segunda componentes. Com isso, observa-se a clara separação entre os GC (elipse de baixo) com valores

para PC2 negativos e pacientes diagnosticados com DC (elipse de cima) com valores para PC2 positivos.

Figura 17: Análise do Componente Principal de 30 amostras de águas fecais (GC vs DC) de acordo com PC1 e PC2

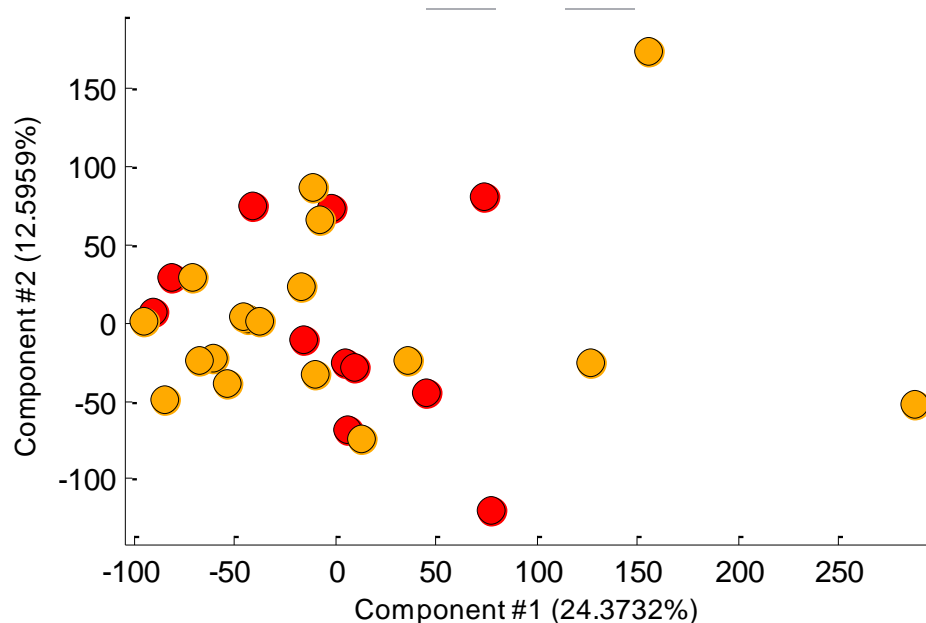


Fonte: Próprio autor, 2017
 Vermelho: Grupo Controle
 Laranja: Doença de Crohn

5.3.2.2. PCA GC vs RCU

A criação de grupos distintos entre GC vs RCU não se demonstrou tão eficaz quanto GC vs DC, uma vez que não foi possível através do PCA (Figura 18) a descoberta de uma variação nos metabólitos presentes nas amostras fecais. Na Figura 21 é possível observar por meio da PC1 que quase não há diferença entre os perfis metabólicos dos grupos GC e RCU.

Figura 18: Análise do Componente Principal de 28 amostras de águas fecais (GC vs RCU) de acordo com PC1 e PC2



Fonte: Próprio autor, 2017
 Vermelho: Grupo Controle
 Laranja: RetoColite Ulcerativa

5.3.3. O-PLS-DA

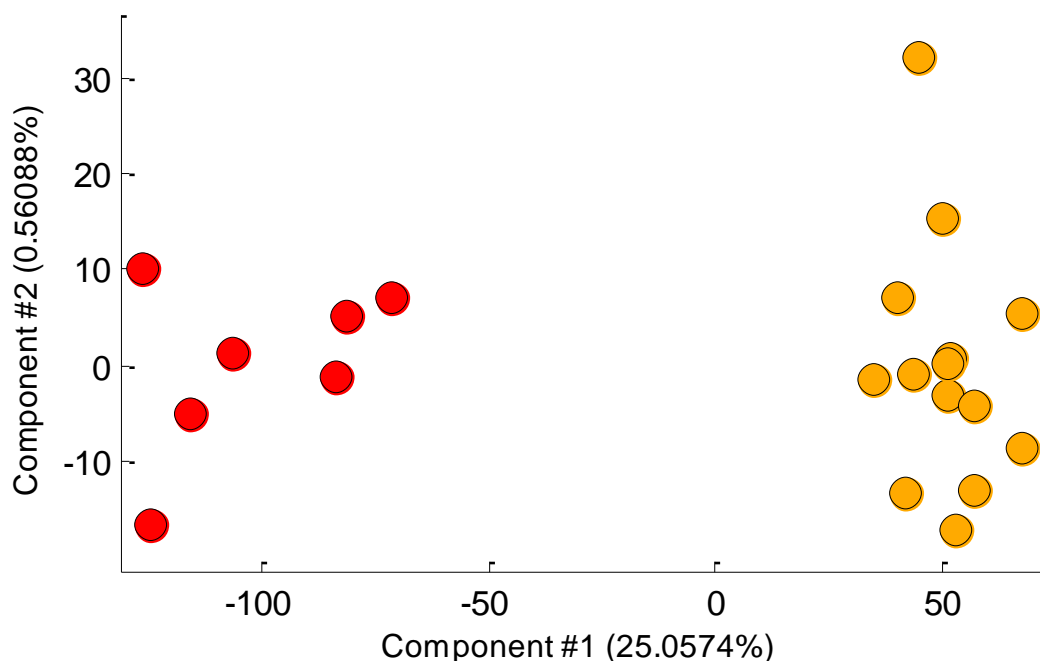
Ao contrário do método PCA, a O-PLS-DA é um método supervisionado que utiliza às PCs como variáveis latentes (VL). O número de VL deve ser o suficiente para explicar a maior parte da variância gerada pelos resultados. O-OPLS é baseado em um método de reconhecimento de padrões que reduz numerosas variáveis colineares (metabólitos) para alguns subconjuntos para demonstrar sua interdependência. A análise discriminante de O-PLS (DA) maximiza a independência das variáveis, resultando em uma melhor separação dos dados entre os grupos e, portanto, na melhor discriminação entre os GC, DC e RCU.

