

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Wanderleya Toledo dos Santos

**Estudo metabolômico para descoberta de biomarcadores no soro de pacientes com  
doença de Parkinson**

**Juiz de Fora  
2022**

**Wanderleya Toledo dos Santos**

**Estudo metabolômico para descoberta de biomarcadores no soro de pacientes com doença de Parkinson**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvoat  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Aparecida Chagas de Paula

**Juiz de Fora  
2022**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Toledo dos Santos, Wanderleya.

Estudo metabólico para descoberta de biomarcadores no soro de pacientes com doença de Parkinson / Wanderleya Toledo dos Santos. -- 2022.

90 f. : il.

Orientador: Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvoat

Coorientador: Daniela Aparecida Aparecida Chagas de Paula

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. Doença de Parkinson. 2. Metabólica. 3. Biomarcadores. I. Chagas de Paula Ladvoat, Ana Cláudia, orient. II. Aparecida Chagas de Paula, Daniela Aparecida, coorient. III. Título.

**Wanderleya Toledo dos Santos**

**Estudo metabolômico para descoberta de biomarcadores no soro de pacientes com doença de Parkinson**

Dissertação  
apresentada ao  
Programa de Pós-  
Graduação em  
Ciências  
Farmacêuticas  
da Universidade  
Federal de Juiz de  
Fora como requisito  
parcial à obtenção do  
título de Mestre em  
Ciências  
Farmacêuticas. Área  
de concentração:  
Produtos Naturais e  
Sintéticos Ativos.

Aprovada em 01 de junho de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvocat** - Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula** - Coorientadora  
Universidade Federal de Alfenas

**Profa. Dra. Juliana de Carvalho da Costa**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Paula Carolina Pires Bueno**

Juiz de Fora, 06/05/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Claudia Chagas de Paula Ladvocat, Professor(a)**, em 03/06/2022, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Carvalho da Costa, Professor(a)**, em 03/06/2022, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Carolina Pires Bueno, Usuário Externo**, em 03/06/2022, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Aparecida Chagas de Paula, Usuário Externo**, em 09/06/2022, às 15:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0772072** e o código CRC **8ED6E00B**.

Dedico esse trabalho aos meus avós paternos, Geraldo e Maura e, à minha avó materna, Rizete, que não se fazem mais presentes fisicamente.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, sem Ele não seria possível chegar até aqui, pois sei que Ele sempre esteve ao meu lado, me dando forças para continuar e não me abalar diante dos desafios, que não foram poucos.

Aos meus queridos e amados pais, Ângela e Vanderlei, pelos conselhos, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões profissionais e pessoais, por não deixarem que eu desistisse, por serem meus maiores exemplos de amor ao próximo, honestidade e fé. Agradeço ainda pelo esforço de vocês para me darem as melhores condições para que esse sonho se tornasse realidade. Agradeço às minhas queridas irmãs, Máisa e Angélica, pela torcida e vibrações a cada conquista minha e por todo carinho e paciência comigo.

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram em especial a meu estimado avô Sebastião e minha madrinha Maria Inês, pelas constantes orações. Aos meus amigos e colegas que tornam essa caminhada mais leve. Gratidão ao meu amigo de laboratório, Diogo, pela companhia durante os experimentos, por ser meu ponto de equilíbrio nessa etapa do mestrado e por me proporcionar grandes risadas.

À minha querida orientadora, professora Ana Cláudia, que me acolheu como orientanda desde 2017. Ana, obrigada por todos os conselhos, oportunidades, pela confiança em mim depositada, por nunca medir esforços para a realização desse trabalho e por toda compreensão. À minha co-orientadora, Daniela, por estar sempre presente na realização desse trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e por todas as oportunidades. Ao professor Thiago Cardoso Vale do Núcleo de Pesquisa em Neurologia pela colaboração neste estudo. Ao doutorando Albert, pela parceria e por todo suporte técnico-científico, que foram fundamentais para a realização desse trabalho, pela paciência e por sempre esclarecer minhas dúvidas com todo carinho. Ao Gabriel pelo preparo das amostras para análise metabólica e pela disponibilidade em sanar minhas dúvidas. Ao Michael pelas análises cromatográficas.

Agradeço também aos colegas do LFQM, laboratório de pesquisa da UNIFAL, que sempre me acolheram nas reuniões científicas online. Foi um prazer conhecê-los pessoalmente. Obrigada pela acolhida e carinho.

Agradeço aos técnicos administrativos e professores do Centro de pesquisas em Ciências Farmacêuticas, por sempre estarem dispostos a ajudar.

À banca que se dispôs prontamente a avaliar e contribuir com o meu trabalho.

À UFJF, por ser minha casa, desde 2015 e por me proporcionar crescer não só profissionalmente, como também pessoalmente. Também a UNIFAL, FAPEMIG, CNPQ e CAPES pelo fomento que possibilitou minha pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.



## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa com etiologia complexa que afeta principalmente idosos. O diagnóstico ainda é baseado nos sintomas clínicos e as opções de tratamento são limitadas. Nesse contexto, é urgente a busca por biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico de maneira mais rápida e assertiva. Além disso, é importante determinar vias metabólicas afetadas para pesquisa de novas opções terapêuticas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar, através de estratégias metabolômicas, as variações no nível de metabólitos no soro de pacientes com DP para identificar biomarcadores para diagnóstico e as vias metabólicas reguladas. Assim, o sangue dos participantes (grupo paciente e controle) foi coletado, centrifugado e o soro retirado. Após o preparo das amostras, elas foram analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplada a um espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo com ionização por electrospray (ESI) (UPLC-ESI-QTOF-MS). Os resultados obtidos foram processados no *software* Masslynx<sup>TM</sup> e posteriormente analisados no *software* SIMCA-P<sup>+</sup>12.0 para a análise de estatística multivariada supervisionada. As variáveis importantes para projeção (VIPs) mais significativas (>2) nesta análise foram desreplicadas através da plataforma HMDB (*Human Metabolome Database*). Os dados também foram processados no *software* MS-DIAL e analisados na ferramenta online Metaboanalyst por meio do uso análises estatísticas univariadas e multivariadas, sendo consideradas os VIPs >1 para desreplicação usando o MS-FINDER. Posteriormente foi feita uma análise de vias metabólicas alteradas. Através das análises estatísticas observou-se uma separação bem definida entre os grupos controle e paciente com DP e que o método analítico foi satisfatoriamente reprodutível. Foi possível desreplicar metabólitos correlacionados ao paciente e correlacionados com o grupo controle, sendo relacionado com a DP, 15(S)-HPETE, 12-KETE, ácido pipercolico e 1-liso-2-araquidonoil-fosfatidato. Também, foi possível identificar alteração nas vias de metabolismo dos esfingolipídeos, da glutatona, do ácido araquidônico, de metabolismo da cafeína, do ácido araquidônico e biossíntese de ácidos biliares primários. Portanto, os resultados permitiram apontar informações importantes sobre possíveis biomarcadores da DP e os mecanismos metabólicos envolvidos na patologia como suporte para descoberta de marcadores para o diagnóstico e alvos terapêuticos.

Palavras-chave: 1. Doença de Parkinson. 2. Metabolômica 3. Biomarcadores.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease with a complex etiology that mainly affects the elderly. The diagnosis is still based on the clinical symptoms and treatment options are limited. In this context, it is urgent to search for biomarkers that can help in the diagnosis in a faster and more accurate way. In addition, it is important to determine affected metabolic pathways for research into new therapeutic options. Therefore, the objective of this work was to evaluate, through metabolomic strategies, the variations in the level of metabolites in the serum of patients with PD to identify biomarkers for diagnosis and the regulated metabolic pathways. Thus, the blood of the participants (patient and control group) was collected, centrifuged and the serum withdrawn. After preparing the samples, they were analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled to a quadrupole-time-of-flight mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) (UPLC-ESI-QTOF-MS). The results obtained were processed in the Masslynxs<sup>TM</sup> software and later analyzed in the SIMCA-P<sup>+</sup> 12.0 software for supervised multivariate statistical analysis. The most significant variables for projection (VIPs) (>2) in this analysis were unrepliated through the HMDB (Human Metabolome Database) platform. The data were also processed in the MS-DIAL software and analyzed in the Metaboanalyst online tool using univariate and multivariate statistical analyses, considering VIPs >1 for dereplication using the MS-FINDER. Subsequently, an analysis of altered metabolic pathways was performed. Through statistical analysis, a well-defined separation between the control and PD patient groups was observed, and that the analytical method was satisfactorily reproducible. It was possible to dereplicate metabolites correlated with the patient and correlated with the control group and being referenced with a DP, such as 15(*S*)-HPETE, 12-KETE, pipecolic acid and 1-lyso-2-arachidonoyl-phosphatidate. Also, it was possible to identify alterations in the metabolism pathways of sphingolipids, glutathione, arachidonic acid, caffeine metabolism, arachidonic acid and primary bile acid biosynthesis. Therefore, the results allowed us to point out important information about possible PD biomarkers and the metabolic mechanisms involved in the pathology as a support for the discovery of markers for the diagnosis and therapeutic targets.

Key-words: 1. Parkinson disease. 2. Metabolomic. 3. Biomarkers.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Regiões cerebrais afetadas pela Doença de Parkinson. A figura mostra uma seção lateral com a parte superior à esquerda de um cérebro humano. A cor amarela indica as regiões afetadas pela doença..... 17
- Figura 2 - Ciências ômicas e funcionamento celular. A informação codificada pelo DNA é transcrita em uma molécula de RNA mensageiro que é traduzida em proteína, que pode exercer um papel estrutural ou catalisar reações químicas dentro e/ou fora da célula, sendo responsável pela transformação de moléculas químicas, chamadas metabólitos. Os metabólitos, por sua vez, regulam atividades das proteínas, o processo de transcrição e tradução..... 24
- Figura 3 - Ciências ômicas e funcionamento celular. A informação codificada pelo DNA é transcrita em uma molécula de RNA mensageiro que é traduzida em proteína, que pode exercer um papel estrutural ou catalisar reações químicas dentro e/ou fora da célula, sendo responsável pela transformação de moléculas químicas, chamadas metabólitos. Os metabólitos, por sua vez, regulam atividades das proteínas, o processo de transcrição e tradução..... 26
- Figura 4 - Esquema resumido do fluxo de trabalho da análise metabolômica direcionada e não direcionada..... 27
- Figura 5 - Esquema sintetizado do funcionamento de um espectrômetro de massas.....29
- Figura 6 - Cromatogramas das amostras p010 (modo positivo) e p003 (modo negativo) obtidos por análise de UPLC-QTOF-EM. A seta mostra o tempo de retenção inicial escolhido..... 36
- Figura 7 - Parâmetros do método no modo positivo.....37
- Figura 8 - Parâmetros do método no modo negativo.....38
- Figura 9 - Score plot do teste de reprodutibilidade (A) modo positivo e (B) modo negativo com com as 3 replicatas..... 43
- Figura 10 - Gráfico de *score plot* do modelo de PCA..... 44
- Figura 11 - Gráfico *Score plot* em 3D do modelo de PLS DA com as amostras dos pacientes em azul e dos controles em verde. Modelo com 2 componentes e valores de  $R^2$  0.758 e  $Q^2$  0.564..... 45

Figura 12 -	Gráfico A demonstra os valores de VIP para as variáveis, sendo que em vermelho apresentam $VIP > 2,0$ e em verde $VIP < 2,0$ . Já o gráfico B mostra a distribuição dos VIPs $> 2,0$ (em vermelho) no conjunto total, sendo que aqueles correlacionados positivamente com o grupo paciente estão acima da linha do zero, e os correlacionados negativamente estão abaixo da linha do zero.....	46
Figura 13 -	Plotagem do teste de permutação do modelo PLS-DA, construído com base no perfil metabólico de pacientes com PD e grupo controle. A validação do modelo foi realizada com 100 permutações.....	48
Figura 14 -	Gráficos da curva SUC/ROC dos metabólitos com $VIP > 1$ .....	50
Figura 15 -	<i>Box plot</i> dos metabólitos significativos na análise ROC/AUC .....	51
Figura 16 -	Vias metabólicas relacionadas com os metabólitos com $VIP > 1$ selecionados no PLS-DA.....	53
Figura 17 -	Visualização 2D dos picos ( $m/z$ e $R_t$ ) dos resultados do alinhamento evidenciando a distribuição dos metabólitos detectados nos cromatogramas do grupo controle e paciente para o modo de ionização positivo (A) e modo de ionização negativo (B).....	59
Figura 18 -	Gráfico de <i>score plot</i> 3D do modelo de PCA.....	60
Figura 19 -	Gráfico de <i>score plot</i> 3D do modelo de PLS-DA.....	61
Figura 20 -	Gráfico de validação cruzada (A) desempenho da acurácia, $R^2$ e $Q^2$ das componentes 1 e 2.e teste de permutação (B) do modelo de PLS-DA.....	62
Figura 21 -	Espectros de massas da 3-O-metildopa, no modo negativo, e do ácido pipecólico, no modo positivo e seus respectivos espectros de fragmentação.....	63
Figura 22 -	Gráficos da curva ROC dos metabólitos com $VIP > 1$ .....	65
Figura 23 -	Vias metabólicas relacionadas com os metabólitos com $VIP > 1$ selecionados no PLS-DA .....	66
Figura 24 -	Gráficos da curva ROC dos metabólitos com $VIP >$ .....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fármacos utilizados no tratamento da Doença de Parkinson.....	19
Tabela 2 – Relação Amostra x Tempo de retenção inicial em minutos.....	35
Tabela 3 - Relação Amostra x Intensidade.....	36
Tabela 4 - Metabólitos com VIP > 2.....	47
Tabela 5 - Metabólitos com VIP > 1 desreplicadas .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OHdG	8-Hidroxi-2-deoxiguanosina
ACN	Acetonitrila
APCI	Ionização Química À Pressão Atmosférica
ATP	Adenosina Trifosfato
AUC	<i>Area Under the ROC Curve</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CI	Ionização Química
COMT	Catecol- <i>O</i> -metiltransferase
CQ	Controle de Qualidade
CVP	<i>Classical Volcano Plot</i>
Da	Dalton
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
ECP	Estimulação Cerebral Profunda
EI	Impacto de Elétrons
ES	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização por Eletrosspray
FAB	Bombardeamento Atômico Rápido
FC	<i>Fold Change</i>
FD	Ionização por Dessorção de Campo
FT-ICR	Ressonância Cíclotrônica de Íons por Transformada de Fourier
HMDB	Banco de Dados do Metaboloma Humano
IT	Armadilha de Íons
kV	Kilovolts
L/h	Litros por hora
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LFA	Ácido lisofosfatídico
LRRK2	Quinase 2 Rica em Leucina
<i>m/z</i>	Razão massa carga
MALDI	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz
Min	Minutos
mL	Mililitros

mm	Milímetros
MPTP	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
MS <sup>E</sup>	Espectro de Íons de Fragmento de Espectrometria de Massa
MSI	Metabolomics Standards Initiative
NAD	Dinucleotídeo de Nicotinamida e adenina
°C	Graus Celsius
OPLS-DA	Análise Discriminante com Projeção Ortogonal por Mínimos Quadrados
Parciais	
PCA	Análise de Componentes Principais
pcSN	parte compacta da Substância Nigra
pg/ml	Picogramas por mililitros
PLS-DA	Análise Discriminante Por Mínimos Quadrados Parciais
Q	Quadrupolo
Q <sup>2</sup>	Parâmetro de qualidade de predição
QTOF	Quadrupolo Tempo de Voo
R <sup>2</sup>	Parâmetro de qualidade de ajuste
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
RPM	Rotação por minuto
SN	Substância Nigra
SNC	Sistema Nervoso Central
SPECT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
TDA	Transportadores Dopaminérgicos
TOF	Tempo de Voo
TR	Tempo de Retenção
UPDRS	Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
V	Volts
VIP	Varáveis Importantes Para a Projeção
μL	Microlitros
μM	Micromolar

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1	DOENÇA DE PARKINSON.....	16
2.1.1	<b>Epidemiologia</b> .....	16
2.1.2	<b>Patogênese</b> .....	16
2.1.3	<b>Causas</b> .....	18
2.1.4	<b>Tratamento</b> .....	19
2.1.5	<b>Sintomas e diagnóstico</b> .....	20
2.1.6	<b>Marcadores diagnóstico</b> .....	22
2.2	CIÊNCIAS ÔMICAS.....	23
2.2.1	<b>Metabolômica</b> .....	25
2.2.2	<b>Técnicas Analítica para Análise Metabolômica</b> .....	28
2.3	ESTUDOS METABOLÔMICOS E DOENÇA DE PARKINSON.....	30
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1	COLETA DA AMOSTRA.....	33
4.2	PREPARO DA AMOSTRA.....	33
4.3	ANÁLISE UPLC-ESI-QTOF-EM.....	33
4.4	PROCESSAMENTO DE DADOS – MASSLYNXS <sup>TM</sup> MS.....	34
4.4.1	<b>Definição do método de tratamento de dados – Masslynxs<sup>TM</sup> MS</b> .....	34
4.4.2	<b>Teste de reprodutibilidade</b> .....	38
4.4.3	<b>Análises estatísticas</b> .....	38
4.4.4	<b>Desreplicação</b> .....	39
4.5	PROCESSAMENTO DE DADOS – MS DIAL.....	39
4.5.1	<b>Definição do método de tratamento de dados – MS Dial</b> .....	39
4.5.2	<b>Desreplicação</b> .....	40
4.5.3	<b>Análise estatística multivariada</b> .....	40
4.6	ANÁLISE DE VIAS.....	41
5	<b>RESULTADOS</b> .....	42
5.1	ANÁLISES UPLC-ESI-QTOF-EM.....	42



5.2	PROCESSAMENTO DE DADOS - MASSLYNXS™ MS.....	42
5.2.1	<b>Análise estatística multivariada</b> .....	44
5.2.2	<b>Desreplicação</b> .....	46
5.2.3	<b>Análise estatística univariada</b> .....	52
5.2.4	<b>Análise de vias metabólicas</b> .....	52
5.3	PROCESSAMENTO DOS DADOS – MS DIAL.....	59
5.3.1	<b>Análise estatística multivariada</b> .....	60
5.3.2	<b>Desreplicação</b> .....	62
5.3.3	<b>Análise estatística univariada</b> .....	66
5.3.4	<b>Análise de vias metabólicas</b> .....	66
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
	<b>APÊNDICE A</b> .....	86
	<b>APÊNDICE B</b> .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (PD) é uma desordem neurodegenerativa, que possui uma etiologia multifatorial e complexa (FARRER, 2006). Apesar da multifatorialidade pode-se citar principalmente a idade, causas genéticas e ambientais, como exposição a determinados agentes químicos e solventes (DEXTER; JENNER, 2013). Já o parkinsonismo é uma combinação de sintomas motores, tremor em repouso, bradicinesia, rigidez, perda dos reflexos e postura flexionada, que caracterizam o fenótipo clínico da doença (JANKOVIC, 2008; S. FAHN, 2003).

Os sintomas motores podem levar à complicações frequentes como quedas e deformidades posturais, entre elas escoliose da coluna vertebral (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016). Além disso, normalmente, a doença tem um início insidioso, assimétrico e progressivo, progredindo a medida que a disfunção neuronal e a morte celular atinge um esgotamento da dopamina (DA) no *striatum*. A DA é um neurotransmissor que faz parte da composição dos gânglios da base e é responsável pelo início e controle dos movimentos (FARRER, 2006). Assim, a patologia da doença é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da Substância Nigra (pcSN) associada à presença de corpos de Lewy, que são compostos principalmente por  $\alpha$ -sinucleína, uma proteína que também está envolvida em outros processos neurodegenerativos (DEXTER; JENNER, 2013).