Para ratificar o número de PCs, foi realizado o teste de Validação Cruzada *leave-on-out* que consiste na retirada de uma amostra aleatoriamente do conjunto de dados, e um novo modelo é desenvolvido com as amostras (n - 1) restantes, chamadas de calibração. A amostra retirada é então testada como uma primeira validação do modelo criado.

5.3.3.1. O-PLS-DA GC vs DC

Os resultados da O-PLS-DA entre os grupos GC e DC (Figura 19), mostraram que os grupos estão bem definidos, uma vez que a component #2 (diferença entre os espectros de RMN ^1H do mesmo grupo) é de apenas 0,56088%. Isto pode ser explicado pelo fato de apresentarem metabolismo semelhante, levando-se em conta que fatores como a dieta e hábitos do cotidiano são diferentes de indivíduo para indivíduo. A componente #1 (diferença entre os conjuntos gerados pelos espectros de RMN ^1H – GC e DC –) é de 25.0574%, demonstrando que há diferença significativa no metabolismo entre os grupos, uma vez que pacientes com DC apresentam distúrbios metabólicos apresentados pela disbiose intestinal.

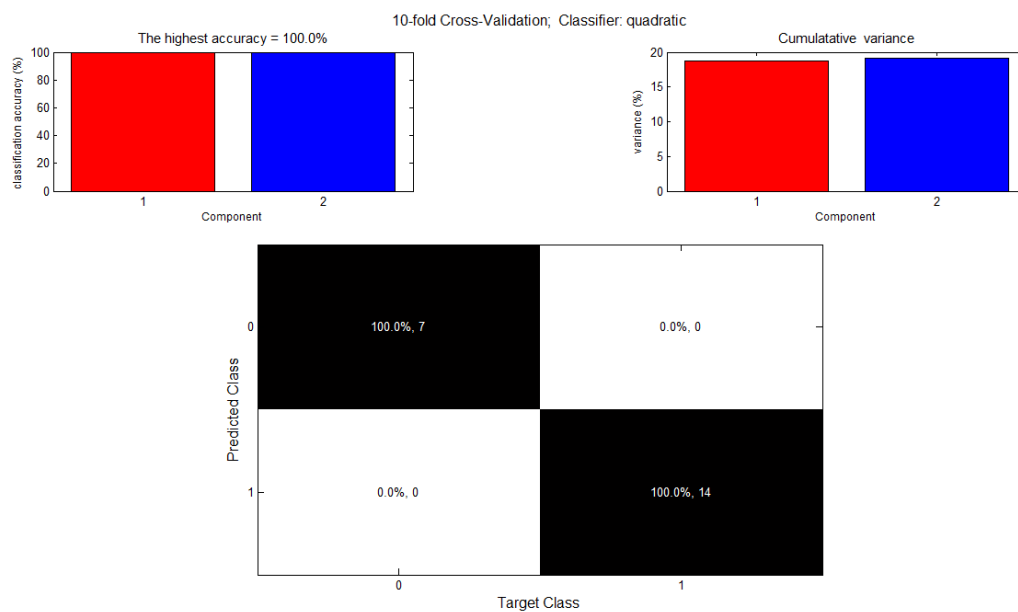
Figura 19: OPLS-DA GC vs DC



Fonte: Próprio autor, 2017
 Vermelho: Grupo Controle
 Laranja: Doença de Crohn

Os resultados foram validados por meio da Validação Cruzada (Figura 20), mostrando uma precisão de 100.0% do resultado, no qual 100.0% das amostras do GC estão bem classificadas assim como as amostras dos pacientes com DC mostraram 100.0% de classificação.