Atualmente, o tratamento disponível para a DP é apenas sintomático, ou seja, não inibe a progressão do processo neurodegenerativo. O tratamento é baseado na reposição dos níveis de dopamina, sendo a levodopa o principal agente dopaminérgico usado (LEES; HARDY; REVESZ, 2009). Além disso, o tratamento pode levar a efeitos adversos desconfortáveis ao paciente e até mesmo outras complicações motoras (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016).

A doença também envolve sintomas não motores, como depressão, ansiedade, apatia, perda sensorial e distúrbio sensoriais. (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009; JANKOVIC, 2008). Esses sintomas podem se manifestar até dez anos antes do aparecimento dos sintomas motores (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016) e muitos pacientes não relatam esses sintomas por vergonha ou por achar que não têm envolvimento com a doença (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009).

Os sintomas são importantes no diagnóstico, pois esse ainda é baseado em critérios clínicos (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016). Existem várias escalas de classificação que avaliam o comprometimento motor e a incapacidade de pacientes com DP. A mais

utilizada é a escala unificada de avaliação da doença de Parkinson (UPDRS- do inglês *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*), frequentemente associada a escala de Hoehn e Yahr. Além das escalas clínicas, existem ainda as técnicas de neuroimagem, como tomografia por emissão de pósitrons, ressonância magnética e tomografia computadorizada de emissão de fótons, que são utilizadas para auxiliar no diagnóstico da doença, entretanto são úteis quando há neurodegeneração avançada (JANKOVIC, 2008).

Dessa forma, é de extrema importância a busca por novos biomarcadores permitindo um diagnóstico diferencial e mais rápido da doença, o que pode ajudar a melhorar a qualidade de vida de muitos pacientes acometidos com a DP. Muito tem sido feito para esclarecer os mecanismos envolvidos na patogênese da doença e acredita-se que as ciências ômicas possam auxiliar de forma satisfatória, por investigar metabólitos e as principais rotas metabólicas envolvidas na fisiopatologia de diferentes doenças (SHARMA *et al.*, 2013).

A metabolômica também tem ganhado cada vez mais interesse em estudos de diagnóstico e tratamento de doenças (WECKWERTH; MORGENTHAL, 2005). Essa ciência trata-se do estudo de metabólitos de baixo peso molecular presentes em organismos ou matrizes biológicas e para isso utilizam-se técnicas analíticas abrangentes, complementares e de alta sensibilidade para melhor entender o sistema biológico (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015). Dessa forma, por meio de estratégias metabolômicas, esse trabalho busca encontrar biomarcadores sanguíneos que possam auxiliar no diagnóstico da DP e também identificar metabólitos que possivelmente possam ser úteis para tratamento ou para melhora da qualidade de vida dos pacientes acometidos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DOENÇA DE PARKINSON

#### 2.1.1 Epidemiologia

O aumento da idade é considerado o principal fator de risco para essa doença. Estima-se que a prevalência da DP em países desenvolvidos é de 0,3% na população em geral (LEE, ANDREA; GILBERT, 2016), sendo 1,0% em idosos acima de 60 anos podendo chegar a 4,0% com o avançar da idade, já em indivíduos abaixo de 50 anos é raro (TYSNES; STORSTEIN, 2017).

A incidência da doença se mostra significativamente diferente em muitos trabalhos e isso se deve provavelmente às diferenças metodológicas, tanto nos critérios de diagnóstico como na apuração dos casos e essa incidência varia de menos de 10 a mais de 20 casos por 100.000 habitantes ao ano. Além disso, o subdiagnóstico afeta os dados de incidência (COCOROS *et al.*, 2021; TYSNES; STORSTEIN, 2017).

Além da idade, existem diferenças no sexo para a doença, sendo o sexo masculino considerado o mais afetado. A prevalência e a incidência se mostram 1,5 a 2,0 vezes mais aumentadas nos homens do que nas mulheres. Existe também uma diferença na idade de início da doença, sendo nas mulheres 2,1 anos mais tarde que nos homens (LEE, ANDREA; GILBERT, 2016). Estudos com animais mostram que o estrógeno pode desempenhar uma atividade neuroprotetora (SIANI *et al.*, 2017; THADATHIL *et al.*, 2020).

#### 2.1.2 Patogênese

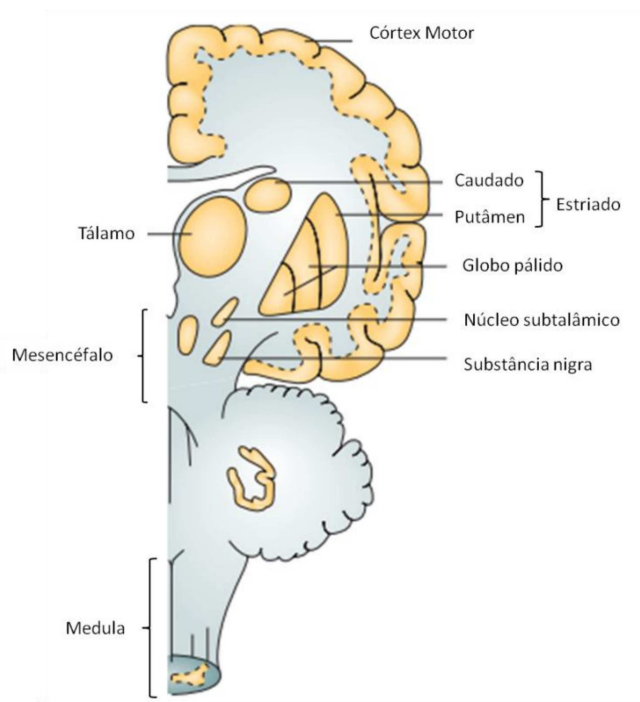
A DP foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson e foi caracterizada pela despigmentação da substância nigra (SN) que é causada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, responsáveis pela síntese de DA. Além disso, também são encontrados corpos de Lewy, que são inclusões proteicas intraneurais, formadas por  $\alpha$ -sinucleína e ubiquitina (WOOD-KACZMAR; GANDHI; WOOD, 2006).

A disfunção neuronal e a morte celular levam a um esgotamento da DA no *striatum*, resultando na progressão da doença. A DA é um neurotransmissor que faz parte da composição dos gânglios da base e é responsável pelo início e controle dos movimentos

(FARRER, 2006). Sua biossíntese se dá pela ação da enzima tirosina hidroxilase que catalisa a hidroxilação da tirosina que converte a L-tirosina em L-diidroxifenilalanina (L-DOPA) e essa, por sua vez vai ser descarboxilada pela enzima DOPA descarboxilase, formando a DA que será transferida e armazenada em vesículas citoplasmáticas através de um transportador. Durante a neurotransmissão a DA das vesículas é liberada na fenda sináptica transmitindo o impulso nervoso (DAUBNER; LE; WANG, 2011; WEINGARTEN *et al.*, 2015).

A Figura 1 mostra as regiões afetadas pela DP. Os movimentos voluntários se iniciam no córtex motor e são direcionados ao tronco encefálico (formado pelo mesencéfalo, ponte - não mostrado na figura - e medula) e medula espinhal através de alvos corticais que incluem o tálamo, putâmen e núcleo subtalâmico e essas áreas juntamente com a SN compreendem os gânglios da base. Os sintomas motores da doença são resultantes da diminuição ou depleção de DA no corpo estriado. À medida que a doença progride a degeneração neuronal se estende para outras áreas cerebrais. O aparecimento dos corpos de Lewy acontece de forma ascendente, aparecendo primeiro no bulbo olfatório (não mostrado na Figura 1) e na medula, seguindo para o mesencéfalo até chegar ao córtex (FARRER, 2006).

**Figura 1:** Regiões cerebrais afetadas pela doença de Parkinson. A figura mostra uma seção lateral com a parte superior à esquerda de um cérebro humano. A cor amarela indica as regiões afetadas pela doença.



Fonte: Adaptado de FARRER, 2006

### 2.1.3 Causas

A grande maioria dos casos, identificados na população em geral, não tem causa definida (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Entretanto, fatores ambientais e genéticos têm sido relacionados com o desenvolvimento da doença (ROTUNNO *et al.*, 2020).

Um estudo de meta-análise mostrou uma associação entre uma alta ingestão de produtos derivados de leite com o risco de desenvolver a DP e isso foi mais forte nos homens do que nas mulheres. Esse mesmo estudo encontrou achados de resíduos de epóxido de heptacloro associados mais comumente aos pacientes que tinham maior consumo de leite quando comparados aos que não consumiam leite, sugerindo que essa substância pode estar relacionada ao risco de desenvolver a doença (ABBOTT *et al.*, 2016).

A exposição a alguns herbicidas também pode estar associada com o risco de desenvolver a doença. Em 1983, Langston *et al.*, demonstraram que o metabólito do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MTPT) possui efeitos neurotóxicos e no corpo é convertido a uma molécula pró parkinsoniana que tem estrutura semelhante ao herbicida Paraquat (LANGSTON, BALLARD, TETRUD, 1983). Além disso, um estudo demonstrou que a DP aumentou conforme o aumento da duração de trabalho no campo e autorrelato de exposição à pesticidas, embora esse último não tenha sido significativo (PETROVITCH *et al.*, 2002). Existem ainda outros fatores que são associados com a doença, como melanoma, uso de bebidas alcoólicas, diabetes, vitaminas, entre outros (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016).

Além dos fatores ambientais, estudos têm mostrado o envolvimento genético com a doença. Um estudo mostrou que a razão de risco de desenvolver a doença foi de 6,7 entre irmãos, 3,2 para os filhos e 2,7 para sobrinhos - todos com intervalos de confiança de 95% - o que mostra que a DP está relacionado a um componente genético (SVEINBJORNSDOTTIR *et al.*, 2000).

A DP familiar é de origem genética e apresenta diferentes tipos de mutações, que podem resultar em início precoce ou tardio. A diferença nas mutações também se relaciona com a gravidade da doença, em que uma mutação pode ter rápida progressão quando comparada a outras. Já a DP relacionada à fatores ambientais é conhecida como DP idiopática ou esporádica e é a forma da doença que atinge a maior parte da população (SCHIESLING *et al.*, 2008). A DP monogênica hereditária está relacionada a alguns genes, sendo as mutações na SNCA (PARK 4) e em quinase 2 rica em leucina (LRRK2) (PARK 8) responsáveis pela DP autossômica dominante e as mutações em Parkin (PARK2), PINK1 (PARK6), DJ -1

(PARK7) e ATP13A2 (PARK9) que são as responsáveis pela DP de caráter recessivo (KLEIN; WESTENBERGER, 2012). Outras mutações também foram relatadas, como a perda heterozigótica da função da glucocerebrosidase (LEES; HARDY; REVESZ, 2009).

#### 2.1.4 Tratamento

A DP é uma doença progressiva e ainda não existe nenhum tratamento que cure a doença. Todavia, o tratamento sintomático melhora significativamente a qualidade de vida e a capacidade funcional do paciente (LEES; HARDY; REVESZ, 2009). A levodopa é um pró-fármaco da DA e é o padrão ouro no tratamento da DP (HAMMOND; BERGMAN; BROWN, 2007), sendo esta a primeira opção de tratamento independente da idade (LEES; HARDY; REVESZ, 2009). Entretanto, o tratamento a longo prazo e a necessidade de aumentar a dose estão associados ao desenvolvimento de complicações motoras (HAMMOND; BERGMAN; BROWN, 2007).

A levodopa pode ser metabolizada pela descarboxilase em tecidos periféricos e pela catecol-*O*-metiltransferase (COMT), formando a 3-*O*-metildopa. Dessa forma, é comum a associação da levodopa a um inibidor da descarboxilase periférico, para prevenir a descarboxilação de levodopa em dopamina na periferia, assim como, um inibidor da COMT, para aumentar a meia-vida plasmática da levodopa, aumentando o tempo de ação (FAHN, 2003).

Apesar da levodopa ser o principal medicamento utilizado no tratamento, há uma variedade de fármacos disponíveis, como podemos ver no quadro 1. O tratamento é alterado à medida que a terapia perde a eficácia (FAHN, 2003). Devido aos danos motores e cognitivos decorrentes da doença faz-se necessário, além do uso de medicações, o tratamento não medicamentoso (LEES; HARDY; REVESZ, 2009), que inclui a prática de exercício físico, treinamento de força, treinamento de equilíbrio e marcha, terapia ocupacional, intervenções usando dança, assim como outras estratégias (BLOEM; DE VRIES; EBERSBACH, 2015).

Tabela 1: Fármacos utilizados no tratamento da doença de Parkinson

<b>Substância ativa</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
Levodopa	Precursor de dopamina
Carbidopa e Benserazida	Inibidor periférico da descarboxilase

Tolcapona, Entacapona e Opicapona	Inibidor da Catecol- <i>O</i> -metiltransferase
Pramipexol, Ropinirol, Apomorfina e Rotigotina	Agonistas Dopaminérgicos
Amantadina, Trihexifenidil, Benztropina, Orfenadrina, Biperideno	Anticolinérgico
Selegilina, Rasagilina, Safinamida	Inibidor da MAO-B

Fonte: Adaptado de (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020)

No fim da década de 80, o interesse do uso de técnicas cirúrgicas para pacientes em fases mais avançadas da doença começou a intensificar. Essa técnica é mais indicada para pacientes com complicações motoras graves e não responsivos às terapias farmacológicas existentes (FERRAZ, 1999). Uma técnica que tem sido utilizada em casos avançados é a estimulação cerebral profunda (ECP), que é baseada no uso de corrente elétrica direta de alta frequência em um alvo que é escolhido de acordo com as características clínicas, podendo ser o núcleo subtalâmico, globo pálido ou o tálamo. Essa técnica é eficaz no controle de sintomas motores, incapacidade e diminuição de drogas antiparkinsonianas (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020).

### 2.1.5 Sintomas e diagnóstico

A DP geralmente é diagnosticada através dos sintomas motores. Estima-se que os primeiros sintomas motores característicos da doença só apareçam após uma perda de aproximadamente 80% das células dopaminérgicas do sistema nigroestriado (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016).

Os sintomas da doença começam insidiosamente, tendo uma piora progressiva. O tremor de repouso é um dos primeiros sintomas a ser observado, por ser característico, mas alguns pacientes nunca desenvolvem. Entretanto, a doença pode iniciar com bradicinesia, que se manifesta como lentidão, caligrafia menor e lenta, diminuição da passada das pernas ao caminhar e do balanço dos braços, diminuição da expressão facial e da amplitude vocal (FAHN, 2003; SVEINBJORNSDOTTIR, 2016).

Com a progressão da doença podem surgir os sintomas não relacionados à DA e que por isso não respondem a terapia, como a postura flexionada, fenômenos de congelamento e



perda dos reflexos posturais (FAHN, 2003). O conjunto desses sintomas pode levar a uma instabilidade postural, conseqüentemente, o paciente corre o risco de sofrer quedas e lesões (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016).

O diagnóstico da doença também é confirmado pela unilateralidade no início dos sintomas, ou seja, os sintomas começam a aparecer somente em um lado do corpo e pela assimetria dos sintomas clínicos. A diminuição dos sintomas em resposta à levodopa também é considerada no diagnóstico (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016).

Os sintomas motores da doença são bem conhecidos e tratados. Porém, a doença pode apresentar sintomas não motores que podem surgir antes dos sintomas clássicos e não serem reconhecidos e nem tratados adequadamente. Apatia, dor, dificuldades sexuais, incontinência intestinal e distúrbios do sono são alguns desses sintomas e, muitas vezes, os pacientes não relatam por ficarem constrangidos ou por não saberem que esses sintomas estão ligados à DP (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009).

O sub-diagnóstico desses sintomas não motores têm complicações terapêuticas e sociais importantes, pois muitos desses sintomas têm tratamento e se não tratados podem afetar a qualidade de vida do paciente. Além disso, os sintomas não motores resultam em frequente hospitalização, o que aumenta em até quatro vezes o custo do tratamento da doença (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009).

Existem várias escalas de classificação usadas para avaliar o comprometimento motor e incapacidade em pacientes com DP. A Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (UPDRS) é a mais utilizada e bem estabelecida para avaliar a deficiência. Ela sugere que a doença não tem um curso linear e que a taxa de progressão é variável. Essa escala avalia 42 itens e é dividida em quatro partes: Parte I -atividade mental, comportamento e humor; Parte II- atividade de vida diária; Parte III- capacidade motora e Parte IV- complicações da terapia medicamentosa (MELLO; BOTELHO, 2010). Outra escala frequentemente utilizada é a de Hoehn e Yahr, que varia numa escala de 0 (sem sinais da doença) a 5 (estágio mais avançado), fornecendo uma avaliação da progressão da doença (JANKOVIC, 2008).

Apesar do diagnóstico desta doença ser fundamentalmente clínico, a partir da década de 90 vários estudos de neuroimagem molecular começaram a ter grande importância para o diagnóstico diferencial e estadiamento da doença em casos mais desafiadores. Esses estudos concentraram-se no envolvimento de transportadores dopaminérgicos (TDA), tornando possível a avaliação da densidade desses transportadores *in vivo* através da tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT do inglês *single photon emission*

*computed tomography*) (MING *et al.*, 2006). Através do SPECT é possível visualizar a integridade das vias do aparelho dopaminérgico, sendo útil no diagnóstico da DP (SHARMA *et al.*, 2013).

### **2.1.6 Marcadores diagnóstico**

O diagnóstico da doença é feito através dos sintomas clínicos. Portanto, é de suma importância, que se desenvolvam modelos experimentais adequados para o estudo de progressão da doença e a descoberta de biomarcadores moleculares úteis no diagnóstico precoce e diferencial, melhorando assim o manejo clínico do paciente (SHARMA *et al.*, 2013).

O grupo de trabalho de definições de biomarcadores definiu biomarcador como uma “característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica” (ATKINSON *et al.*, 2001). Os biomarcadores podem ser uma característica que indica a susceptibilidade a uma doença, de estado, que diagnostica uma doença ou de taxa, que rastreia a progressão da doença (CHAHINE; STERN; CHEN-PLOTKIN, 2014).

Atualmente, não há disponibilidade de nenhum biomarcador aprovado para o uso na prática de rotina do diagnóstico da DP e alguns sintomas da doença usados para o diagnóstico podem ser confundidos com outros transtornos neurológicos, e nem sempre as semelhanças clínicas têm um componente neurodegenerativo. No início da doença, a taxa de erro no diagnóstico pode atingir até 25%. Isso mostra a grande importância da descoberta de um biomarcador adequado, o que permitiria que o tratamento começasse antes da perda relevante e irreversível dos neurônios (MILLER; O’CALLAGHAN, 2015).

O diagnóstico, na maioria das vezes, acontece após uma perda significativa de neurônios. Por isso os biomarcadores ideais são os biomarcadores pré-clínicos ou de estágio pré-motor, biomarcadores de risco ou susceptibilidade e biomarcadores de estágio motor. Dessa forma, para abordagem dessas categorias os biomarcadores podem ser baseados em fatores clínicos, de imagem, genéticos, metabólitos, proteômicos, bioquímicos ou uma combinação desses (MILLER; O’CALLAGHAN, 2015).