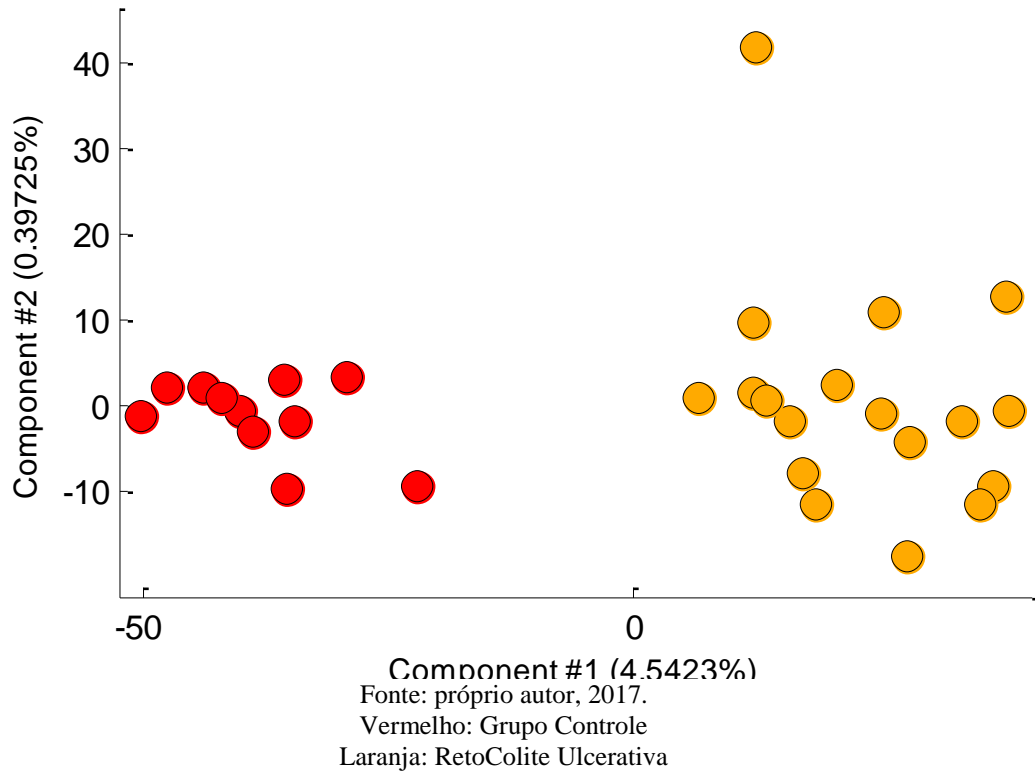
Figura 20 Validação Cruzada - GC vs DC -



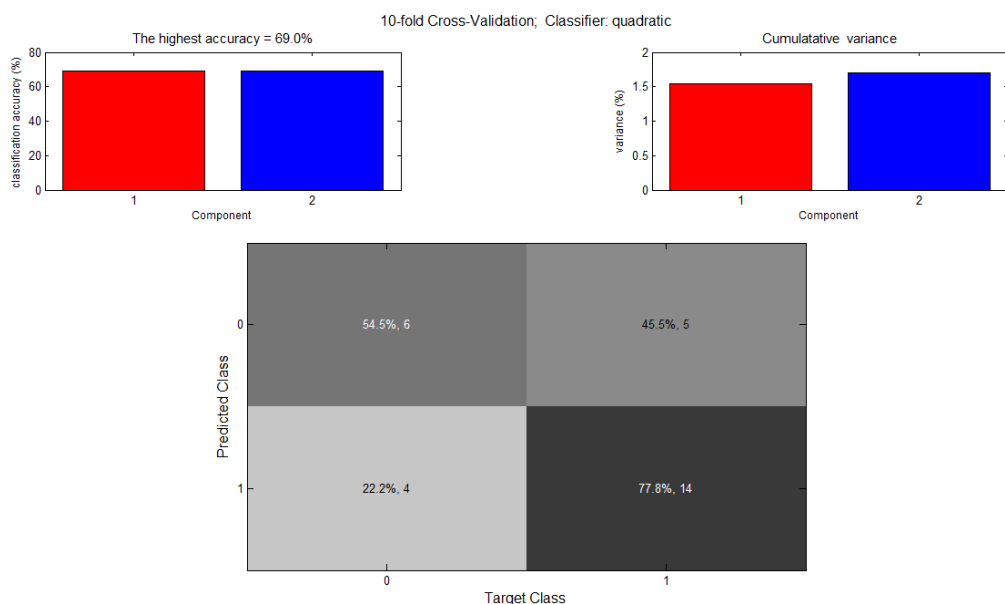
Fonte: Próprio autor, 2017.

5.3.3.2. OPLS-DA GC vs RCU

Os resultados da O-PLS-DA entre GC e RCU (Figura 21) apresentaram homogeneidade entre os espectros de RMN ^1H do mesmo grupo, com o valor da componente #2 igual 0,39725%, porem a Componente #1 com 4,5423% não demonstrou uma diferença significativa entre os grupos como GC vs DC. Vale ressaltar que a DC expressa um estado clinico mais grave que a RCU, por tanto o distúrbio metabólico deve ser mais acentuado em DC, o que significa uma maior diferença no metabolismo GC vs DC do que em GC vs RCU.