Entretanto, existe uma dificuldade na identificação e desenvolvimento de biomarcadores para doenças neurodegenerativas, devido a limitação de acesso ao tecido cerebral doente até a morte e a autópsia, sendo que a maioria dos pacientes não têm acesso à mesma. O líquido é um fluido interessante para investigação de biomarcadores para doenças

neurodegenerativas, pois não existe barreira entre ele e o cérebro, no entanto, a coleta é de difícil acesso (MILLER; O'CALLAGHAN, 2015). Enquanto a coleta de outros fluidos biológicos, como sangue e urina, é considerada minimamente ou não invasiva, esses fluidos não possuem conexão direta com o cérebro (CHAHINE; STERN; CHEN-PLOTKIN, 2014). Muitos esforços se concentram no intuito de esclarecer os complexos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DP. Acredita-se que uma explicação satisfatória possa ser estabelecida aplicando uma abordagem ômica (SHARMA *et al.*, 2013).

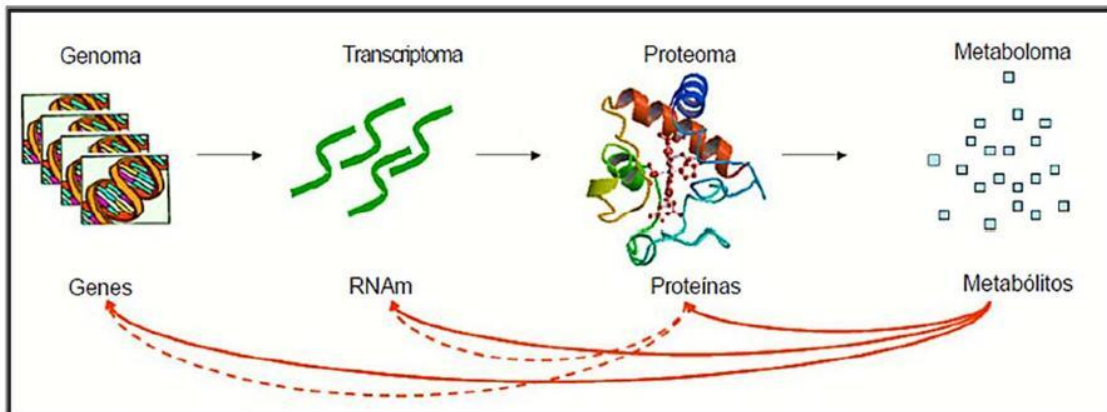
## 2.2 CIÊNCIAS ÔMICAS

No final do século XX e início do século XXI com o esclarecimento da sequência completa do DNA, teve início a chamada era “pós-genética”, que abriu caminhos para a pesquisa do genoma. Porém, a pesquisa foi além do genoma para a função dos genes, incluindo o entendimento da transcrição e regulação do gene, funções bioquímicas e interações dos produtos gênicos e a forma como eles influenciam no metabolismo e bioquímica celular, conforme mostrado na Figura 2. Dessa forma, surgiram várias denominações inspiradas no termo genômica, como transcriptômica, proteômica, metabolômica, também conhecidas como “ciências ômicas”(SHI-KAI *et al.*, 2015).

O termo “ômicas” faz referência à análise global do conteúdo de moléculas biológicas, além das citadas anteriormente e mostradas na Figura 2, têm surgido uma variedade de subdisciplinas e cada uma possui seu próprio conjunto de técnicas, instrumentos, *softwares* e base de dados (ESPINDOLA *et al.*, 2010), como lipidômica (LUQUE DE CASTRO; QUILES-ZAFRA, 2020), foodômica (BALKIR; KEMAHLIOGLU; YUCEL, 2021), fragmentômica (CHIU *et al.*, 2020), entre outras.

A ciência biológica moderna frequentemente envolve a análise de populações de biomoléculas dentro de um organismo ou mais específicos (célula, tecido ou compartimento subcelular). Devido à grande complexidade de tecidos, células e biomoléculas, as abordagens ômicas, na maioria das vezes, geram um grande volume de dados, o que tornou necessário o desenvolvimento de novas tecnologias dentro das áreas da bioinformática e bioestatística para tratar e processar todos esses dados gerados de maneira economicamente viável e biologicamente útil (WOOD; WESTBROOK; BROWN, 2014).

Figura 2: Ciências ômicas e funcionamento celular. A informação codificada pelo DNA é transcrita em uma molécula de RNA mensageiro que é traduzido em proteína, que pode exercer um papel estrutural ou catalisar reações químicas dentro e/ou fora da célula, sendo responsável pela transformação de moléculas químicas, chamadas metabólitos. Os metabólitos, por sua vez, regulam atividades das proteínas, o processo de transcrição e tradução.



Fonte: VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006.

As disciplinas ômicas vêm ganhando interesse na pesquisa científica pela grande possibilidade de diversidade amostral e pelo uso de plataformas analíticas sensíveis como a espectrometria de massas (ES). Como mencionado anteriormente, devido à produção de grande quantidade de dados experimentais, *softwares* de alta qualidade são necessários, requerendo soluções por parte da bioinformática para a obtenção de análises cada vez mais eficientes dos dados ômicos gerados (AGAPITO; GUZZI; CANNATARO, 2017).

Existem redes moleculares complexas e dinâmicas de um grande número de moléculas envolvidas na fisiopatologia de doenças humanas. Uma única estratégia ômica pode fornecer informações sobre mecanismos biológicos de qualquer doença. No entanto, quando usadas sozinhas, como por exemplo apenas a análise dos genes de determinada doença, muitas vezes não é possível explicar mudanças no risco ao longo da vida. Como visto na Figura 2, DNA, RNA, proteínas e metabólitos têm funções complementares para desempenhar conjuntamente uma determinada função biológica. Um estudo integrativo entre as ômicas podem capturar interações sinérgicas e efeitos complementares (SUN; HU, 2016).

### 2.2.1 Metabolômica

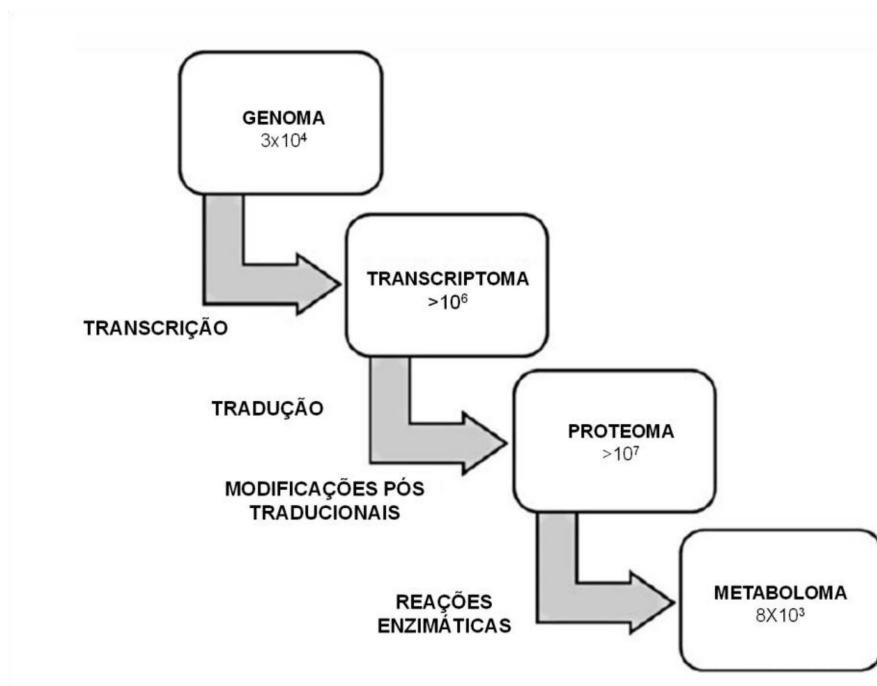
A metabolômica compreende o estudo de metabólitos de baixo peso molecular de organismos ou matrizes biológicas através de técnicas analíticas abrangentes e sensíveis com o objetivo de entender o sistema biológico (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015) e vem ganhando cada vez mais interesse no diagnóstico, tratamento de doenças e descoberta de medicamentos (RAFFONE *et al.*, 2020). Os metabólitos são produtos do metabolismo - podendo ser finais ou intermediários - e o conjunto de metabólitos de massa molecular até 1500 Da, presentes em um sistema biológico, constitui o metaboloma (CANUTO *et al.*, 2018).

O metaboloma humano é composto por uma coleção completa de pequenas moléculas encontradas no corpo humano, como peptídeos, lipídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos orgânicos, aminas biogênicas, vitaminas, minerais, aditivos alimentares, drogas, cosméticos, contaminantes, poluentes, ou seja, tudo o que ingerimos, metabolizamos, catabolizamos ou entramos em contato. Portanto, o metaboloma humano é constituído de uma mistura de compostos endógenos e exógenos (WISHART *et al.*, 2018).

O número de metabólitos no corpo humano é relativamente menor quando comparado com o número de genes, transcriptomas ou proteínas como mostrado na Figura 3. Entretanto, os níveis dos metabólitos em fluidos e tecidos biológicos podem ser influenciados por muitos fatores e podem ser considerados como a resposta final de um organismo frente aos fatores do meio ambiente, modificações genéticas, alterações da microflora intestinal e alterações na atividade enzimática (KLUPCZYŃSKA; DEREZIŃSKI; KOKOT, 2015).

Através de abordagens *in silico* e laboratoriais foi possível aumentar o número de metabólitos (conhecidos, esperados e previstos) e agrupá-los em um Banco de Dados do Metaboloma Humano chamado HMDB do inglês *Human Metabolome Database*. Nesse banco de dados encontram-se mais de 114 mil entradas, que incluem metabólitos endógenos, metabólitos de fármacos, compostos alimentares, corantes, pesticidas, poluentes, drogas, entre outros (WISHART *et al.*, 2018).

Figura 3: Diagrama ilustrativo das tecnologias “ômicas”. Número de metabólitos no corpo humano em comparação com o genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma. O fluxo de informações no organismo humano começa com os genes ( $3 \times 10^4$ ) e termina com os metabólitos ( $8 \times 10^3$ ).



Fonte: Adaptado de KLUPCZYŃSKA; DEREZIŃSKI; KOKOT, 2015

Na análise metabolômica podem ser usadas duas abordagens analíticas gerais: direcionada e não direcionada, também conhecidas pelos termos em inglês *targeted* e *untargeted*, respectivamente. A metabolômica direcionada relaciona-se à detecção e quantificação precisa de um grupo pequeno de compostos conhecidos. Ela é direcionada para um determinado conjunto de metabólitos. Portanto, essa abordagem exige que os compostos de interesse sejam conhecidos, ou seja, uso de padrões purificados que foram claramente identificados e estão disponíveis. A metabolômica não direcionada é uma análise geral de metabólitos, para classificar amostras, determinar alterações no nível de metabólitos, sem precisar de conhecimento prévio dos compostos em estudo (CAMBIAGHI; FERRARIO; MASSEROLI, 2016).

No desenvolvimento da análise metabolômica é importante seguir um fluxo de etapas como mostrado na Figura 4. O preparo de amostra é uma etapa primordial no desenvolvimento de um estudo metabolômico (CANUTO *et al.*, 2018).

Figura 4: Esquema resumido do fluxo de trabalho da análise metabolômica direcionada e não direcionada.



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

As amostras mais utilizadas em estudos metabolômicos são biofluidos, extrato celular ou tecidos. Os biofluidos, que compreendem amostras como urina, plasma sanguíneo, soro e líquido cefalorraquidiano (LCR), são as amostras mais investigadas nesse tipo de estudo (BECKONERT *et al.*, 2007; ROCA *et al.*, 2021; SMOLINSKA *et al.*, 2012)

Na análise metabolômica são gerados muitos dados e esses são complexos, por isso são necessárias ferramentas adequadas para o tratamento dos dados, o que evita a ocorrência de erros e preservação as variações biológicas analisadas (CANUTO *et al.*, 2018). Existem diferentes *softwares* livres e licenciados para o tratamento desses dados (SPICER *et al.*, 2017; SUGIMOTO *et al.*, 2012).

A análise estatística é importante para extrair as principais informações dos dados, através de análises univariadas e multivariadas. Nas análises univariadas, as variáveis são avaliadas separadamente e despreza-se qualquer relação entre elas, para isso são usados testes estatísticos como ANOVA, teste *t de Student* ou de *Mann-Whitney U*. Já nas análises multivariadas a classificação e a discriminação das amostras são realizadas através da avaliação do conjunto de dados, nesse caso são usados métodos estatísticos não supervisionados, como análise de componentes principais (PCA, do inglês, *principal component analysis*), e métodos supervisionados, como análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, *partial least squares discriminant analysis*), e análise discriminante com projeção ortogonal por mínimos quadrados Parciais (OPLS-DA, do inglês,

*orthogonal partial least squares discriminant analysis*) (CANUTO *et al.*, 2018; CHAGAS-PAULA, DANIELA APARECIDA *et al.*, 2015; KATCHBORIAN-NETO *et al.*, 2020)

### 2.2.2 Técnicas analíticas para análise metabolômica

Devido à grande biodiversidade química de metabólitos e diferentes concentrações, torna-se difícil cobrir todo o metaboloma de um organismo biológico. Dessa forma, para a obtenção de dados dos estudos metabolômicos tem-se usado multiplataformas de análise. Essas plataformas permitem maior cobertura de dados o que proporciona maior entendimento do organismo estudado (CANUTO *et al.*, 2018).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para separação e caracterização de diferentes grupos químicos. Técnicas de separação de compostos, como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar, são associadas às técnicas de detecção de compostos, como EM ou ressonância magnética nuclear (RMN), para se ter diferentes medidas baseado nas propriedades químicas e físicas dos metabólitos (CAMBIAGHI; FERRARIO; MASSEROLI, 2016). A técnica de RMN possui muitas vantagens, contudo a sensibilidade é menor quando comparada com a EM (LIESENFELD; HABERMANN; OWEN, 2013; ZHANG *et al.*, 2012). Além disso, esta também oferece informações minuciosas sobre as estruturas moleculares (BECKONERT *et al.*, 2007).

A EM, ou no inglês – MS, é a técnica mais abundantemente utilizada, principalmente, quando utilizada acoplada a métodos de separação cromatográfica para aumentar a confiabilidade na identificação dos metabólitos. É uma técnica que permite análises rápidas, qualitativas e quantitativas de alta sensibilidade e seletividade (CAMBIAGHI; FERRARIO; MASSEROLI, 2016).

Normalmente os espectrômetros de massa são formados por três partes fundamentais: a fonte de ionização, o analisador e o detector, como mostrado na Figura 5. A amostra vai ser introduzida na fonte de ionização, na qual as moléculas são ionizadas. Os íons vão para o analisador de massas, onde são separados de acordo com sua massa/carga ( $m/z$ ) e passados para o detector, que por sua vez, monitora a corrente de íons, amplifica e o sinal é transferido para o sistema de dados (CLECIUS *et al.*, 2019).

Existem vários métodos de ionização. A escolha do método depende do tipo de amostra e do espectrômetro de massas disponível. Dentre esses métodos pode-se citar impacto de elétrons (EI), ionização química (CI), ionização química à pressão atmosférica (APCI), ionização por electrospray (ESI), bombardeamento atômico rápido (FAB), ionização por

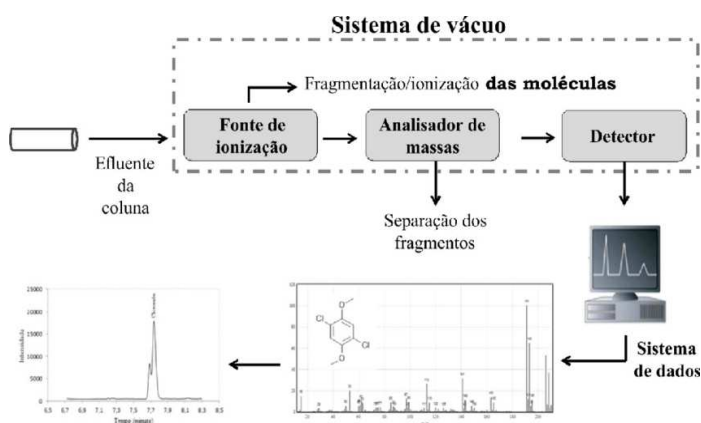


dessorção de campo (FD), ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). Também existem uma série de analisadores de massas, quadrupolo (Q), armadilha de íons (ion trap - IT), tempo de voo (TOF - do inglês time of flight), ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR - do inglês, *Fourier transform ion cyclotron resonance*) (CLECIUS *et al.*, 2019).

A técnica hifenada cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-EM) é poderosa e muito utilizada em pesquisa biomolecular e também permite o uso para quantificar a atividade de vias de sinalização e metabólicas de forma múltipla e abrangente. Além disso, a técnica de UPLC resulta em análises com maior resolução de pico, maior especificidade e alto rendimento, tornando a técnica ainda mais adequada para abordagem metabolômica. O acoplamento da UPLC a EM abrangem vários metabólitos polares, aumentando o número de analitos detectados (ZHANG *et al.*, 2012).

A ionização por impacto de elétrons é utilizada para determinar a massa molecular de muitas moléculas como orgânicas, organometálicas e biomoléculas. Essa técnica, ainda, pode deduzir várias informações estruturais (CHEN *et al.*, 2019). O analisador Q-TOF permite ainda análises e identificação de traços de componentes em misturas complexas, sendo um meio poderoso para detectar precisamente massas com menor erro (< 10 ppm), com uma boa resolução (ZHANG *et al.*, 2012).

Figura 5: Esquema sintetizado do funcionamento de um espectrômetro de massas



Fonte: CLECIUS *et al.*, 2019.

### 2.3 ESTUDOS METABOLÔMICOS E DOENÇA DE PARKINSON

Os estudos metabolômicos mais recentes relacionados com a DP têm o objetivo de buscar biomarcadores para a doença. Estudos utilizam, principalmente, amostras de sangue

(soro/plasma), LCR (CROTTY *et al.*, 2020; GLAAB *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2020) e urina (LUAN; LIU; TANG; ZHANG; *et al.*, 2015). O sangue é uma amostra que tem sido amplamente utilizada na metabolômica, tanto em estudos da DP quanto em outros estudos, e quando comparado com as análises utilizando o LCR, este tem natureza menos invasiva e relativamente maior disponibilidade (SHAO; LE, 2019). Além disso, amostras sanguíneas (soro/plasma) são transportadores primários de metabólitos por todo organismo e por isso podem ser fontes de muitas informações sobre condições fisiológicas e fisiopatológicas de um sistema biológico (BUJAK *et al.*, 2015).

Os principais metabólitos diferenciais encontrados entre pacientes com DP comparados com grupos controles são aminoácidos, ácidos graxos, acilcarnitinas, lipídios, purinas, ácidos orgânicos e açúcares, que fazem parte do metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada, metabolismo de triptofano, metabolismo lipídico, metabolismo energético, metabolismo de purinas e vias de homeostase do estresse oxidativo (BOGDANOV *et al.*, 2008; BURTÉ *et al.*, 2017; HATANO *et al.*, 2016a; STOESSEL *et al.*, 2018).

Recentemente, alguns estudos mostraram alterações consistentes na via da quinurenina em pacientes com DP (BUNNEY *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2017). Essas alterações no metabolismo da quinurenina na DP indicam possíveis candidatos a biomarcadores e novas vias de investigação da patogênese da DP. Também, oferecem uma estratégia terapêutica diferente para a doença, com a suplementação de ácido quinurênico ou a diminuição de ácido quinolínico usando inibidor de quinurenina-3-monooxigenase (CHANG *et al.*, 2018).