Figura 21: OPLS-DA GC vs RCU

Por meio da Validação Cruzada (Figura 22) os resultados foram validados e mostraram precisão de 69.0%, de modo que, das 11 amostras do GC, 6 (54,5%) estão bem classificadas, mas 5 (45,5%) apresentam semelhança com a RCU. Entre 18 amostras diagnosticadas como RCU, 14 (77,8%) estão bem definidas como RCU e 4 (22,2%) não estão bem grupadas.

Figura 22: Validação Cruzada - GC e RCU -

Fonte: Próprio autor, 2017.

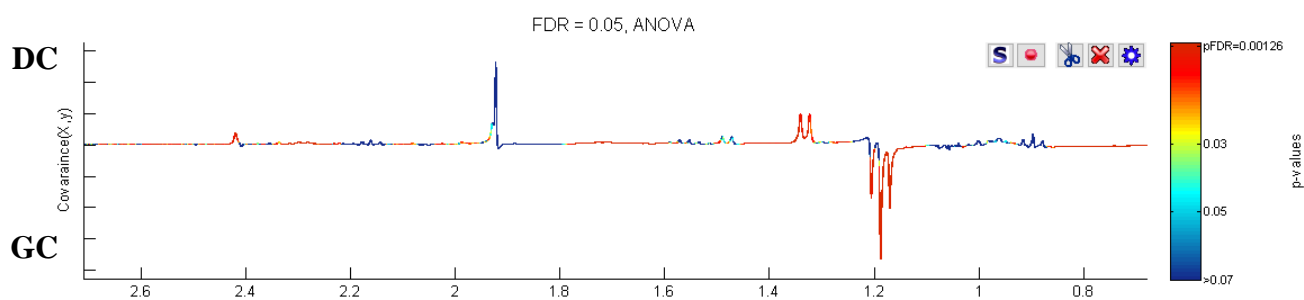
5.3.4. ANOVA ($p < 0,05$)

A utilização desse método univariado serviu para reduzir o número possivelmente grande de metabólitos investigados para apenas aqueles que mostram a resposta mais forte sob as condições investigadas, ou seja, examinar apenas aqueles metabólitos que discriminam os grupos (ERIKSSON, *et al.*, 2008).

5.3.4.1. ANOVA ($p < 0,05$) GC vs DC

Por meio da análise de variância, foi possível identificar quais metabólitos discriminam (cor vermelha) as amostras do GC da DC (Figura 23), sendo eles Lactato δ 1,33 $p=0.0050338$ e Succinato δ 2.41 $p=0.0020639$ que apresentam covariância positiva para Doença de Crohn com forte correlação para discriminação da doença, um dado importante é o sinal do Etanol δ 1.19 $p=0.00011198$ com cor vermelha e covariância positiva para o Grupo Controle, isto é, apresenta maior quantidade no GC a ponto de discrimina-lo da DC. É possível ver na Tabela 2 os metabólitos discriminantes e seus respectivos valores de “p” menores que 0.05.

Figura 23: ANOVA ($p < 0.05$) GC vs DC



Fonte: Próprio autor, 2017

Tabela 2: Metabólitos discriminantes entre os grupos GC vs DC obtidos após o teste de ANOVA ($p < 0.05$)

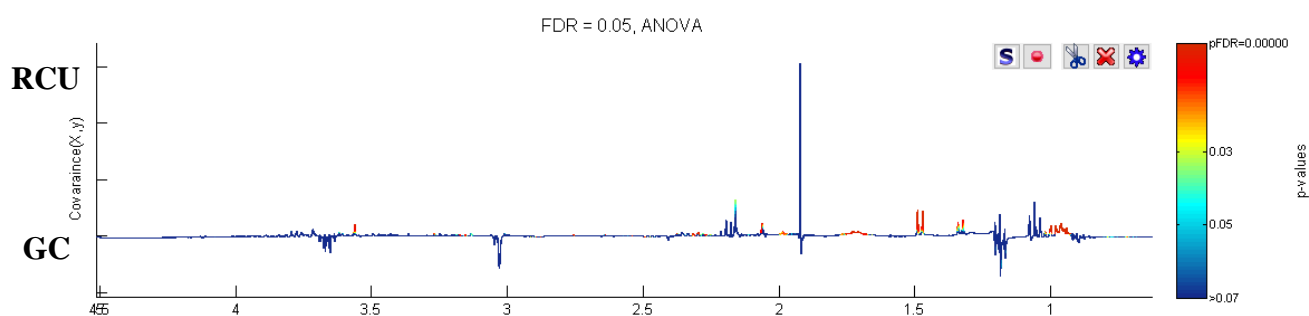
Metabólito	GC	DC
Lactato	–	$p=0.0050338$
Alanina	–	$p=0,001$
Succinato	–	$p=0.0020639$
Tirosina	–	$p=0,002$

Etanol	p=0.00011198	–
--------	--------------	---

5.3.4.2. ANOVA (p<0.05) GC vs RCU

Os metabólitos discriminantes da Retocolite Ulcerativa com Grupo Controle (Figura 24) são Leucina δ 0.96 p=0.0001, Alanina δ 1.48 p=0.008 e Tirosina δ 6.69 p=0.003, os três aminoácidos apresentaram covariância positiva para doença e correlação vermelha. Novamente o Etanol δ 1.19 discrimina os pacientes do GC, num entanto devido algum erro sistemático o mesmo apresentou seu sinal tanto para cima (RCU) quanto para baixo (GC), indicando que houve uma variação em seu deslocamento químico, constatando valor de p=0.002. Na Tabela 3 está listado os metabólitos discriminantes e seus respectivos valores de p.