Estudos também sugeriram o urato como um biomarcador promissor para avaliar risco, diagnóstico e prognóstico. Esses estudos mostram uma redução significativa dos níveis de urato tanto no soro quanto no LCR, quando se compara controles e pacientes com DP (ASCHERIO *et al.*, 2009; CIPRIANI; CHEN; SCHWARZSCHILD, 2010). Já os níveis aumentados de urato representam menor risco para a doença e progressão mais lenta (CIPRIANI; CHEN; SCHWARZSCHILD, 2010; SCHWARZSCHILD, 2008), pois o urato pode eliminar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, portanto reduz o estresse oxidativo e nitrosativo aos neurônios estressados metabolicamente em degeneração na DP (CIPRIANI; CHEN; SCHWARZSCHILD, 2010). Assim, inicialmente, os estudos foram focados em avaliar marcadores de estresse oxidativo através da análise direcionada (BOLNER *et al.*, 2011; HIRAYAMA *et al.*, 2011; SATO; MIZUNO; HATTORI, 2005).

O 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) é considerado um marcador de dano oxidativo ao DNA que pode ser excretado na urina e o nível desse metabólito sozinho ou uma

proporção de 8-OHdG /2'-desoxiguanosina, pode diferenciar DP dos controles de forma significativa. Além disso, o nível de 8-OHdG urinário aumenta progressivamente com o avançar da doença, sendo útil para avaliar a progressão da doença (BOLNER *et al.*, 2011). A biopirrina, produto oxidativo da bilirrubina, foi identificada em estudos não direcionados como um marcador para DP esporádica (LUAN; LIU; TANG; MOK; *et al.*, 2015).

As purinas também são metabólitos interessantes no LCR em pacientes com DP. Um estudo que investigou os níveis de xantina e ácido homovanílico (HVA) em DP comparado com controles, mostrou uma diferença significativa na proporção de xantina para HVA no LCR na DP *versus* controle (LEWITT *et al.*, 2011). Dessa forma, a metabolômica pode fornecer uma grandeza de potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos através da “impressão digital” das alterações metabólicas de vários biofluidos (SHAO; LE, 2019).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O presente estudo tem como objetivo investigar as variações no nível de metabólitos no soro de pacientes com DP, que poderão ser apontados como possíveis candidatos a biomarcadores para diagnóstico dessa doença e/ou tratamento.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar análises estatísticas univariadas e multivariadas de dados metabolômicos para determinar as substâncias correlacionadas com a DP;
- Desreplicar os metabólitos do soro de pacientes com DP e controles positivos saudáveis por meio de análises via UPLC-ESI-TOF-EM;
- Identificar vias metabólicas afetadas.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 COLETA DO SORO DE PACIENTES COM DP

Neste estudo foram incluídos pacientes com diagnóstico clínico de DP determinado por um neurologista de distúrbios do movimento do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, durante uma visita ambulatorial regular. Indivíduos saudáveis, sem qualquer manifestação neurológica diagnosticada e sem histórico familiar de doenças neurológicas, foram incluídos no estudo para o grupo controle.

Os participantes deste estudo foram voluntários, os quais forneceram consentimento informado por escrito conforme aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora conselho consultivo do Conselho Nacional de Saúde (CAAE nº 70592617.2.0000.5133). O estudo foi realizado com 39 pacientes e 15 indivíduos controles.

Amostras de sangue total sem jejum foram coletadas de uma veia periférica dos participantes em tubos vacutainer com ativador de coágulo 13x100 mm (BD Biosciences). Após a coagulação do sangue, o soro foi separado por centrifugação a 3400 rpm em temperatura ambiente por 5 minutos. O soro foi congelado imediatamente a -80 °C.

#### 4.2 PREPARO DE AMOSTRA

Em tubos *ependorf* de 2 mL, adicionou-se 200 µL de soro e 400 µL de acetonitrila (ACN). Em seguida, a mistura foi levada à centrífuga nas condições de 10000 rpm e 22 °C. Pipetou-se 400 µL do sobrenadante em um tubo *ependorf* análogo e aguardou-se a evaporação em capela de fluxo (12h). Posteriormente as amostras foram levadas ao congelador para liofilização, e após secagem foram ressuspendidas em 100 µL de uma solução H<sub>2</sub>O/ACN (1:1, v/v), que foi novamente centrifugada sob as mesmas condições. Então pipetou-se 80 µL do sobrenadante diretamente no *insert* para prosseguir para etapa de análise por UPLC-ESI-QTOF-EM.

#### 4.3 ANÁLISE POR UPLC-ESI-QTOF-EM

As análises metabolômicas foram realizadas na Waters Technologies do Brasil Ltda utilizando o cromatógrafo acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução UPLC-ESI-QTOF-EM (Xevo-QTOF/MS, Waters Corp., Milford, USA) e o *software* Masslynxs<sup>TM</sup> MS (Waters Corp., Milford, USA). As separações cromatográficas foram realizadas em coluna

ultra-analítica de fase reversa, C18 ACQUITY UPLC<sup>®</sup>HSS T3 (1,8  $\mu\text{m}$ , 100 x 2,1 mm). O forno da coluna foi mantido a 40 °C e as fases móveis foram A, água MiliQ acidificada (ácido fórmico a 1% v/v) e B, ACN. O método de eluição foi gradiente de 10 min com fluxo a 0,5 mL/min. A corrida cromatográfica iniciou com 1% ACN e 99% H<sub>2</sub>O, em 0,1 min 15% ACN e 85% H<sub>2</sub>O, em 7,5 min 80% ACN e 20% H<sub>2</sub>O, em 8,5 min 99% ACN e 1% H<sub>2</sub>O, em 8,6 min 1% ACN e 99% H<sub>2</sub>O e até 10 min com 1% ACN e 99% H<sub>2</sub>O. O volume de injeção foi de 5  $\mu\text{L}$ .

O ESI foi operado no modo de ionização positivo e negativo em corridas cromatográficas isoladas. Os parâmetros de massas foram executados nos canais de alta e baixa energia, que são reconhecidas como o modo de aquisição MS<sup>E</sup>. Os parâmetros de operação do equipamento foram: tensão do cone, 40 V; tensão capilar, 3,0 kV; fluxo de gás do cone, 30 L/h; temperatura de dessolvatação, 300 °C; temperatura da fonte 120 °C; e fluxo de gás de dessolvatação, 600 L/h. A faixa de varredura de massa foi definida para 100 a 1000  $m/z$ . Os dados de EM foram coletados em centroide, utilizando *lockspray* para calibração do equipamento e assim, garantir a precisão e reprodutibilidade das análises. Uma concentração de 200 pg/mL de leucina-encefalina, de  $m/z$  de 554,2622 (ESI-) e  $m/z$  556,2768 (ESI+) foi utilizada. As amostras foram analisadas aleatoriamente, com uma replicata e um branco (constituído de ACN) no início, meio e final da corrida cromatográfica.

#### 4.4 PROCESSAMENTO DE DADOS - Masslynxs<sup>TM</sup> MS

Para o presente estudo metabolômico, amostras de soro de pacientes com DP e controles saudáveis foram incluídas. Foram empregadas abordagens não direcionadas para a descoberta de potenciais biomarcadores envolvidos na fisiopatologia e possível terapêutica na DP. Os dados MS<sup>E</sup> foram processados utilizando 2 softwares diferentes: o Masslynxs<sup>TM</sup> MS e o MS-DIAL, para ambos os modos de ionização: ESI-EM<sup>+</sup> e ESI -EM<sup>-</sup>.

##### 4.4.1 Ajuste de parâmetros para o tratamento de dados – Masslynxs<sup>TM</sup> MS

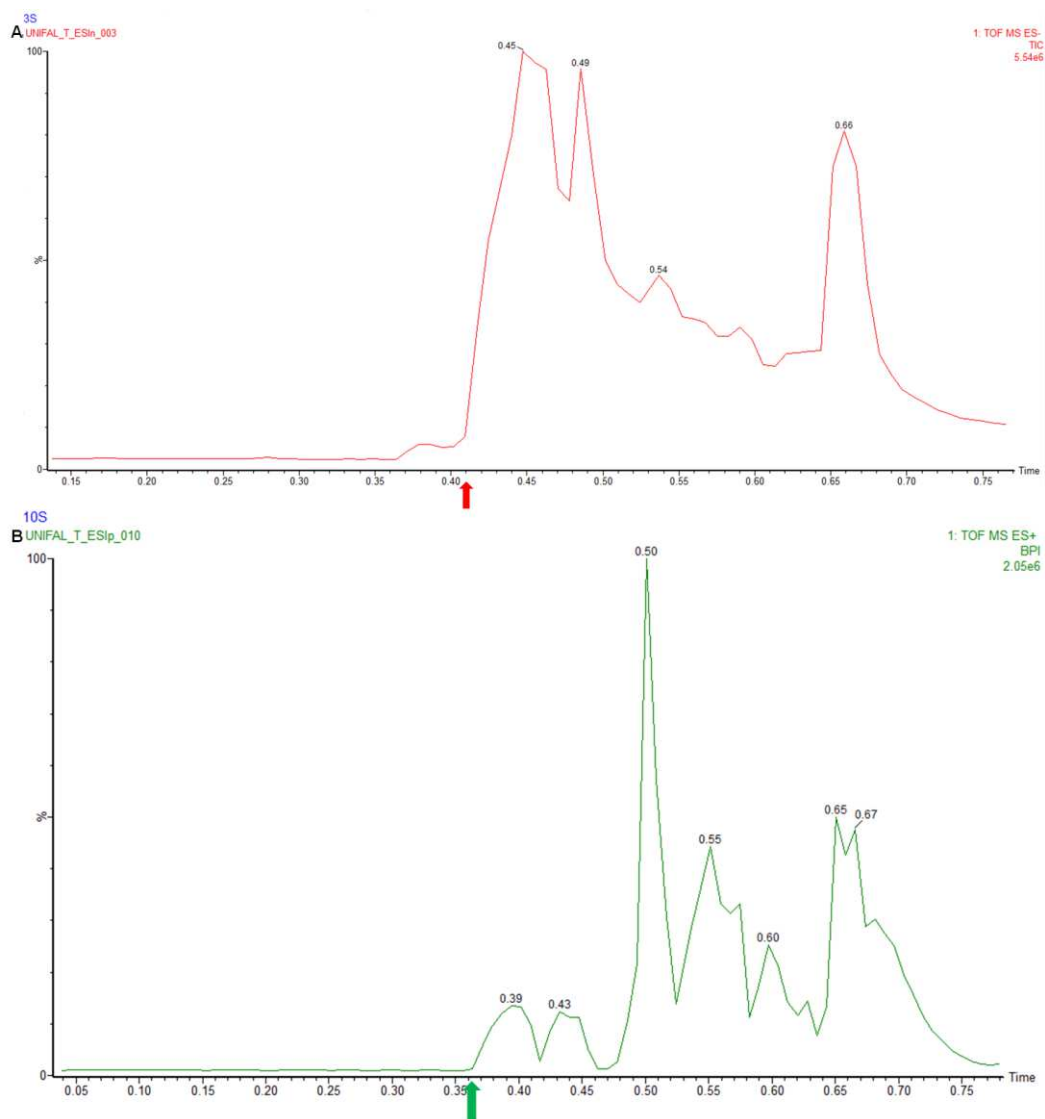
Para definir as propriedades dos métodos, inicialmente os tempos de retenção inicial e final foram determinados através de uma busca do tempo de retenção (TR) inicial nos cromatogramas de 6 amostras escolhidas aleatoriamente, conforme mostrado na Tabela 2. Em seguida, é possível visualizar na Figura 6 os cromatogramas dos modos negativo e positivo com o TR inicial destacado por setas vermelha e verde, respectivamente.

Tabela 2: Relação Amostra x Tempo de retenção inicial em minutos.

Modo positivo				Modo negativo			
Amostra	T <sub>r</sub> (inicial)	Amostra	T <sub>r</sub> (final)	Amostra	T <sub>r</sub> (inicial)	Amostra	T <sub>r</sub> (final)
p001	0,40	p002	9,55	p003	0,41	b002	9,70
p010	0,37	p012	9,55	p013	0,41	p003	9,70
p020	0,40	p022	9,55	p023	0,46	p015	9,70
p030	0,40	p027	9,55	p033	0,36	p025	9,70
p040	0,40	p032	9,55	p043	0,41	p035	9,70
p050	0,50	p042	9,55	p050	0,36	p045	9,70

Fonte: própria autora, 2022.

Figura 6: Cromatogramas das amostras p010 (modo positivo) e p003 (modo negativo) obtidos por análise de UPLC-QTOF-EM. A seta mostra o tempo de retenção inicial escolhido.



Fonte: obtida do software Masslynx<sup>T</sup>MS, 2022.

Para os parâmetros de coleção de dados, a intensidade mínima do pico foi escolhida através da análise dos picos de menor intensidade de 5 amostras diferentes, escolhidas aleatoriamente. Os testes estão descritos na Tabela 3, e com base nas análises foi determinada a intensidade mínima de 30000.

Tabela 3: Relação Amostra x Intensidade.

Modo positivo		Modo negativo	
Amostra	Intensidade	Amostra	Intensidade
p001	84800	p004	35800
p010	228000	p014	91100
p020	61800	p024	99500
p030	54800	p034	96300
p040	29300	p044	111000

Fonte: própria autora, 2022.



Posteriormente a esses parâmetros iniciais, proseguiu-se para a seleção de massa, cuja menor massa escolhida foi definida em 50,00 Da. Este parâmetro especifica o limite inferior do intervalo de massa sobre o qual o MarkerLynx detecta marcadores, enquanto a maior especifica o limite superior que foi de 1000,00 Da. Além disso, a tolerância de massa foi 0,01 Da. Este parâmetro especifica a precisão de massa dos dados adquiridos e para escolha do valor no *software*, recomenda-se definir a tolerância para duas vezes a precisão de massa do instrumento. Os parâmetros de pico foram deixados no método padrão do *software*. A janela de massa, especifica a janela de massa que os picos espectrais são considerados o mesmo marcador, entre diferentes amostras. O *software* recomenda que para instrumentos TOF utilize valores de 0,02 a 0,05 Da, por isso foi definida em 0.05 Da. Quanto a janela de TR foi 0.30 min. Este parâmetro especifica a janela de tempo de retenção em que os picos são considerados o mesmo marcador em diferentes amostras. O *software* recomenda valores em torno de 0,20 min. A Figura 7 mostra os parâmetros do método adotado para o tratamento de dados obtido no modo positivo.

Figura 7: Parâmetros do método adotado para o tratamento de dados obtidos no modo positivo.

Method	Property	Value
Method parameters	Function	1
<input type="checkbox"/> Internal standards	Analysis Type?	Peak Detection
Int Std	Initial Retention Time	0.40
<input type="checkbox"/> Mass exclusion list	Final Retention Time	9.55
<input type="checkbox"/> Model mass list	Low Mass	50.00
<input type="checkbox"/> Elemental composition method	High Mass	1000.00
Imported Method	XIC Window (Da)	0.01
	Use relative retention time?	<input checked="" type="checkbox"/> NO
	<input type="checkbox"/> Apex Track Peak Parameters	
	Peak Width at 5% Height (seconds)	<input checked="" type="checkbox"/> 1.00
	Peak-to-Peak Baseline Noise	<input checked="" type="checkbox"/> 0.00
	Apply Smoothing?	<input checked="" type="checkbox"/> NO
	<input type="checkbox"/> Collection Parameters	
	Marker Intensity threshold (counts)	30000
	Mass window	0.05
	Retention time window	0.30
	Noise elimination level	<input checked="" type="checkbox"/> 0.00
	Deisotope data?	<input checked="" type="checkbox"/> YES

Fonte: obtida do software Masslynx<sup>T</sup>M<sup>S</sup>, 2022.

Os parâmetros do tratamento de dados obtidos no modo negativo (Figura 8) foram escolhidos da mesma forma que os parâmetros do modo positivo.

Figura 8: Parâmetros do método adotado para o tratamento de dados obtidos no modo negativo.

Method	Property	Value
Method parameters	Function	1
<input type="checkbox"/> Internal standards	Analysis Type?	Peak Detection
Int Std	Initial Retention Time	0.36
<input type="checkbox"/> Mass exclusion list	Final Retention Time	9.70
<input type="checkbox"/> Model mass list	Low Mass	50.00
<input type="checkbox"/> Elemental composition method	High Mass	1000.00
	XIC Window (Da)	0.01
	Use relative retention time?	<input checked="" type="checkbox"/> NO
	<input type="checkbox"/> Apex Track Peak Parameters	
	Apply Smoothing?	<input checked="" type="checkbox"/> NO
	<input type="checkbox"/> Collection Parameters	
	Marker Intensity threshold (counts)	35000
	Mass window	0.06
	Retention time window	0.35
	Noise elimination level	<input checked="" type="checkbox"/> 0.00
	Deisotope data?	<input checked="" type="checkbox"/> YES

Fonte: obtida do software Masslynxs™ MS, 2022.

Para avaliar a análise cromatográfica e qualidade do tratamento de dados, foram selecionados 3 brancos (b001, b002 e b003), 3 replicatas (27a 27, 27b) e 3 amostras (p001, p028 e p050) distintas e analisados estatisticamente pela análise de PCA.

#### 4.4.2 Análise estatística multivariada

Os dados brutos tratados, incluindo a área, TR e massa/carga ( $m/z$ ) foram exportados do *software* Masslynxs™ MS em .xlxs (formato de leitura do Excel) e importados no *software* SIMCA-P<sup>+</sup> 12.0 (Umetrics, Umeå, Sweden) e normalizados por unidade de variância. O conjunto de dados foi analisado por PCA e PLS-DA (do Inglês *Partial Least Squares Regression - Discriminant Analysis*). A partir do PLS-DA foram consideradas as variáveis importantes para a projeção (VIPs) com valores superiores a 2, e que se relacionassem tanto positivamente quanto negativamente com o grupo de amostras dos pacientes. Os metabólitos com  $VIP > 2$  desreplicados foram analisados individualmente através da análise estatística univariada usando teste t de student no Microsoft Office Excel 2007. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .

#### 4.4.3 Desreplicação

A desreplicação foi realizada usando a biblioteca online do HMDB versão 4.0 (The Human Metabolome Database, <https://hmdb.ca/>). O nível de confiança da identificação dos compostos foi dois, de acordo com a Metabolomics Standards Initiative (MSI), devido à avaliação da presença e descrição dos fragmentos MS dos principais compostos desreplicados

(CREEK et al., 2014; SPICER; SALEK; STEINBECK, 2017; SUMNER et al., 2007). As fórmulas moleculares geradas foram verificadas manualmente, bem como os fragmentos gerados nos espectros de fragmentação. A presença de adutos, os cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  foram considerados nos dados do modo positivo e os ânions  $\text{I}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{S}^-$  e  $\text{Br}^-$  foram considerados nos do modo negativo de análise. A abundância relativa de isótopos  $M + 2$  nos espectros foi analisada para confirmar manualmente a possível presença ou ausência de adutos como de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Br}^-$ . O limite de erro  $m/z$  máximo permitido foi fixado em 10 ppm.

#### 4.5 PROCESSAMENTO DE DADOS – MS DIAL

Além do tratamento utilizando o software Masslynx<sup>T</sup> M<sup>M</sup>MS, todos os dados MS<sup>E</sup> de todas as amostras de soro dos pacientes e controles foram tratadas usando o software MS DIAL para ambos os modos ESI-EM<sup>+</sup> e ESI-EM<sup>-</sup>.