Figura 24: ANOVA (p<0.05) GC vs RCU



Fonte: Próprio autor, 2017

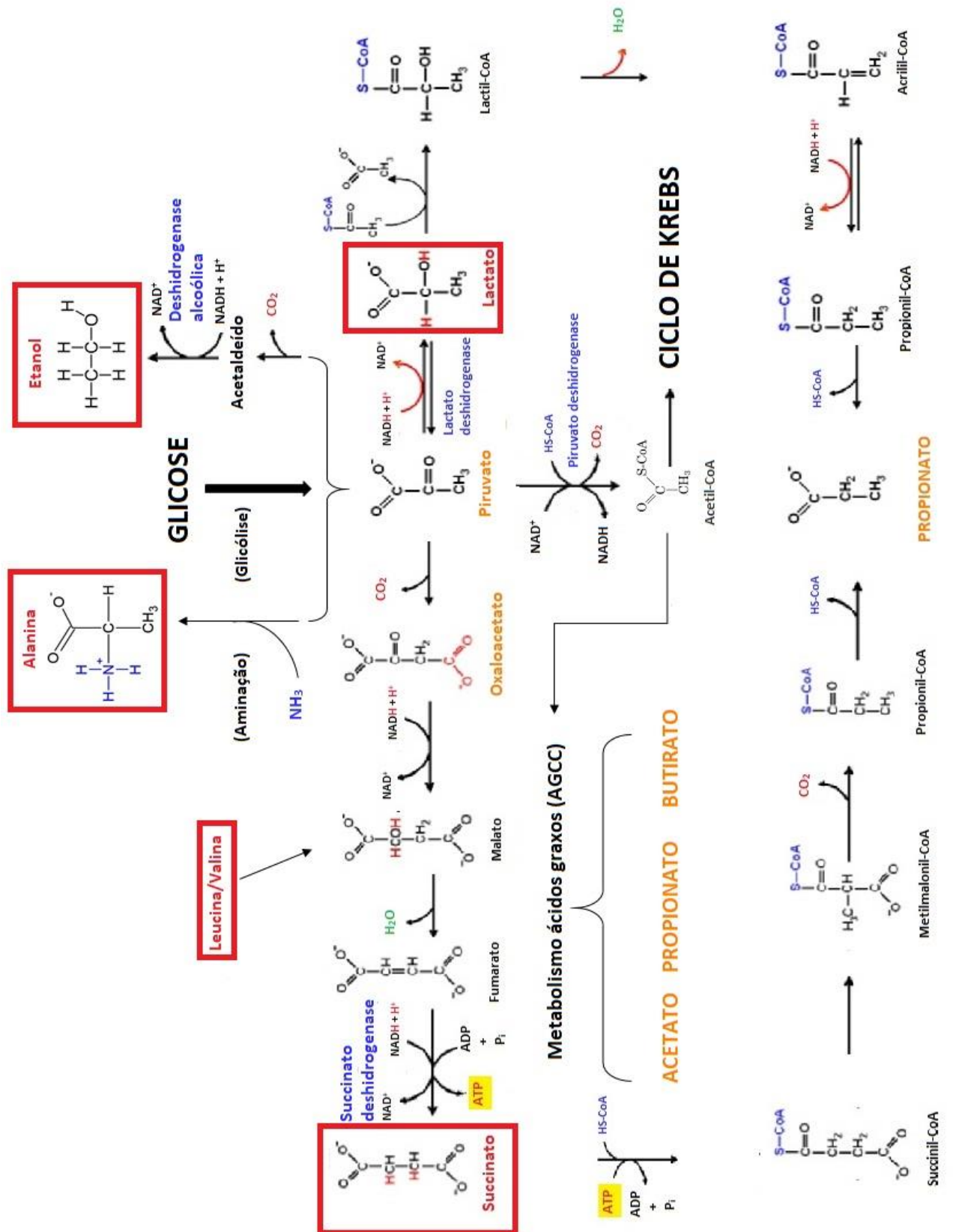
Tabela 3: Metabólitos discriminantes entre os grupos GC vs RCU obtidos após o teste de ANOVA (p<0.05)

Metabólito	GC	RCU
Leucina	–	p=0.0001
Alanina	–	p=0.008
Tirosina	–	p=0.003
Etanol	p=0.002	–

5.3.5. Perfil Bioquímico

Por meio da análise metabolômica foi possível a criação de um perfil bioquímico (Figura 25) de pacientes diagnosticados com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa do Hospital Universitário – HUPAA

Figura 25: Complexa rede metabólica criada através de amostras fecais para obtenção de um perfil bioquímico do GC e pacientes diagnosticados com DC e RCU



Fonte: Próprio autor, 2017

Metabólito em vermelho = discriminante; metabólito laranja: presente nas águas fecais

6. CONCLUSÃO

A Disbiose deve estar ocorrendo nos dois tipos de DII estudados. Metabólitos intermediários, como Lactato e Succinato foram detectados em pacientes com DC no lugar dos seus produtos do metabolismo intestinal, sendo assim, microrganismos tais como *Propionobacterium* provavelmente estão ausentes na microflora de doentes com DC. Enquanto que bactérias fermentadoras de aminoácidos devem estar ausentes em pacientes RCU parando o metabolismo em Leucina, Alanina e Tirosina. Por outro lado, leveduras parecem estar ausentes nos dois tipos de pacientes, uma vez que o etanol aparece como discriminante para o GC. Apesar desse estudo ser preliminar, acredita-se que poderá levar a um método de diagnóstico útil, além de oferecer sugestões de tratamento para as DII.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. B., et al. **Disbiose intestinal**. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*. v. 24, n. 1, p. 58-65. 2009.

ANGRIMAN, I, et al. **Enzymes in feces: useful markers of chronic inflammatory bowel disease**. *Clin Chim Acta*. 2007;381:63–68.

ANTUNES, A. E. C., et al. **Probióticos: agentes promotores de saúde**. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*. v. 32, n. 3, p. 103-122. 2007.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. **Exploring proteins: Nuclear Magnetic Resonance can reveal the structures of protein solutions**. In: W. H. Freeman, *Biochemistry*. 5 ed. New York, 2002, p. 77-115

BERTRAM, H. C., et al. **Effect of magnetic field strength on NMR-based metabonomic human urine data. Comparative study of 250, 400, 500, and 800 MHz: comparative study of 250, 400, 500, and 800 MHz**. In: *Analytical Chemistry*. 2007; Vol. 79, No. 18. pp. 7110-7115

BJERRUM J. T., et al. **Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease and healthy individuals**. *Metabolomics*. 2015; 11:122–133.

BORDENSTEIN, S. R., THEIS, K. R. **Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes**. *PLoS biology*. 2015;13(8):e1002226.

BOURLIOUX, P. **Actualité du microbiote intestinal**. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. n. 72, p. 15-21, 2014.

BRANDT, K. G., SAMPAIO, M. M. S. C., MIUKI, C. J. **Importância da microflora intestinal**. *Pediatrics*. v. 2, n. 28, p.117-127. 2006.

CARDOZO W. S., SOBRADO C. W., **Doença Inflamatória Intestinal**. 2nd ed. Barueri: Manole; 2015.

CASH, H. L., et al., **Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin.** *Science*, 2006. 313(5790): p. 1126-30.

COSTELLO, E. K, et al. **Bacterial community variation in human body habitats across space and time.** *Science* (New York, NY) 2009;326(5960):1694–7.

CRESCI, G. A., BAWDEN, E. **The Gut Microbiome: What we do and don't know.** *Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for parenteral and Enteral Nutrition*. 2015;30(6):734-746.

CRISPIN, A, et al. **Process quality and incidence of acute complications in a series of more than 230,000 outpatient colonoscopies.** *Endoscopy*. 2009, 41

DALAL S. R., KWON J. H. **The Role of MicroRNA in Inflammatory Bowel Disease.** *Gastroenterol. Hepatol.* (N. Y.) 2010; 6:714–722.

DE PRETER V., et al. **Faecal metabolite profiling identifies medium-chain fatty acids as discriminating compounds in IBD.** *Gut* 2015; 64:447–458.

ERIKSSON, L., TRYGG, J., WOLD, S.. **CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models.** *Journal of Chemometrics*. 2008;22(11–12):594–600. doi: 10.1002/cem.1187.

FELDMAN, M., SCHARSCHIMDT, B. F., SLEISENGER, M. H., **Sleisenger & fortran's gastrointestinal and liver disease Pathophysiology, diagnosis and management.** 7th ed. Philadelphia: W B Saunders, p. 1535-61, 2002.

GEBOES, K., et al. **Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name?** *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Jun;14(6):850-7

GHAZALPOUR, *et al.*, **Expanding Role of Gut Microbiota in Lipid Metabolism.** *Curr Opin Lipidol* . 2016 April ; 27(2): 141–147

HAHN, P., et al. **The classification of benign and malignant human prostate tissue by multivariate analysis of ¹H magnetic resonance spectra.** *Cancer Res.*, v. 57, p. 3398-3401, 1997.

HOLMES, C. E., et al. **Chemometric methods for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids.** *Chem. Res. Toxicol.*, v. 13, p. 471- 478, 2000.

IORIO, E., et al. **Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression.** *Cancer Res.*, v. 65, p. 9369-9376, 2005.

KASPER, D. L., et al. **Harrison's – Principles of Internal Medicine.** 16 ed.; 2005; p.1776-1789

KOETH, R. A., et al. **Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis.** *Nat. Med.* 2013; 19:576–585.