##### 4.5.1 Definição dos métodos de tratamento de dados – MS DIAL

Os dados brutos também foram processados no *software* MS DIAL versão 4.70. Para a coleta de dados foram utilizadas tolerância MS<sup>1</sup> (0,05) e tolerância MS<sup>2</sup> (0,1). Para detecção de pico foram utilizadas altura mínima de pico (amplitude de 5000) e largura de fatia de massa (0,1 Da). Os parâmetros de deconvolução foram valor da janela sigma (0,7) e corte de abundância MS/MS (70 de amplitude). Para alinhamento dos dados foram utilizados tolerância de tempo de retenção (0,3 min) e tolerância MS<sup>1</sup> (0,015 Da para modo negativo e 0,025 para modo positivo). A pesquisa de adutos para os dados de detecção de massa no modo positivo incluiu  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e  $[\text{M}+\text{K}]^+$  e para o modo negativo, foram  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$ ,  $[\text{M}+\text{Cl}]^-$  e  $[\text{M}+\text{Br}]^-$ .

##### 4.5.2 Desrepliação

A desrepliação foi realizada usando bancos de dados químicos científicos integrados ao *software* MS DIAL versão 4.70. Os dados processados foram exportados diretamente para a ferramenta MS FINDER versão 3.52 para desrepliação dos compostos. Para buscar a presença potencial de adutos, os cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  foram incluídos no modo positivo e os ânions  $\text{I}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{S}^-$  e  $\text{Br}^-$  foram incluídos no modo negativo. A abundância relativa

de isótopos  $M + 2$  nos espectros foi analisada separadamente para confirmar a possível presença ou ausência de adutos. Assim como no processamento pelo *software* anterior, o nível de confiança de MS da identificação dos compostos foi de nível dois, de acordo com a Metabolomics Standards Initiative (MSI), devido à comparação de fragmentos de EM de metabólitos desreplcados com os de banco de dados, (Sumner et al., 2007; Creek et al, 2014; Spicer, Salek e Steinbeck, 2017). Cada fórmula molecular gerada e com seus respectivos espectros  $MS^2$  foram comparados manualmente com o banco de dados HMDB versão 4.0 (The Human Metabolome Database, <https://hmdb.ca/>).

#### 4.5.3 Análises estatísticas

Os dados brutos tratados no MS-DIAL foram analisados no *software* Metaboanalyst 5.0 (Montreal, QC, Canadá). Uma planilha do excel gerada no MS-DIAL foi importada no Metaboanalyst para realizar as análises estatísticas univariada e multivariada. Desta forma, os dados foram normalizados pela mediana (transformação logarítmica) e escalonados centrados na média antes da análise multivariada não supervisionada e supervisionada. Depois disso, a impressão digital metabólica foi realizada pelas análises estatísticas não supervisionadas usando a análise de PCA e mapas de calor. Posteriormente, os dados foram supervisionados por meio da análise de PLS-DA, supervisionada em controle e pacientes com DP.

Os íons com VIPs e Coeficientes de Correlação positivos (Coef) do PLS-DA foram usados para avaliar a diferença metabólica de amostras ativas e inativas (Chagas-Paula et al., 2015; Cragg e Pezzuto, 2016; Xi et al., 2015; Yuliana et al., 2011). O valor de  $R^2$  foi usado para avaliar o ajuste do método. Para validar o modelo PLS-DA,  $Q^2$  foi determinado como parâmetro de robustez do modelo e o teste de permutação ( $n=1000$ ) foram aplicados como método de validação interna para garantir a ausência de overfitting. As variáveis foram analisadas individualmente através da análise estatística univariada usando teste t de student. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .

A análise de curva *receiver operating characteristics* (ROC) e a área abaixo da curva, do inglês *area under the ROC curve* (AUC) foi realizada para validar metabólitos individuais dereplicados indicados como potenciais marcadores diferencias entre pacientes com DP e controles (CHANG et al., 2022). Para análise de ROC e AUC, a planilha, com as variáveis e suas respectivas  $m/z$ , TR e área foi importada através do software MetaboAnalyst 5.0 (Montreal, QC, Canadá). Os dados foram normalizadas pela mediana, transformados por log

(base 10) e escalonados centralizados pela média. Além disso, antes das análises clássicas da curva ROC univariada os dados foram escalonados por algoritmos de autoescalamento.

#### 4.6 ANÁLISE DAS VIAS METABÓLICAS

As vias metabólicas nas quais os metabólitos desreplicados e pontencias marcadores diferenciais entre pacientes com DP e controles, bem como seus respectivos papéis biológicos foram acessadas por análise de enriquecimento utilizando o *software* MetaboAnalyst 5.0 (Montreal, QC, Canadá). As técnicas de enriquecimento são muito importantes para a compreensão de sistemas biológicos complexos, pois elas reduzem a complexidade dos dados, auxiliam na melhor interpretação e compreensão dos sistemas biológicos e ajudam a gerar hipótese (MARCO-RAMELL *et al.*, 2018).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 ANÁLISES UPLC-ESI-QTOF-EM

A técnica de ESI-EM tem sido utilizada por pesquisadores em todo o mundo para a determinação da massa de várias moléculas, inclusive de biomoléculas de maneira rápida e eficaz. Pela determinação da massa pode-se deduzir muitas informações estruturais, como por exemplo, a sequência de aminoácidos de um peptídeo ou enzima, ou quais fragmentos moleculares foram gerados em uma reação orgânica de fase gasosa. Além disso, o ESI-EM requer pouca quantidade de amostra, sendo uma técnica eficaz, sensível e confiável (CHEN *et al.*, 2019).

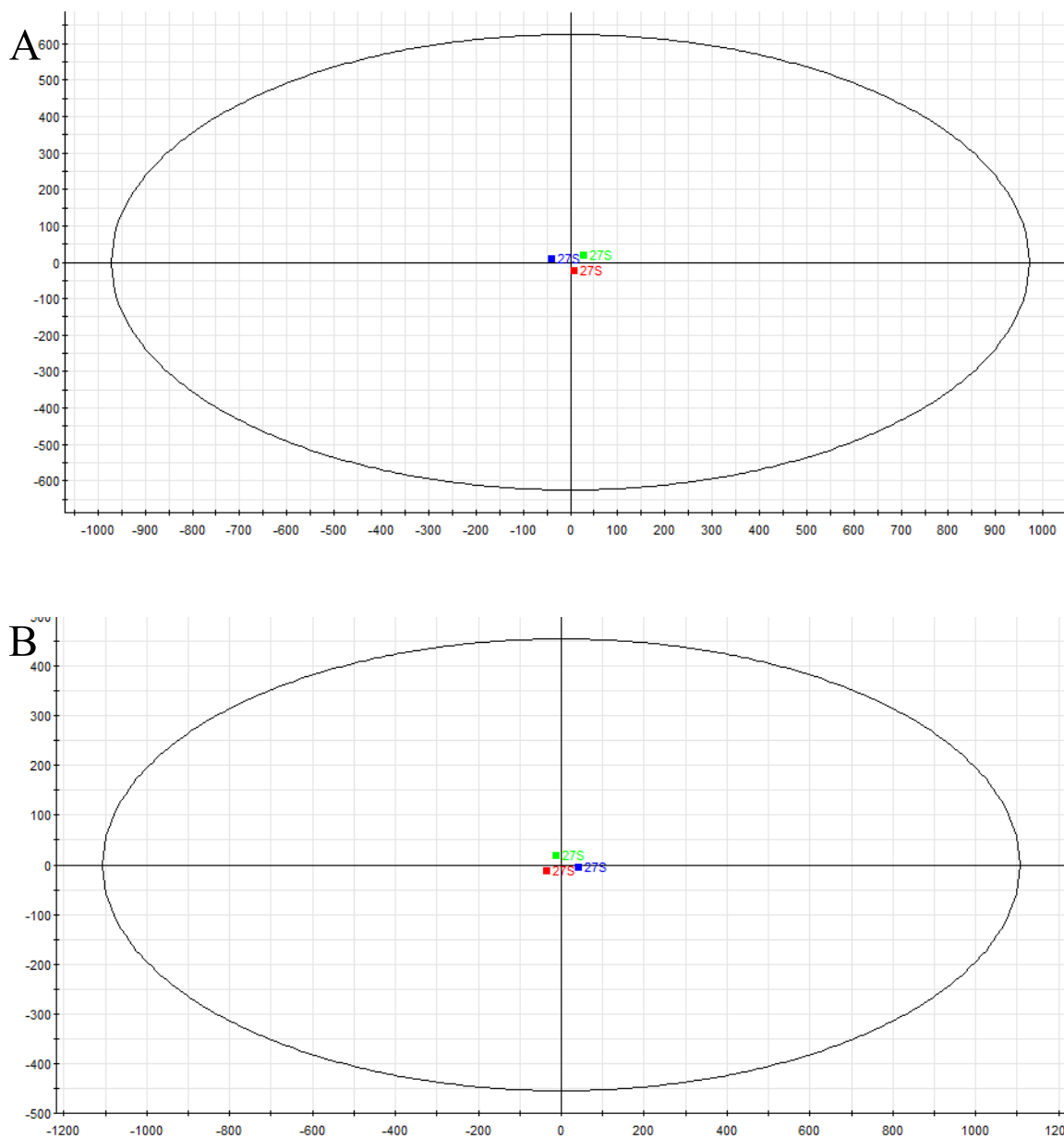
A técnica de UPLC apresenta grandes vantagens para desenvolvimento de métodos robustos e reprodutíveis, além de ser capazes de analisar amostras biológicas complexas, como as que contêm centenas de metabólitos (IGLESIAS, 2013; VIANT; SOMMER, 2013). Dessa forma, nesse projeto o emprego da técnica de UPLC-ESI-QTOF-EM foi capaz de fornecer um método rápido e consistente de análise de compostos químicos presentes no soro de pacientes com DP, e por meio da aquisição de dados MS<sup>E</sup>, estratégias de dereplicação e abordagens metabolômicas não direcionadas, foi possível a correlação de importantes biomarcadores relacionados a doença.

## 5.2 PROCESSAMENTO DE DADOS - MASSLYNXS<sup>TM</sup> MS

No software Masslynxs<sup>TM</sup> MS, para avaliar se a análise cromatográfica e o tratamento de dados eram adequados, foram analisados 3 controles, que foram injetados no início, meio e fim da sequência de amostras em UPLC-ESI-QTOF-EM. A reprodutibilidade foi verificada através de dados correspondentes (área, TR e  $m/z$ ) nos diferentes cromatogramas demonstrados nos Apêndices A e B e por análises de PCA como demonstrado na Figura 9.

As replicatas analisadas ficaram próximas entre si no PCA e com valor de  $R^2$  de 1 para ESI EM<sup>+</sup> e ESI EM<sup>-</sup>. O parâmetro  $R^2$  é conhecido como *goodness of fit*, que é traduzido como a qualidade do ajuste, esse varia de 0 a 1, em que valor próximo ou igual a 1 indica um modelo perfeito e próximo ou igual a zero indica nenhum tipo de ajuste (ERIKSSON L., JOHANSSON E., KETTANEH- WOLD N., 2008), concluindo método usado para as análises se apresentou adequado, o que trouxe segurança e confiabilidade para o prosseguimento do processamento de dados.

Figura 9: *Score plot* do teste de reprodutibilidade (A) modo positivo e (B) modo negativo com com as 3 replicatas.



Fonte: obtida do software Masslynx<sup>T</sup>MMS, 2022., 2022.

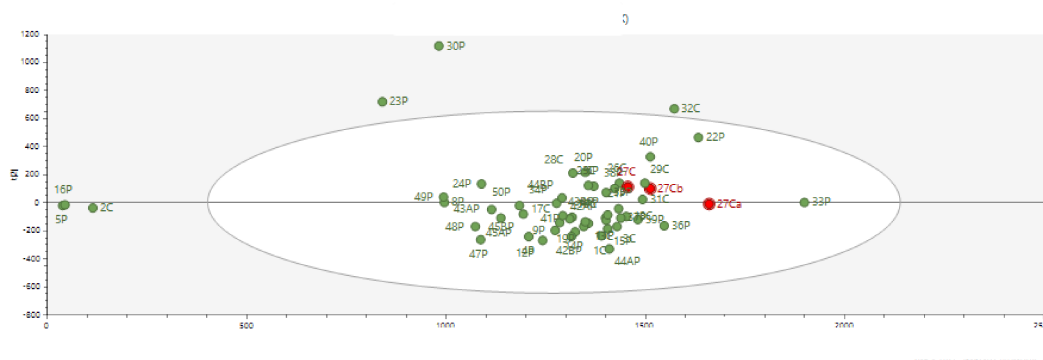
Após a avaliação de reprodutibilidade, a etapa subsequente do tratamento de dados foi realizar uma análise com todas as amostras (n=54) em que 6789 variáveis foram detectadas, sendo 5063 no modo ESI MS<sup>+</sup> e 1726 no modo ESI MS<sup>-</sup>, sendo excluídos 30 picos do branco. Os dados metabolômicos tratados (TR, *m/z* e área) foram exportados (.csv) para interpretação dos dados por meio de modelos de análise estatística multivariada, por meio do uso da PCA e da PLS-DA.

### 5.2.1 Análise estatística multivariada supervisionada e não supervisionada

Após o tratamento dos dados no Masslynx<sup>TM</sup> MS, foi realizada uma análise exploratória dos dados que foram importados do Masslynx, feita através do gráfico de *score plot* da análise estatística multivariada não supervisionada de PCA. Esse gráfico agrupa as amostras de acordo com suas maiores similaridades. Portanto, os gráficos de PCA representam a separação mais significativa do ponto de vista estatístico.

A Figura 10 mostra o gráfico de *score plot* do modelo de PCA para os grupos controle e pacientes com DP com os dados obtidos na análise em UPLC-QTOF-ESI-EM após tratamento no Masslynx<sup>TM</sup> MS. Como observado no gráfico do PCA algumas amostras do paciente aparecem misturadas com as amostras do controle, evidenciando alta complexidade na distinção química entre os grupos. Também podemos observar a presença de 6 *outliers*, sendo 4 amostras do grupo paciente e 2 *outliers* do grupo controle. Esse modelo de PCA apresentou um  $R^2$  de 0,805 e, de acordo com a literatura, o modelo desenvolvido por ter  $R^2 > 0.5$ , pode ser considerado bem ajustado e capaz de reduzir a complexidade dos dados sem perder significamente as informações (CHAGAS-PAULA, DANIELA A. *et al.*, 2015; KATCHBORIAN-NETO *et al.*, 2020).

Figura 10: Gráfico de *score plot* do modelo de PCA



Fonte: obtida do software SIMCA-P<sup>+</sup> 12.0, 2022.

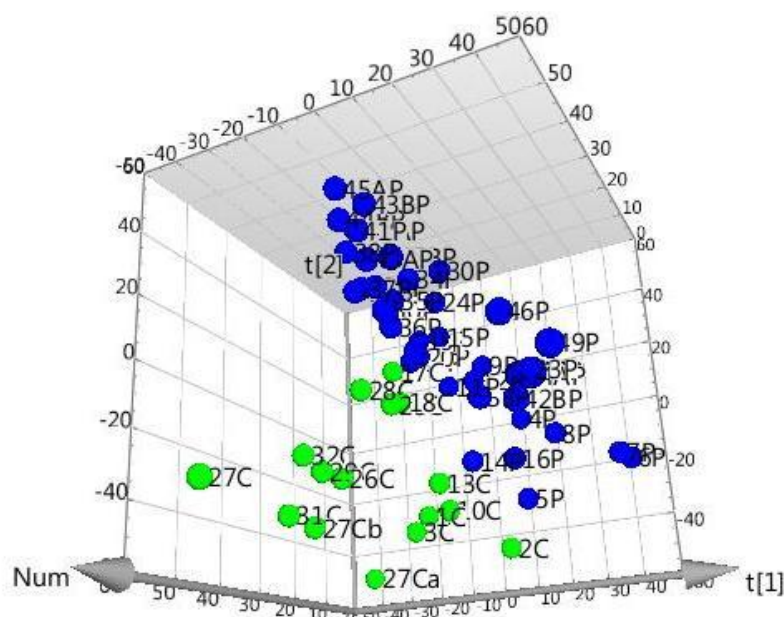
Amostras C são do grupo controle e P do grupo paciente. Amostras destacadas em vermelho são as replicatas, que ficaram próximas umas das outras em relação as demais amostras.

A variabilidade dos dados, ou seja, diferença entre os dois grupos de análise, foi avaliada através da análise supervisionada PLS-DA. A Figura 11 mostra o gráfico de *score plot* no modelo de PLS-DA, para o grupo paciente e controle, construído a partir dos dados



obtidos na análise em UPLC-ESI-QTOF-EM. A partir desse *score plot* em 3D do PLS-DA pode-se observar uma separação bem definida entre o grupo paciente e o grupo controle. O que significa que existem diferenças estatísticas na composição desses dois grupos.

Figura 11: Gráfico *Score plot* em 3D do modelo de PLS-DA com as amostras dos pacientes em azul e dos controles em verde. Modelo com 2 componentes e valores de  $R^2$  0.758 e  $Q^2$  0.564.

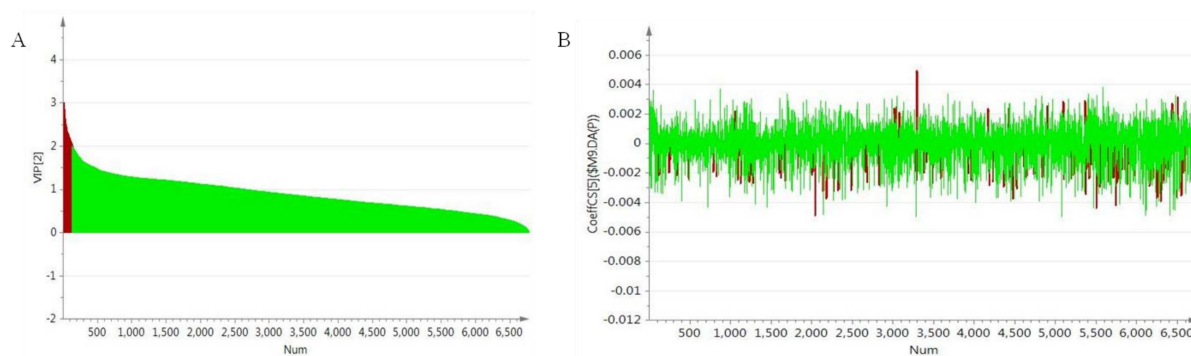


Fonte: obtida do software SIMCA-P<sup>+</sup> 12.0, 2022.

Os modelos estatísticos multivariados são avaliados através dos parâmetros estatísticos  $R^2$  e  $Q^2$  que são importantes ferramentas para avaliar seus respectivos desempenho e capacidade preditiva. Por sua vez, o parâmetro  $Q^2$  é proveniente da validação cruzada, conhecido como *goodness of prediction*, podendo ser traduzido como qualidade de predição, esse indicador é efetivo e útil, pois estima o poder preditivo do modelo e, assim como o valor de  $R^2$ , valores de  $Q^2 > 0,5$  são considerados métricas suficientes para estudos metabolômicos que envolvam amostras complexas (ERIKSSON L., JOHANSSON E., KETTANEH- WOLD N., 2008). Assim, o modelo PLS DA apresentou boa qualidade de ajuste e boa predição, uma vez que apresentou um valor de  $R^2$  igual a 0,758 e um valor de  $Q^2$  igual a 0,564, respectivamente. Além da ausência de ‘*overfitting*’, ou conhecido como “excesso de ajuste”, pois os valores de métricas de  $R^2$  e  $Q^2$  não são distantes, sendo assim, é possível concluir que o modelo metabolômico construído tem robustez suficiente para a determinação de biomarcadores nas amostras de pacientes com DP.