KHAN M. T., et al. **The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases.** *ISME J*, 2012 Aug; 6(8):1578-85.

LEDERBERG, J., MCCRAY, A. T., **Ome Sweet Omics-a genealogical treasury of words.** *Scientist.* 2001;15:8.

LEE, J., et al. **Profiles of microRNA networks in intestinal epithelial cells in a mouse model of colitis.** *Scientific reports.* Tokyo, v. 5, 2015.

LINDON, J. C., et al. **Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project.** *Toxic. App. Pharmac.*, v. 187, p. 137-146, 2003.

LIN, Y., et al. **NMR-based fecal metabolomics fingerprinting as predictors of earlier diagnosis in patients with colorectal cancer.** *Oncotarget*, 2016 May 17;7(20):29454-64.

MACHADO, A. S. **Importância da microbiota intestinal para a saúde humana, enfocando nutrição, probióticos e disbiose.** 2008. 33 f. Dissertação (Especialização em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008

MARCHESI, J. R., et al. **Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease.** *J Proteome*, 2007 Res 6: 546–551.

MATOS, G. D., et al. **Análise Exploratória em Química Analítica com Emprego de Quimiometria: PCA E PCA de Imagens.** *Revista Analytica*, n. 6, p. 38-50, Ago./Set. 2003.

MAYNARD, C. L., et al. **Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system.** *Nature*. 2012;489(7415):231–41.

MOUNTFORD, C. E., SOMORJAI, R., MALYCHA, P. **Diagnosis and prognosis of breast cancer by magnetic resonance spectroscopy of fine needle aspirates analysed using a statistical classification strategy.** *Br. J. Surg.*, v. 88, p. 1234-1240, 2001.

NICHOLSON, J. K., LINDON J. C. **Metabonomics.** *Nature*, v. 455, p. 1054-1056, 2008.

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

ODUNSI, K., et al. **Detection of epithelial ovarian cancer using 1H-NMR- based metabonomics.** *Int J Cancer*, v. 113, p. 782-788, 2005.

PASCAL V, et al. **A microbial signature for Crohn's disease.** *Gut*. 2017, 66:813–822.

PATTI, G. J., YANES, O., SIUZDAK, G. **Innovation: metabolomics: the apogee of the omics trilogy.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(4):263-269, 2012.

PRIDEAUX, L, et al. **Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review.** *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18:1340-55

REIG, A. L. C., ANESTO, J. B. **Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa.** *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición.* v. 16, n. 1, p. 63-68. 2002.

RODA, G., et al. **Update on current applications of proteomic in the study of inflammatory bowel disease.** *Annals of Gastroenterology.* Bologna, v. 25, n. 4, p. 303-308, 2012.

RUSSEL, P., et al. **Proton magnetic resonance and human thyroid neoplasia. I: Discrimination between benign and malignant neoplasms.** *Am. J. Med.,* v. 96, p. 383-388, 1994.

SABIN, J. G., FERRÃO M. F., FURTADO, J. C. **Análise multivariada aplicada a identificação de fármacos e antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e método de classificação SIMCA.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,* vol. 40, n. 3, jul./set., 2004

SALEK, R. M., et al. **A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human.** *Physil. Gen.,* v. 29, p. 99-108, 2007.

SANDERS, J. K. M., HUNTER, B. K. Principles of nuclear magnetic resonance. In: SANDERS, J. K. M., HUNTER, B. K. **Modern NMR Spectroscopy.** 2ª ed. Oxford University Pres, 1993, p. 10-23

SANTOS, A. C. A. **Uso de Probióticos na recuperação da flora intestinal, durante a antibioticoterapia.** 2010. 39 f. Dissertação (Especialização em Microbiologia) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SENDER, R., FUCHS, S., MILO, R. **Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans.** *Cell.* 2016;164(3):337–40.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7ª Ed., Rio de Janeiro, RJ:LTC, 2006.

STEPHEN, M., ADAMS, M. D., **Ulcerative Colitis.** *Am Fam Pshysician.* 2013 May 15;87(10):699-705.

STORR, M., VOGEL, H. J., SCHICHO, R. **Metabolomics: is it useful for inflammatory bowel diseases?** *Curr Opin Gastroenterol* 29(4):378-383, 2013.

STROBER, W., FUSS, I., MANNON, P. **The fundamental basis of inflammatory bowel disease.** *J. Clin. Invest.* 2007, 117 (3), 514–521.

SUARAWICZ C. M., MYERSON D., **Self-limited cytomegalovirus colitis in immunocompetent individuals.** *Gastroenterology.* 1988;94(1):194-9

SUMNER, L. W., MENDES, P., DIXON, R. A. **Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era.** *Phytochemistry*, v. 62, p. 817-836, 2003.

SUNIL, T, et al. **The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists** *Cancer Res.* 2017 Apr 15; 77(8): 1783–1812.

VARAVALLO, M. A., THOMÉ, J. N., TESHIMA, E. **Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais.** *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde.* v. 29, n. 1, p. 83-104. 2008.