A partir do modelo PLS-DA foram selecionadas variáveis com VIPs maiores que 2, sendo esses os mais significantes para a separação dos grupos. Do total de 6789 variáveis, apenas 129 possui  $VIP > 2$ , a Figura 12A mostra em vermelho as variáveis com  $VIP > 2$ . Dessas 129 variáveis apenas 12 são correlacionadas positivamente com os pacientes, o restante é correlacionado negativamente com este grupo. A Figura 12B, demonstra bem isso, em vermelho as variáveis com  $VIP > 2$ , as variáveis acima da linha do zero são correlacionadas positivamente com o grupo paciente e abaixo são correlacionadas negativamente a este grupo, sendo por sua vez positivamente correlacionada ao grupo controle.

Figura 12: Gráfico A demonstra os valores de VIP para os variáveis, sendo que em vermelho apresentam  $VIP > 2,0$  e em verde  $VIP < 2,0$ . Já o gráfico B mostra a distribuição dos VIPs  $> 2,0$  (em vermelho) no conjunto total, sendo que aqueles correlacionados positivamente com o grupo paciente estão acima da linha do zero, e os correlacionados negativamente estão abaixo da linha do zero.



Fonte: obtida do software SIMCA-P<sup>+</sup> 12.0, 2022.

### 5.2.2 Desrepliação

Dentre as 129 variáveis com  $VIP > 2$  estatisticamente correlacionadas (negativamente ou positivamente) com o grupo paciente, foi possível desrepliar até o presente momento 14, com maior grau de confiança, como demonstrado na Tabela 4. Houve análises de comparação com dados da literatura de íons fragmento nos espectros de massas, como exemplificado na Tabela 4, na coluna de  $MS^2$ . Além, disso, muitos das variáveis não anotados podem ser ainda desconhecidos, pois não foram encontrados *hits* em bancos de dados espectrais. Desta maneira, esses podem ser potenciais biomarcadores para DP e merecem atenção para o desenvolvimento de análises futuras.

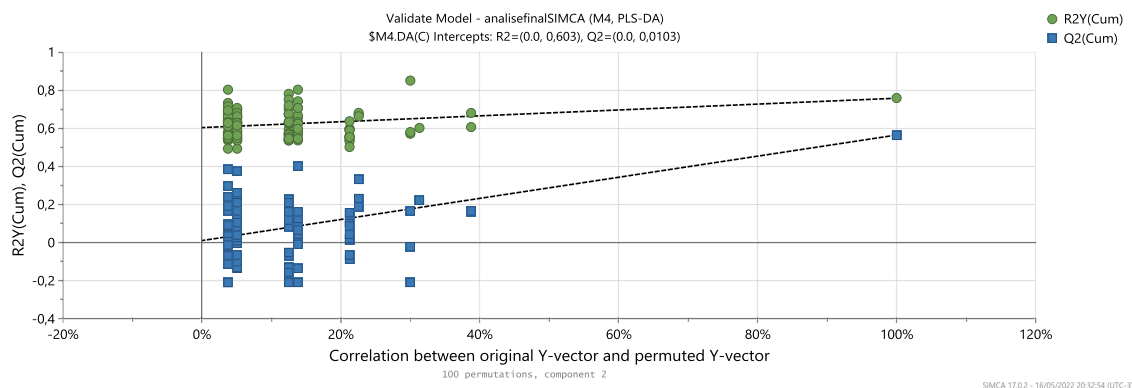
Tabela 4: Metabólitos com VIP &gt; 2 desreplicadas.

Anotação	Fórmula molecular	TR	(m/z)	MS <sup>2</sup>	Ífit de confiança (%)	erro (mDa)	Coefficiente de correlação	Teste T
derivado monossacarídeo	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> Cl	0.5093	215.032	184.0903	99.69	-0.4	0.002892	0.00262684
3-O-metildopa	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>4</sub>	1.3783	210.077	122.0371	99.99	0.1	0.002928	0.00000092
lisofosfatidiletanolamina	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>6</sub> P	8.5401	466.33	283.2642	71.71	0.6	-0.002037	0.00545605
esfingosina	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>2</sub>	6.1001	300.29	264.2691	96.28	-0.3	-0.001132	0.01977001
Ergotioneína	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	0.5955	230.095	213.0692	99.52	-1.3	-0.002748	0.00838714
ácido piroglutâmico	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	1.0674	130.05	84.0444	100	-0.3	-0.001961	0.00523823
N-lactoilfenil-alanina	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub>	2.7372	236.092	147.0452	100	0.1	-0.002108	0.01187555
N-lactoil-leucina	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub>	2.5655	202.106	130.0862	99.38	-0.1	-0.00244	0.01028634
ácido málico	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	0.6214	133.014	79.9586	100	0.5	-0.00297	0.00099187
ácido 3-oxoglutarico	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	0.671	145.014	101.0239	99.89	0.1	-0.002222	0.01471919
ácido ascórbico	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	0.6725	175.024	87.0095	100	-0.1	-0.002453	0.00663529
acetil citrato	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub>	0.6699	233.029	171.0287	98.17	0.3	-0.002621	0.00851633
15(S)-HPETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	5.3376	335.222	289.2181	-	-	-0.001804	0.01177352
12-KETE	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	5.3125	319.228	317.2153	-	-	-0.0025405	0.01904076
ácido pipecólico	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	0.6584	130.087	84.08	96.13	-0.4	-0.0049276	0.02126923
1-liso-2-araquidonoil-fosfatidato	C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> O <sub>4</sub>	6.4746	457.235	309.27	-	-	-0.0026405	0.04661857

Fonte: próprio autor, 2022.

Em adição, para a validação do modelo de PLS foi realizado um teste de permutação, este é um dos métodos estatísticos mais poderosos para confirmar a validade dos dados e, por sua vez, consiste na permutação aleatória entre o valor dos dados dos grupos (controle e pacientes) das amostras. Foram realizadas 100 permutações para esse modelo e os valores dos interceptos obtidos são mostrados na Figura 13. Nos testes de permutação o limiar para R<sup>2</sup> e Q<sup>2</sup> é baseado no valor dos pontos onde as linhas de regressão tocam o eixo vertical do gráfico. É desejável que R<sup>2</sup> e Q<sup>2</sup> cruzem o eixo Y abaixo de 0,4 e 0,05, respectivamente (AHN *et al.*, 2015).

Figura 13: Plotagem do teste de permutação do modelo PLS-DA, construído com base no perfil metabólico de pacientes com PD e grupo controle. A validação do modelo foi realizada com 100 permutações.



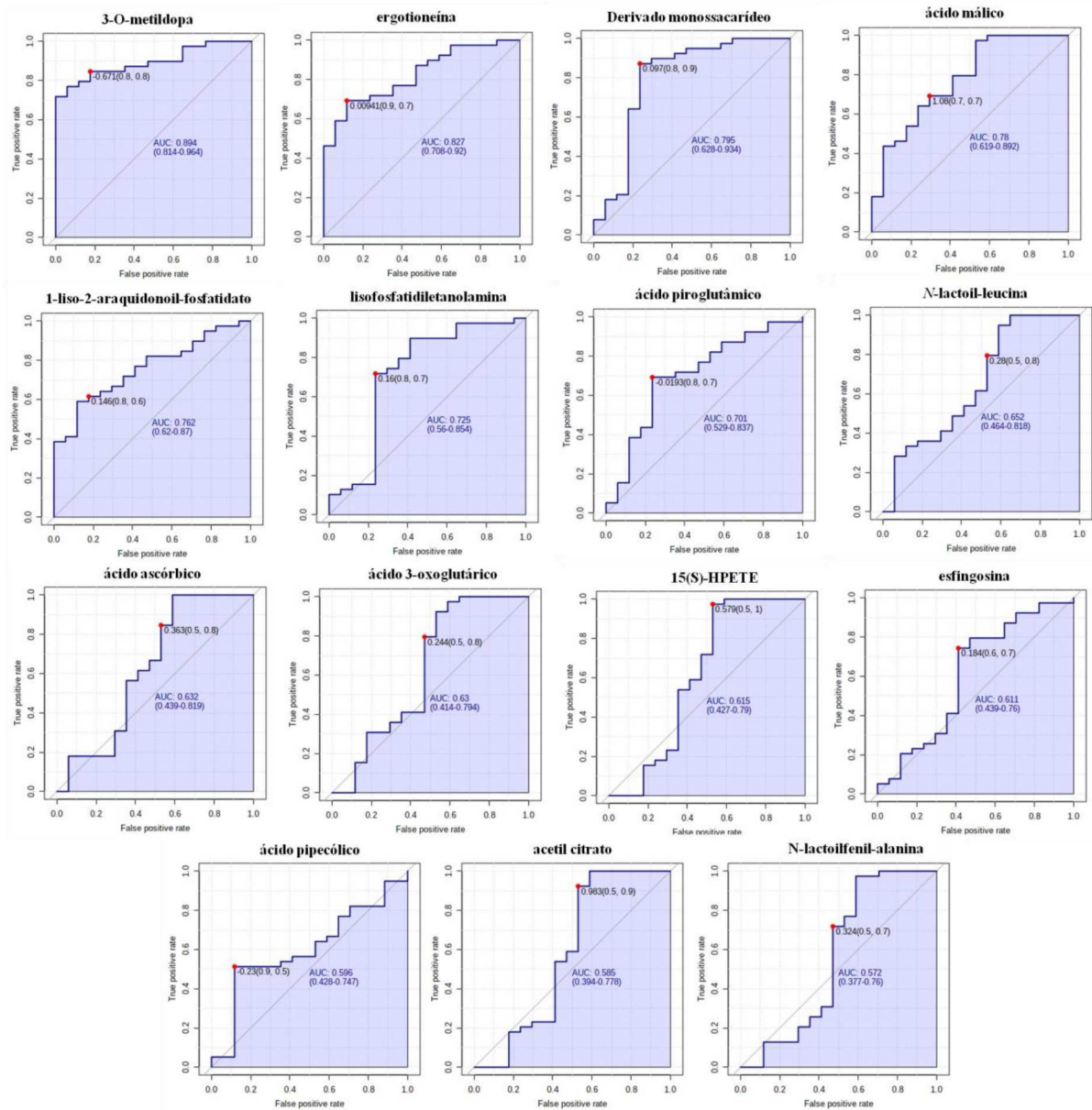
Fonte: obtida do software SIMCA-P<sup>+</sup> 12.0, 2022.

No *software* do Metaboanalyst, após a seleção das variáveis anotadas, existe a possibilidade de se fazer uma análise métrica estatística adicional pela curva ROC, do inglês *Receiver Operating Characteristic*. Essa análise é uma das figuras de méritos mais utilizadas na validação e avaliação de desempenho em testes de diagnóstico clínico-médico (XIA *et al.*, 2013), como no caso de amostras de soro de pacientes com DP. Esse teste relaciona a sensibilidade e a especificidade de um único biomarcador e o desempenho do modelo de classificação. Esta curva traça dois parâmetros: a taxa de falsos positivos e falsos negativos. Na prática ROC é uma curva de probabilidade oriunda de uma regressão logística univariada, sendo assim a sensibilidade e a especificidade é referente apenas aos dados gerados para um único biomarcador no estudo, sendo necessária uma curva ROC para cada biomarcador a ser validado (LOPES *et al.*, 2014).

Para fins de contextualização, a sensibilidade é a probabilidade de um teste apresentar resultado positivo em um indivíduo doente, enquanto a especificidade é a probabilidade do teste apresentar resultado negativo em um indivíduo saudável. No gráfico de curva ROC, o canto superior esquerdo (0,1) representa um modelo no qual todos os indivíduos (controle e paciente) são corretamente classificados, ou seja, a sensibilidade e (1-especificidade) possuem valor de corte melhor (PRATI; BATISTA; MONARD, 2008). Em adição, a AUC (área abaixo da curva) é utilizada para verificar a qualidade da curva ROC e medir de fato o desempenho do teste. Essa área varia de 0 a 1 e quanto mais próximo de 1 (100%) mais próximo do ponto (0,1) e, conseqüentemente, maior o poder do teste em discriminar os grupos paciente e controle (PRATI; BATISTA; MONARD, 2008), no caso do presente estudo

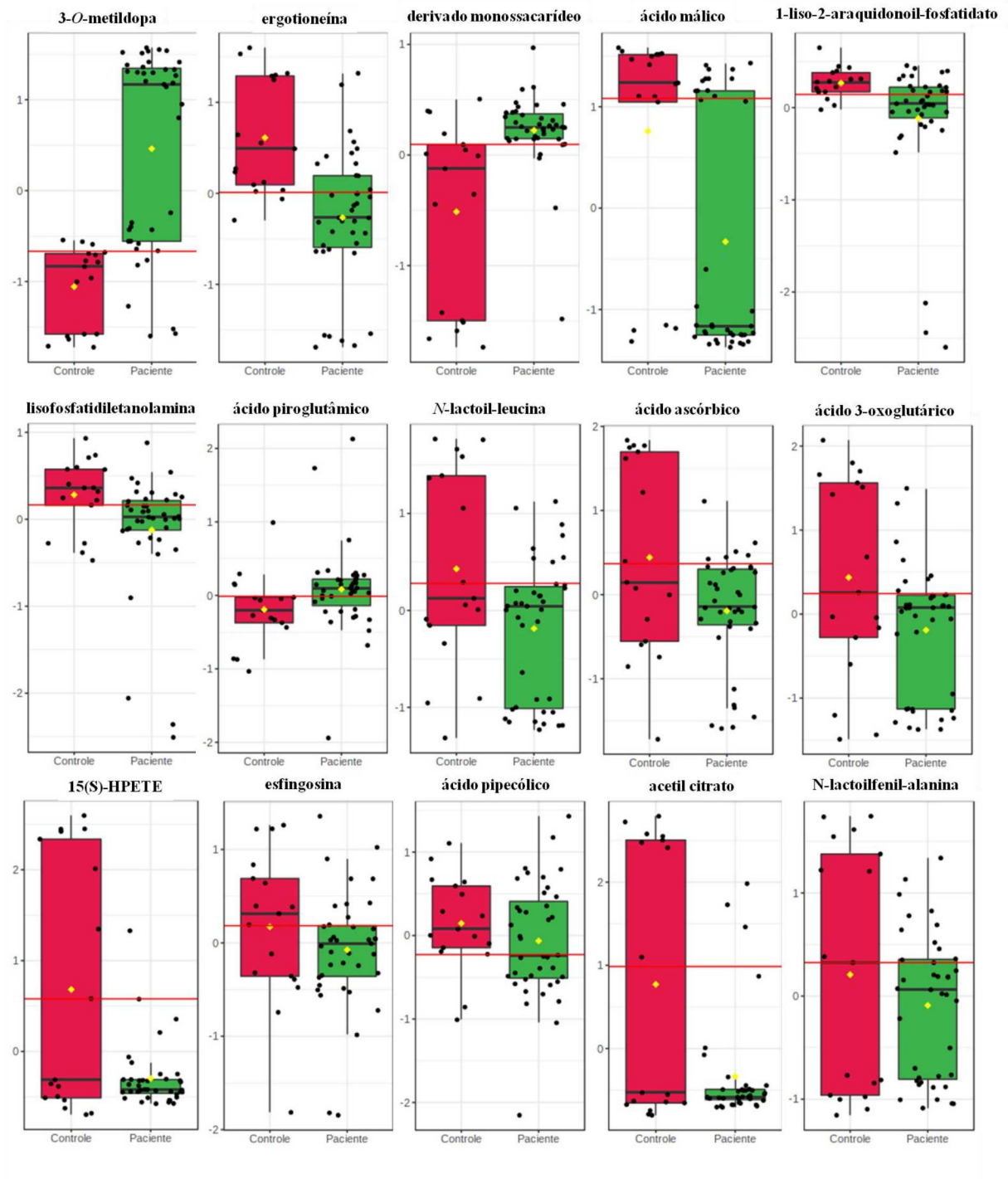
metabolômico, do biomarcador ser significativamente relevante para diferenciar metabólitos no soro de paciente com DP em relação a controles saudáveis.

Assim, os metabólitos significativos encontrados no modelo de PLS-DA foram avaliados como possíveis candidatos a biomarcadores pelo uso de curvas ROC/AUC. Dessa forma, a curva ROC foi plotada para todos os metabólitos desreplicados, com  $VIP > 2$ . A Figura 14 mostra o gráfico da curva ROC/AUC para cada metabólito desreplicado. A figura mostra ainda que dos 16 metabólitos desreplicados apenas o 12-KETE, não teve valores significativos e que os 15 metabólitos com curva ROC/AUC apresentaram valores acima de 0,5. Esse resultado reforça a qualidade discriminante do modelo desenvolvido, dando maior credibilidade aos resultados, pois possuem um bom desempenho em diferenciar os grupos pacientes e controles (MANDREKAR, 2010)



Fonte: obtida do *software* do Metaboanalyst, 2022.

Figura 15: Box plot de área do picos dos metabólitos, significativos na análise ROC/AUC, nas amostras controle e paciente



Fonte: obtida do *software* do Metaboanalyst, 2022.

### 5.2.3 Análise estatística univariada

Apesar dos modelos multivariados apresentar a vantagem de respeitar a variabilidade e a complexidade intrínseca de amostras de natureza biológica, auxiliando na elucidação de relações complexas, lineares ou não lineares (MARASCHIN *et al.*, 2016), ainda assim os riscos de *overfitting* são grandes, ou seja, há a possibilidade de inclusão de mais variáveis que o necessário. Por isso, a utilização de um excesso de parâmetros para explicar um conjunto de dados complexos são comuns, sendo de extrema necessidade o domínio técnico do analista para ajustar corretamente os modelos metabolômicos desenvolvidos (HAWKINS, 2004).

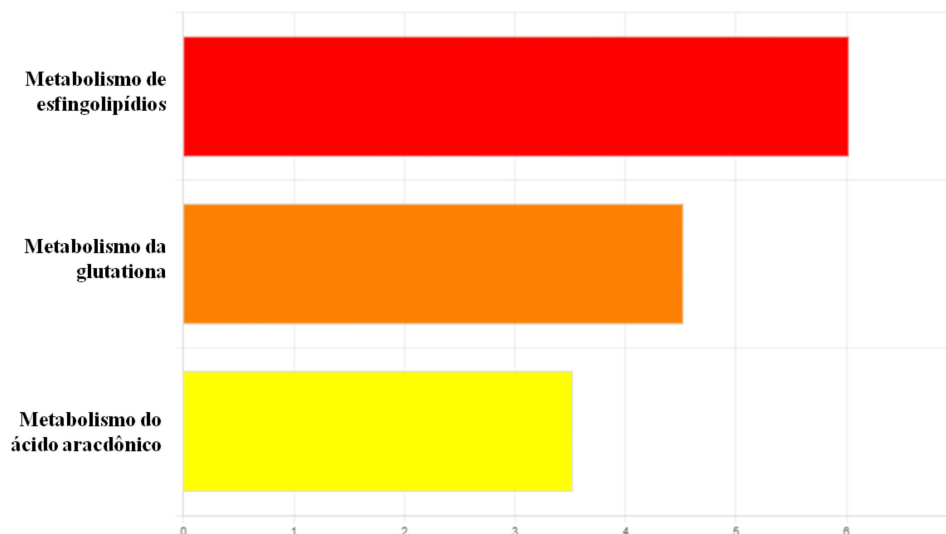
Nesse contexto, a utilização da abordagem univariada apresenta a vantagem de eliminar o *overfitting* em relação à análise multivariada, pois faz uso de métodos estatísticos tradicionais que consideram uma variável por vez. É preciso ter ciência de que cada modelo, seja univariado ou multivariado, possui vantagem e desvantagem, um não exclui o outro e, por isso, sempre que possível, eles devem ser combinados para obter o maior número de informações necessárias (SACCENTI *et al.*, 2014; VINAIXA *et al.*, 2012). Nesse trabalho, para os metabólitos com  $VIP > 2$ , foi feita a análise estatística univariada através do teste T. Na tabela 4, é possível observar que todos os metabólitos dereplicados apresentaram valor de  $p > 0,05$ , mostrando que esses metabólitos quando analisados separadamente apresentam significância estatística, o que corrobora a união das análises.

#### 5.2.4 Análise de vias metabólicas

Após as análises estatísticas, multivariada e univariada, foram realizadas análises de enriquecimento a partir do conjunto de metabólitos com  $VIP > 1$  para identificar de quais vias metabólicas eles fazem parte. Na Figura 16 podemos observar que as principais vias relacionadas a esses metabólitos são: metabolismo de esfingolipídios, metabolismo da glutatona e metabolismo do ácido araquidônico.

Figura 16: Vias metabólicas relacionadas com os metabólitos com  $VIP > 1$  selecionados no PLS-DA.





O ácido piroglutâmico, correlacionado negativamente ao grupo paciente, como podemos observar na Figura 15, está relacionado com a via de metabolismo da glutatona. Este metabólito é um derivado do ácido glutâmico e é o principal intermediário no ciclo de degradação e síntese da glutatona, também chamado ciclo  $\gamma$ -glutamil. Esse ciclo tem como principal função transportar aminoácidos através da barreira hematoencefálica. Nesse processo, o piroglutamato é liberado, o que é essencial, pois estimula os carreadores dependentes de sódio para posterior remoção de aminoácidos deletérios no cérebro, sendo importante para regulação de glutamato cerebral, que pode ser tóxico em baixas concentrações. Alterações nesse ciclo podem ainda diminuir enzimas glutatona, o que pode levar ao estresse oxidativo no tecido cerebral (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ-ARIZA, 2015).

Recentemente, um estudo metabolômico na literatura avaliou a microbiota fecal usando UPLC-EM através de estudos metabolômicos e também mostrou a diminuição do ácido piroglutâmico (VASCELLARI *et al.*, 2020). Além disso, a diminuição desse metabólito no soro também foi demonstrada em pacientes com a doença de Alzheimer, que assim como o PD, é uma doença neurodegenerativa, com característica da presença de grande estresse oxidativo (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ-ARIZA, 2015), corroborando o resultado desse presente estudo, que encontrou ácido piroglutâmico em menores níveis no grupo paciente quando comparado com os níveis do grupo controle.

A via de metabolismo dos esfingolípídeos foi correlacionada nesse estudo com a DP. A esfingosina, metabólito pertencente a essa via e que se mostra diminuída no soro de pacientes com a DP (Figura 15) é uma molécula de sinalização no ambiente fisiológico. Ela é fosforilada na via metabólica dos esfingolípídios por enzimas chamadas esfingosina quinase 1 e 2 (Sphk1 e Sphk2) e a esfingosina-1-fosfato (S1P). Dentro desse contexto, foi descrito na

literatura, que camundongos com DP induzida por neurotoxina MPTP, apresentava Sphk2 diminuída no SN quando comparado com grupo o controle. Portanto, os autores concluíram que essa enzima era expressa nas mitocôndrias de neurônios dopaminérgicos (SIVASUBRAMANIAN *et al.*, 2015).

Além disso, a literatura mostra que a expressão de S1P é conhecida por melhorar a função mitocondrial bem como promover a biogênese mitocondrial, que por consequência leva um aumento na produção de adenosina trifosfato (ATP). Um estudo ainda recente mostrou que o uso oral de agonistas não seletivos dos receptores de S1P, fornecem proteção contra a perda de neurônios dopaminérgicos e déficits motores no modelo animal da DP (PÉPIN *et al.*, 2020). Sendo assim, as recentes pesquisas na literatura indicando a baixa expressão no nível enzimático de Sphk2 e S1P em camundongos com DP induzida, podem explicar o fato da esfingosina, uma substância que é metabolizada por essa enzima ter sido encontrada significativamente diminuída no grupo paciente.

Portanto, o presente estudo metabólico corroborou os achados em modelos animais anteriores, contudo, pela primeira vez utilizando amostras de soro pacientes humanos com DP. Vale a pena ressaltar que a esfingosina é constituinte dos esfingolípídeos, uma classe de lipídeos de membrana celular que inclui o fosfolípídeo esfingomielina e que desempenham um papel importante na sobrevivência, proliferação, diferenciação, migração, respostas imunes e apoptose de células neuronais (SIVASUBRAMANIAN *et al.*, 2015). Assim, a redução dos níveis de esfingosina no soro de pacientes com DP pode levar a uma diminuição nos níveis de esfingolípídeos, que têm importantes funções para as células neuronais, assim esse metabólito pode ter um grande potencial terapêutico para a DP.

Devido ao papel importante da neuroinflamação na DP, a via de metabolismo do ácido araquidônico também tem sido amplamente estudada, o que corrobora as análises de enriquecimento desenvolvidas. As isoenzimas lipoxigenases (LOX) catalisam a reação de modificação estereoespecífica do ácido araquidônico nas posições 5, 12 e/ou 15 e o local onde o oxigênio vai ser inserido define a isoenzima. Essa reação produz o ácido hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE), que é instável e, subsequentemente, é reduzido pela glutatona peroxidase ao ácido hidroxieicosatetraenoico (HETE) mais estável.

Todas as isoenzimas LOX estão expressas no cérebro, inclusive no local afetado pela DP e estudos em modelos de neurodegeneração e inflamação mostraram uma expressão aumentada de LOX no cérebro com o envelhecimento (CHOU; HOLMAN; MANNING-BOG, 2013). Portanto, o ácido araquidônico ao ser oxidado pela LOX, produz mediadores que estimulam a produção de hidroperóxidos lipídicos tóxicos (EROS) e citocinas, que

contribuem para neurotoxicidade na DP. Além disso, essa enzima tem sido envolvida em várias doenças como, diabetes, asma, câncer e mais recentemente também em doenças neurodegenerativas devido o seu papel na neuroinflamação (CHOU; HOLMAN; MANNING-BOG, 2013).

SEET *et al.*, 2010 demonstrou um aumento dos níveis plasmáticos de HETEs em pacientes com a DP, corroborando que o aumento dos produtos da oxidação do ácido araquidônico (Figura 16) pode ter, de fato, uma correlação direta com a DP devido à geração de produtos lipídicos que podem causar dano oxidativo (SEET *et al.*, 2010). Sendo assim, aumento dos níveis plasmáticos de HETEs evidenciado por nosso estudo, corrobora com estudos anteriores refletindo uma correlação direta com o aumento do estresse oxidativo em pacientes com DP.

Além das vias metabólicas relacionadas acima, outros metabólitos que não foram relacionados com essas vias são importantes para a análise metabolômica. Das 16 substâncias, apenas 2 foram correlacionadas positivamente ao grupo paciente, isso devido ao fato de assumirem coeficientes de correlação positivo. São a 3-*O*-metildopa e um derivado de monossacarídeo, como *D*-manose, *D*-glicose, *D*-frutose e *D*-galactose, que através do padrão de fragmentação não foi possível identificar o monossacarídeo específico.

Todos os pacientes com DP nesse estudo faziam o uso da levodopa, que é a terapia de escolha para o seu tratamento (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020). A levodopa, em tecidos periféricos, é metabolizada através da COMT em seu principal metabólito, a 3-*O*-metildopa (ADAMIAK *et al.*, 2010). Dessa forma, esse achado mostra que o método usado é adequado para análise do soro de pacientes com a DP quando comparado com o grupo controle. Estudos de ADAMIAK *et al.*, 2010 demonstraram que mesmo a levodopa sendo administrada juntamente com um inibidor da COMT tem-se uma metabolização desse fármaco em tecidos periféricos. Além disso, esse estudo mostrou que pacientes em estágios mais avançados apresentam maiores concentrações plasmáticas de 3-*O*-metildopa (ADAMIAK *et al.*, 2010). Portanto, o fato da 3-*O*-metildopa ser um metabólito originado da levodopa exógena, ela não é biomarcador da DP, apesar do coeficiente de correlação positivo. Contudo, apenas confirma o uso do tratamento por levodopa nos pacientes com DP e corrobora a qualidade do estudo metabolômico desenvolvido, por detectá-lo como substância diferencialmente encontrada em amostras do paciente.

Curiosamente, os demais metabólitos da Tabela 4, lisofosfatidiletanolamina, ergotioneína, ácido piroglutâmico, *N*-lactoilfenil-alanina, *N*-lactoil-leucina, ácido 3-oxoglutarico, ácido ascórbico, acetil citrato, 12-KETE e ácido pipecólico, apresentam

coeficiente correlação negativo para o grupo paciente e positivamente correlacionados ao grupo controle, ou seja, esses metabólitos estão presentes no soro dos indivíduos controles e estão presentes em menor concentração ou não estão presentes no grupo paciente.

Nesta perspectiva, o metabólito de lisofosfatidiletanolamina faz parte da classe dos glicerofosfolipídios e da subclasse dos fosfolipídios de éter e faz uma ligação alquenila. Devido a esse tipo de ligação, eles também são chamados de plasmalogênios. Esses plasmalogênios apresentam diversas funções como componente estrutural da membrana, reservatório para mensageiros naturais, fusão da membrana, transporte de íons, efluxo de colesterol e antioxidante. Eles estão presentes em quase todos os tecidos e correspondem cerca de 20% da constituição total dos fosfolipídios de membrana. A etanolamina faz parte do plasmalogênios predominantes em tecidos de mamífero (MAWATARI *et al.*, 2020). A lisofosfatidiletanolamina é uma etanolamina e um intermediário chave no metabolismo lipídico, sendo um fosfolipídio de membrana que tem um papel importante em eventos de fusão de membrana (PICCA *et al.*, 2019). As mitocôndrias são uma importante fonte de fosfatidiletanolamina que está envolvida em importantes funções celulares, auxiliando no dobramento de proteínas de membrana (BOGDANOV; UMEDA; DOWHAN, 1999) e estimulação da fosforilação oxidativa (TASSEVA *et al.*, 2013).

O estudo metabolômico desenvolvido indicou uma correlação entre a diminuição do nível de plasmalogênios com o soro de pacientes com DP. Essa constatação estatística pode estar atrelada a importantes alterações nas condições fisiológicas normais do tecido cerebral de pacientes com DP. Isto é devido ao grande dano oxidativo que espécies reativas de oxigênio podem causar em intermediários chave no metabolismo de fosfolipídio de membrana, inevitavelmente levando a um aumento significativo da degradação no nível de plasmalogênios (ONG; FAROOQUI; FAROOQUI, 2010). A propósito, recentes investigações de MAWATARI *et al.* (2020) mostraram que a suplementação *in vivo* com fosfolipídios de éter por via oral melhorou os sintomas clínicos de pacientes com DP e, também levou a um aumento desses fosfolipídios no sangue periférico (MAWATARI *et al.*, 2020). Desta maneira, a sobrevivência neuronal no sistema nervoso central (SNC) é mantida através de uma rede complexa de interações de vias de sinalização que pode ser perturbada em resposta a diversos estresses celulares e os fosfolipídeos de éter podem ser úteis na terapêutica e sobrevivência neuronal.

A ergotioneína é outro metabólito que se mostrou diminuído no grupo paciente quando comparada com o grupo controle pela análise de PLS-DA. HATANO *et al.* (2016b) também encontrou resultados semelhantes em suas análises metabolômicas. A ergotioneína é

um metabólito de um aminoácido de ocorrência natural (HALLIWELL; CHEAH; TANG, 2018) que demonstrou atividade antioxidante *in vitro* e tal atividade foi associada a capacidade da ergotioneína promover a expressão de proteínas antioxidantes (HSEU *et al.*, 2020). Outro estudo demonstrou a diminuição da ergotioneína em idosos saudáveis (>60 anos) e em idosos (idade média 70,3 anos) (CHEAH *et al.*, 2016). Ela é interessante no estudo da DP, uma vez que o dano oxidativo no cérebro desempenha um importante papel em doenças neurodegenerativas.

O ácido 3-oxoglutárico é outro metabólito que a análise estatística multivariada de PLS-DA indicou como diminuído significativamente no grupo paciente em relação ao controle. Este metabólito se trata de um ácido orgânico que está envolvido em diversas vias metabólicas, sendo comumente encontrado em leveduras e fungos. Um estudo metabolômico recente demonstrou a diminuição desse ácido na urina de pacientes com transtorno do espectro autista e essa diminuição foi associada à presença de flora intestinal prejudicial (CHEN *et al.*, 2019). Entretanto, ainda não existem estudos que possam estar relacionados à diminuição desse metabólito com a DP, sendo esse trabalho possivelmente o primeiro estudo a indicar a correlação deste metabólito com essa doença.

O ácido ascórbico também demonstrou estar positivamente correlacionado ao grupo controle e negativamente ao grupo paciente. O ácido ascórbico, popularmente conhecido como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel essencial, distribuída em todos os tecidos e a deficiência dessa vitamina é comum em idosos e crianças. Ela é importante tanto para a fisiologia do sistema nervoso, quanto para a inibição do estresse oxidativo, reduzindo a peroxidação lipídica e eliminando radicais livres no organismo (ZHAO *et al.*, 2019). A vitamina C tem potencial para o tratamento da DP, pois ela é amplamente distribuída em áreas do cérebro ricas em neurônios, sendo transportada para outras regiões dele através do SVCT2 (transportador de vitamina C tipo 2) e sua forma oxidada através de transportadores de glicose (GLUT 1 e GLUT 3) (ZHAO *et al.*, 2019).

Um estudo *in vitro* mostrou que o tratamento crônico com ácido ascórbico mostrou efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo em um modelo de envelhecimento do hipocampo (LEE, KYUNG HEE *et al.*, 2021). Além disso, o metabolismo anormal de dopamina leva à formação de produtos de estresse oxidativo que podem levar à formação de proteínas anormais na DP (ZHAO *et al.*, 2019). E assim, o ascorbato pode ter efeito significativo na  $\alpha$ -sinucleína, reduzindo a  $\alpha$ -sinucleína-Cu<sup>2+</sup>, que é responsável por acelerar a formação de agregados tóxicos para  $\alpha$ -sinucleína-Cu<sup>+</sup>. Isso estabelece um ciclo redox em que o O<sub>2</sub> é reduzido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MORETTI; FRAGA; RODRIGUES, 2017). Um estudo mostrou que

o ácido ascórbico diminui a formação de  $\alpha$ -sinucleína, evitando a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio em leveduras (FERNANDES *et al.*, 2014). Por sua vez, a superexpressão de  $\alpha$ -sinucleína aumenta a sensibilidade dos neurônios dopaminérgicos ao dano oxidativo, o que pode levar a consequências como disfunção mitocondrial, sendo que isso pode estar relacionado aos mecanismos nos quais o ácido ascórbico pode ser útil no tratamento da DP (MORETTI; FRAGA; RODRIGUES, 2017).

O ácido málico, assim como o ácido ascórbico se mostrou reduzido no grupo paciente quando comparado ao controle. Esse metabólito também é conhecido por suas propriedades antioxidantes. Um estudo mostrou que o ácido ascórbico e o ácido málico possuem propriedades antioxidantes sinérgicas (HANACHI; SH, 2009), logo esse metabólito poderia ser importante para a terapêutica da DP, uma vez que o estresse oxidativo está envolvido com mecanismos de doenças neurodegenerativas. Um estudo recente também mostrou uma diminuição do ácido málico em pacientes com DP quando comparados com o controle, o que corrobora com os nossos resultados (LI, GEN *et al.*, 2022).

Por fim, a lactolifenilalanina e *N*-Lactoil-Leucina são metabólitos que foram encontrados no soro e correlacionados positivamente com o grupo controle e negativamente com o grupo paciente. Os lactoil aminoácidos são pseudodipeptídeos, formados pela ligação peptídica entre um ácido láctico e uma porção de aminoácido. Os níveis desse tipo de aminoácido no plasma dependem da concentração de lactato e do respectivo aminoácido (JANSEN *et al.*, 2015). Dentro desse contexto, a tirosina e a fenilalanina são aminoácidos envolvidos na rota de síntese da dopamina (TOCZYLOWSKA *et al.*, 2020; WEINGARTEN *et al.*, 2015). Em pacientes com DP, tem-se uma diminuição dos níveis de dopamina, assim como dos seus metabólitos (SCATTON *et al.*, 1982), o que reforça o fato da lactofenilalanina estar negativamente correlacionada no grupo paciente, pois uma vez que há menor estímulo à capacidade de biossintetizar dopamina em pacientes com DP, é esperado um menor nível de seus metabólitos na rota dopaminérgica.

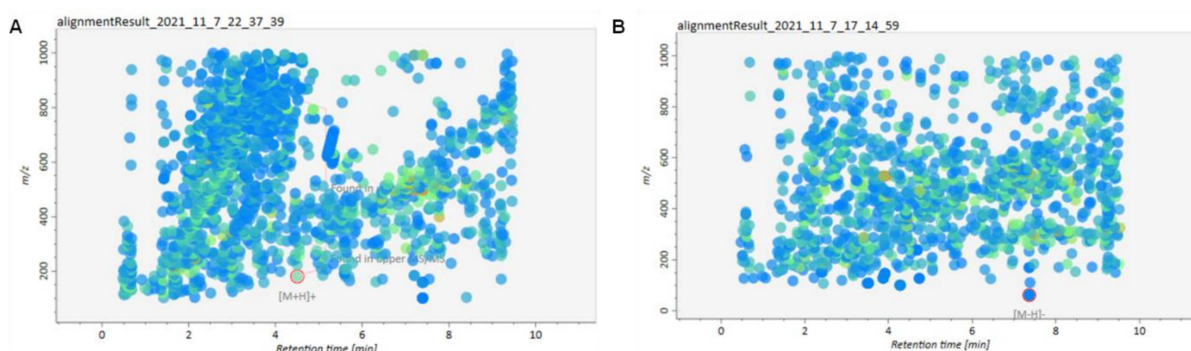
Além disso, aminoácidos de cadeia ramificada, como a leucina são essenciais em várias funções cerebrais importantes. Eles são catabolizados no ciclo do ácido tri-carboxílico para produzir dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD) que é reduzido na respiração mitocondrial. No cérebro esses aminoácidos participam direta ou indiretamente de processos essenciais para a fisiologia normal dele, como a síntese de neurotransmissores e na manutenção do equilíbrio de nitrogênio do ciclo glutamato/glutamina. Estudos anteriores mostraram concentrações reduzidas de leucina no LCR e no plasma de pacientes com a DP quando comparados com o controle (MOLINA *et al.*, 1997). Recentemente, estudos

metabolômicos mostraram maiores níveis desse aminoácido nos controles quando comparados com pacientes com DP (NAGESH BABU *et al.*, 2018; TROISI *et al.*, 2019). Em comparação com o presente estudo, estes dados foram corroborados, visto que a *N*-lactoil-leucina foi encontrada com níveis maiores nos soros do grupo controle e, portanto, correlacionado negativamente com o grupo paciente. Logo, sugerindo que a leucina e seus metabólitos podem ser prováveis biomarcadores promissores para diagnóstico e até mesmo terapêutica da DP.