VERONESI, J. **Inflammatory bowel disease.** *Registered Nurse*, v. 66, n. 5, p. 38-45, 2003.

VILLAS-BÔAS, S. G., GOMBERT, A. K. "**Análise do Metaboloma**", *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, v.9, n.36, p.58-69, 2006.

VOGEL, A. I., et al. **Análise Química Quantitativa.** 6. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2002. p. 77.

WANG, Z., et al. **Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease.** *Nature.* 2011; 472:57–63.

WECKWERTH, W. **Metabolomics in systems biology.** *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003. 54:669-89

WESTERHUIS, J. A., et al. **Multivariate paired data analysis: multilevel PLSDA versus OPLSDA.** *Metabolomics*. 2010; 6(1):119–128

WORLEY, B., POWERS R. **Multivariate analysis in metabolomics.** *Curr. Metabolomics*. 2013; 1 92–107.

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)

Eu,, tendo sido convidado (a) a participar como voluntário (a) do estudo **“BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS ATRAVÉS DE ANÁLISE METABOLÔMICA E GENÔMICA DE AMOSTRAS FECAIS”**, que será realizado no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, recebi do Sr. Manoel Álvaro de Freitas Lins Neto, responsável por sua execução, junto aos discentes de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Alagoas, Arthur de Oliveira Veras, Felipe Rios Moraes Andrade de Alencar, Giulia Maria Ximenes Verdi e Matheus de Oliveira Veras, as seguintes informações, que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

1. Que o estudo se destina a analisar, através da metabolômica e genômica, métodos diagnósticos não-invasivos para Doenças Inflamatórias Intestinais;
2. Que a importância deste estudo é a de desenvolver métodos diagnósticos menos invasivos nas Doenças Inflamatórias Intestinais;
3. Que os resultados que se desejam alcançar são biomarcadores específicos para doenças inflamatórias intestinais capazes de auxiliarem em métodos de exame menos invasivos para diagnóstico de Doenças Inflamatórias Intestinais;
4. Que esse estudo começará em Agosto de 2016 e terminará em Julho de 2017;
5. Que o estudo será feito a partir da análise laboratorial e interpretação de dados da genômica e metabolômica das fezes coletadas e, a partir desses dados, a busca de uma possibilidade diagnóstica das Doenças Inflamatórias Intestinais;
6. Que eu participarei do estudo através da coleta das fezes no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes após contato dos responsáveis pelo estudo;
7. Que o estudo poderá me oferecer um risco mínimo, como cansaço e tempo despendido, além da possibilidade de um certo incômodo devido ao resgate na memória de meu quadro clínico. Além disso, só irei ceder as fezes caso deseje, mediante concordância neste documento de T.C.L.E., que é um termo de consentimento, um documento que comprova minha permissão para participar do estudo. Os dados serão mantidos em sigilo, com compromisso de divulgação dos resultados da pesquisa sem citar os meus dados pessoais;
8. Que os benefícios relativos à pesquisa serão a possibilidade do conhecimento do quadro clínico das Doenças Inflamatórias Intestinais e assim uma melhor abordagem dessa situação;
9. Que eu serei informado (a) sobre o resultado final dessa pesquisa e sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo;
10. 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;
11. 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;

12. Que eu tenho a garantia de ser ressarcido por qualquer despesa que venha a ter com minha participação nesse estudo e, também, indenizado por todos os danos que venha a sofrer pela mesma razão, sendo que, para essas despesas, foi-me garantida a existência de recursos;
13. Que eu serei acompanhado durante no estudo no Setor de Coloproctologia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes pelo Prof. Dr. Manoel Álvaro de Freitas Lins Neto e seus colaboradores;
14. 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 do (a) participante-voluntário (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:

Nome e Endereço dos (as) responsável (s) pela pesquisa:

Nome: Manoel Álvaro de Freitas Lins Neto

Instituição: Universidade Federal de Alagoas

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n

Bairro: Tabuleiro dos Martins CEP: 57072-970

Cidade: Maceió

Telefones p/contato: (82) 99327-7888

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, _____ de _____ de _____

Assinatura ou impressão datiloscópica do (a) voluntário (a) ou responsável legal (Rubricar as demais páginas)	Nome e Assinatura do (s) responsável (eis) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

ANEXO II – PROTOCOLO DE PESQUISA**ANÁLISE METABOLÔMICA DE ÁGUAS FECAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DE
PERFIS BIOQUÍMICOS DE PACIENTES DIAGNÓSTICADOS COM DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

NOME: _____

REGISTRO: _____ IDADE: _____

GENERO: MASC () FEM ()

DIAGNÓSTICO: CROHN () RCU ()

TEMPO DE EVOLUÇÃO: _____

TRATAMENTO: _____

CIRURGIA PRÉVIA: _____

TABAGISTA ()

ETILISTA ()

CO-MORBIDADES: _____

NÍVEL DE ESCOLARIDADE: _____

RENDA FAMILIAR: _____