### 5.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS – MS DIAL

O tratamento de dados de todas as amostras no *software* MS Dial resultou na detecção de 3134 variáveis ( $m/z$ , TR), sendo 1923 no modo ESI MS<sup>+</sup> e 1211 no modo ESI MS<sup>-</sup>, dos quais 63 e 86 picos foram removidos do branco no modo positivo e negativo, respectivamente, como mostrado na Figura 17. Os dados metabolômicos tratados no MS Dial (TR,  $m/z$  e área) foram exportados para a ferramenta do MS FINDER, que é um *software* que auxilia na proposição da estrutura molecular utilizando robustas bibliotecas de espectros de EM (VANIYA *et al.*, 2017).

Figura 17: Visualização 2D dos picos ( $m/z$  e TR) dos resultados do alinhamento evidenciando a distribuição dos metabólitos detectados nos cromatogramas do grupo controle e paciente para o modo de ionização positivo (A) e modo de ionização negativo (B)



Fonte: obtida do *software* MS DIAL, 2022.

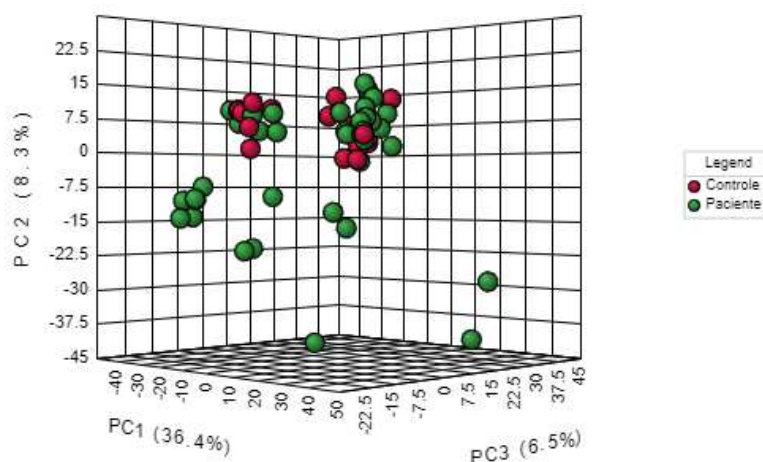
As cores da imagem são proporcionais a área do pico, quanto mais intensa a cor (amarelo a laranja) maior a área do pico, quanto menos intensa a cor (verde a azul) menor a área do pico.

#### 5.3.1 Análise estatística multivariada

Após o tratamento dos dados nos *softwares* MS DIAL e MS FINDER, a razão *m/z* e as respectivas áreas dos picos foram importados para o *software* do Metaboanalyst para execução das análises estatísticas univariadas e multivariadas. Primeiramente foi realizada uma análise exploratória dos dados que foram importados do MS DIAL, feita através do gráfico de *score plot* da análise estatística multivariada não supervisionada de PCA. Esse gráfico agrupa as amostras de acordo com suas maiores similaridades. Portanto, os gráficos de PCA representam a separação mais significativa do ponto de vista estatístico.

A Figura 18 mostra o gráfico de *score plot 3D* do modelo de PCA para os grupos controle e pacientes com DP com os dados obtidos na análise em UPLC-QTOF-ESI-EM após tratamento no MS-DIAL. Como observado no gráfico do PCA algumas amostras do paciente em verde aparecem misturadas com as amostras do controle em vermelho, evidenciando alta complexidade na distinção química entre os grupos. Todavia, alguns pacientes se afastaram bastante da média, indicando potencial diferença na composição química desses pacientes em relação ao grupo controle. Esse modelo de PCA apresentou um  $R^2$  de 0,57.

Figura 18: Gráfico de *score plot 3D* do modelo de PCA

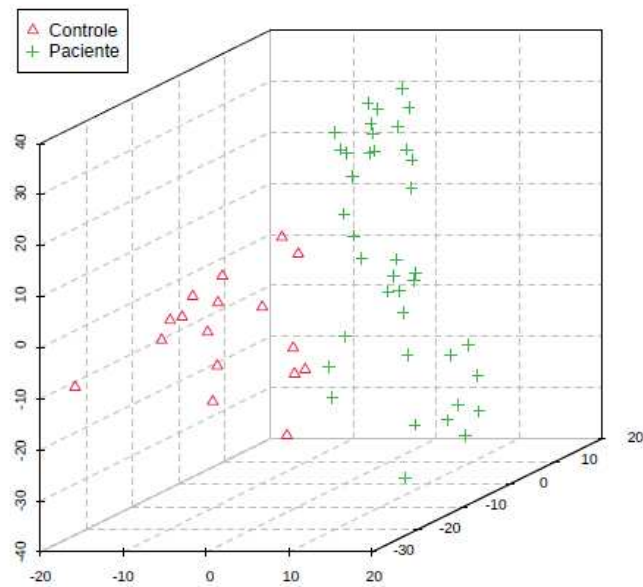


Fonte: obtida do *software* do Metaboanalyst, 2022.

Para melhorar a separação entre os grupos foi utilizada a análise estatística supervisionada de PLS-DA, que é um método de regressão multivariada. Diferentemente do modelo PCA, é um modelo supervisionado, em que são atribuídas as classes para cada amostra (WISHART, 2008), ou seja, especificado se é do grupo paciente ou controle. Foi feito para a análise anterior, utilizando o *software* do SIMCA e dados processados pelo MassLynx. A Figura 19 mostra o gráfico de *score plot* em 3D do modelo de PLS-DA obtidos a partir dos dados dos pacientes com DP e controles.



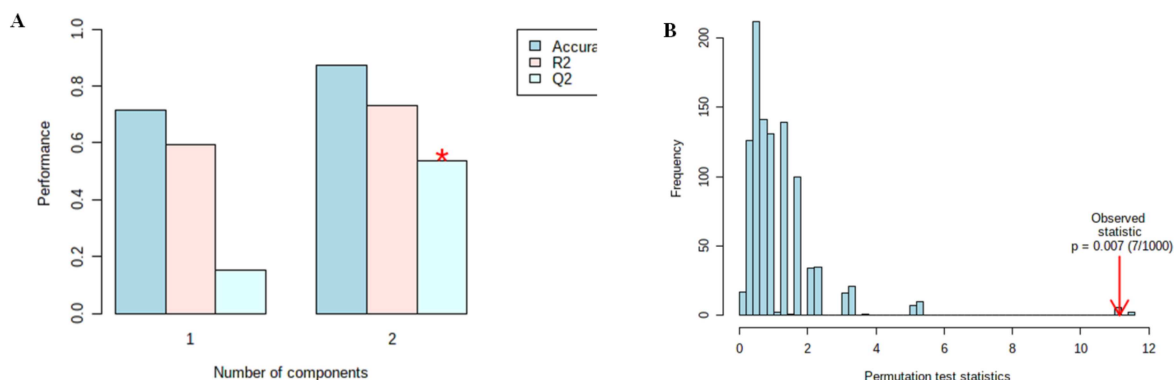
Figura 19: Gráfico de *score plot* 3D do modelo de PLS-DA



Fonte: obtida do *software* do Metaboanalyst, 2022.

O modelo de PLS-DA foi submetido a um teste de validação cruzada, assim como na análise anterior no SIMCA, pois esse parâmetro é utilizado para testar a previsibilidade do modelo estatístico, além de auxiliar na escolha do modelo ideal do método (RUBINGH *et al.*, 2006). Assim como o  $R^2$ , o  $Q^2$  descreve a qualidade do método. A Figura 20 (A) mostra o gráfico de validação cruzada do PLS-DA, no qual o resultado dos testes evidenciaram valores satisfatórios, com apenas dois componentes, em que o valor de acurácia obtido foi de 0,875 e os valores aproximados de  $R^2$  e  $Q^2$  são respectivamente 0,73 e 0,54. O valor de acurácia, assim como, os valores de  $R^2$ ,  $Q^2$  e acurácia variam entre 0-1 e valores mais próximos de 1 mostra um modelo mais robusto e confiável. Portanto, pode-se concluir que o modelo desenvolvido apresentou valores satisfatórios para os 3 parâmetros, uma vez que os valores foram maiores que 0,5 para todas as métricas

Figura 20: Gráfico de validação cruzada (A) desempenho da acurácia, R2 e Q<sup>2</sup> dos componentes 1 e 2. Teste de permutação (B) do modelo de PLS-DA.



Fonte: obtida do *software* do Metaboanalyst, 2022.

### 5.3.2 Desrepliação

A partir do PLS-DA foram selecionadas variáveis com valores de VIPs maiores que 1, sendo esses estatisticamente mais significativos para a separação dos grupos. Das 3134 variáveis detectadas na análise após o processamento utilizando o MS-DIAL foram selecionados 603 com  $VIP > 1$ , sendo possível desrepliar, utilizando o MS-FINDER, 29 metabólitos. Dos 29 metabólitos desreplificados 12 foram confirmados MS/MS e destes 3 são correlacionados com o grupo paciente e 9 com o grupo controle. Na Tabela 5 estão demonstrados os metabólitos com  $VIP > 1$  que foram desreplificados com o auxílio do MS-FINDER e que foram confirmadas por análise manual dos espectros de MS<sup>E</sup>, na Figura 21 pode-se observar os espectros de massas de 2 metabólitos em comum, 3-*O*-metildopa e ácido pipecólico, nos dois tratamentos de dados (Masslynx e MS-DIAL), assim como seus respectivos fragmentos.

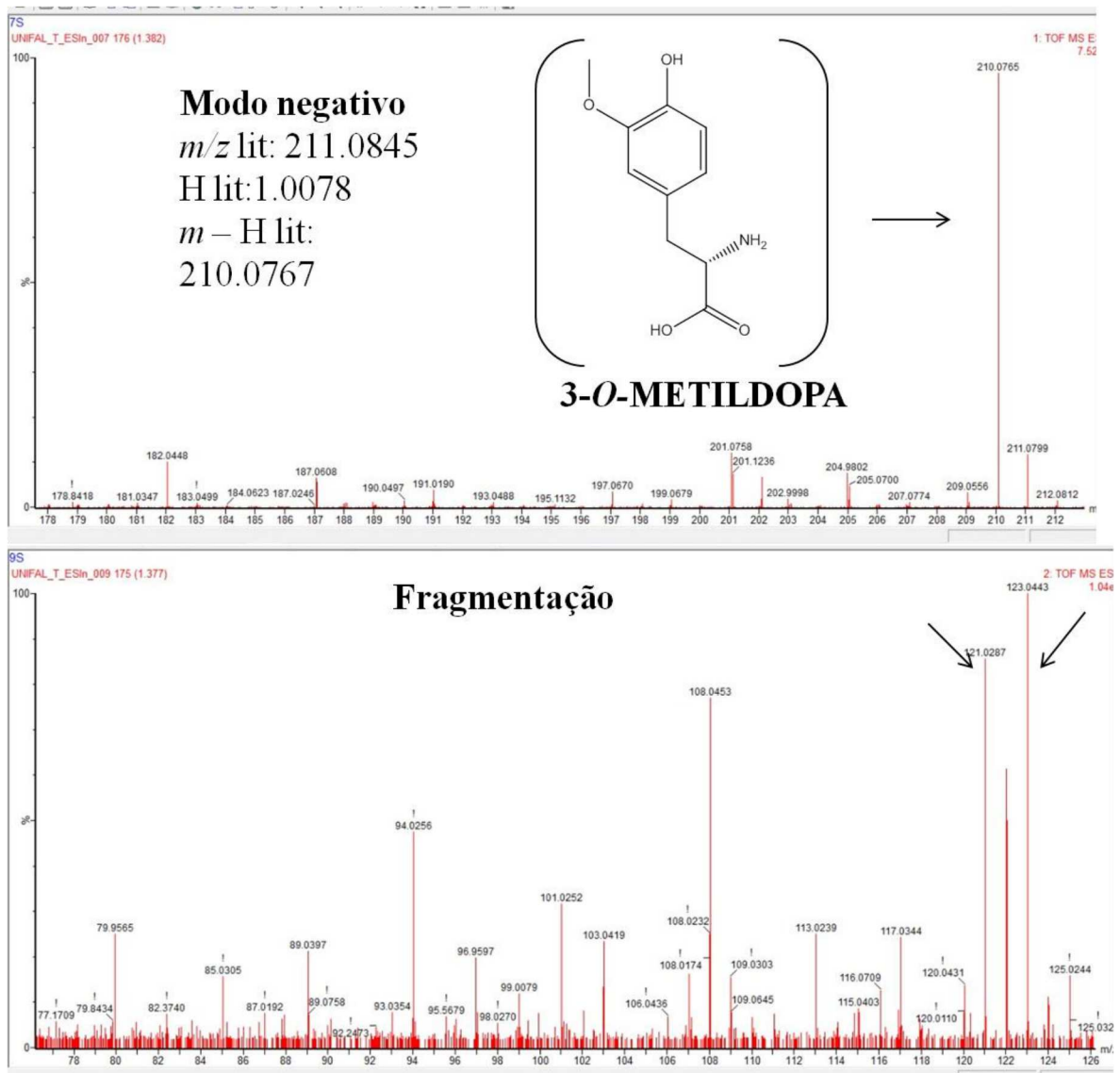
Tabela 5: Metabólitos com  $VIP > 1$  desreplificados.

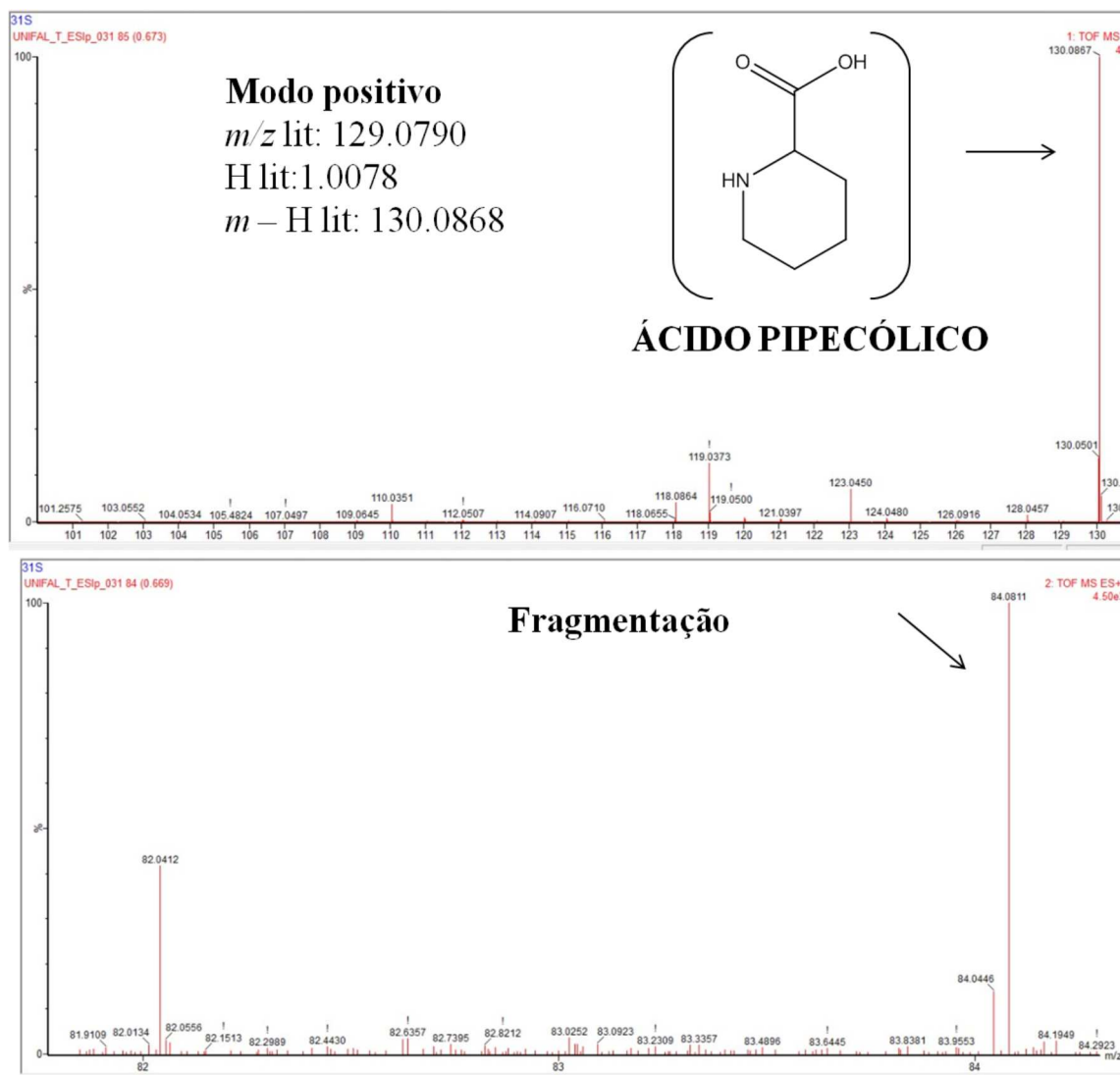
Anotação	Fórmula molecular	m/z	Erro de massa	TR	VIP	AUC	p Valor	Grupo	Aduto
1-liso-2-araquidonoil-fosfatidato	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> O <sub>7</sub> P	457.2348	-0.00083	6.475	3.2878	0.878	0.000023	Controle	[M+H] <sup>+</sup>
<i>N</i> -docosahexaenoil GABA	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub>	414.3009	-0.00063	5.637	3.1929	0.878	0.000043	Controle	[M+H] <sup>+</sup>
ácido vanilático	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	211.06	0.000397	1.841	3.0543	0.797	0.000102	Paciente	[M-H] <sup>-</sup>
3- <i>O</i> -metil-a-metildopa	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub>	210.07689	-	1.378	2.8167	0.768	0.000396	Paciente	[M-H] <sup>-</sup>
conjugado de glicina e ácido quenodesoxicólico	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>5</sub>	448.30652	0.000347	5.784	2.3067	0.824	0.00447	Controle	[M-H] <sup>-</sup>

Cafeína	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	195.08868	-0.00035	2.024	2.1676	0.774	0.00783	Controle	[M+H] <sup>+</sup>
2-trans,4-cis-decadienoilcarnitina	C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>	312.21753	-0.00057	3.356	1.9867	0.738	0.01535	Controle	[M+H] <sup>+</sup>
ácido piperólico	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	130.0863	-0.00045	0.655	1.9867	0.709	-	Controle	[M+H] <sup>+</sup>
Paraxantina	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	181.07207	-0.0002	1.684	1.9852	0.747	0.015433	Controle	[M+H] <sup>+</sup>
15(S)-HETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	319.2276	0.000368	7.669	1.5902	-	0.054758	Controle	[M-H] <sup>-</sup>
12-KETE	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	319.22717	-0.00043	5.249	1.0713	-	-	Controle	[M+H] <sup>+</sup>
15(S)-HPETE	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	335.22208	0.000683	5.341	1.0522	0.718	-	Controle	[M-H] <sup>-</sup>

Fonte: própria autora, 2022.

Figura 21: Espectros de massas da 3-*O*-metildopa, no modo negativo, e do ácido piperólico, no modo positivo e seus respectivos espectros de fragmentação.



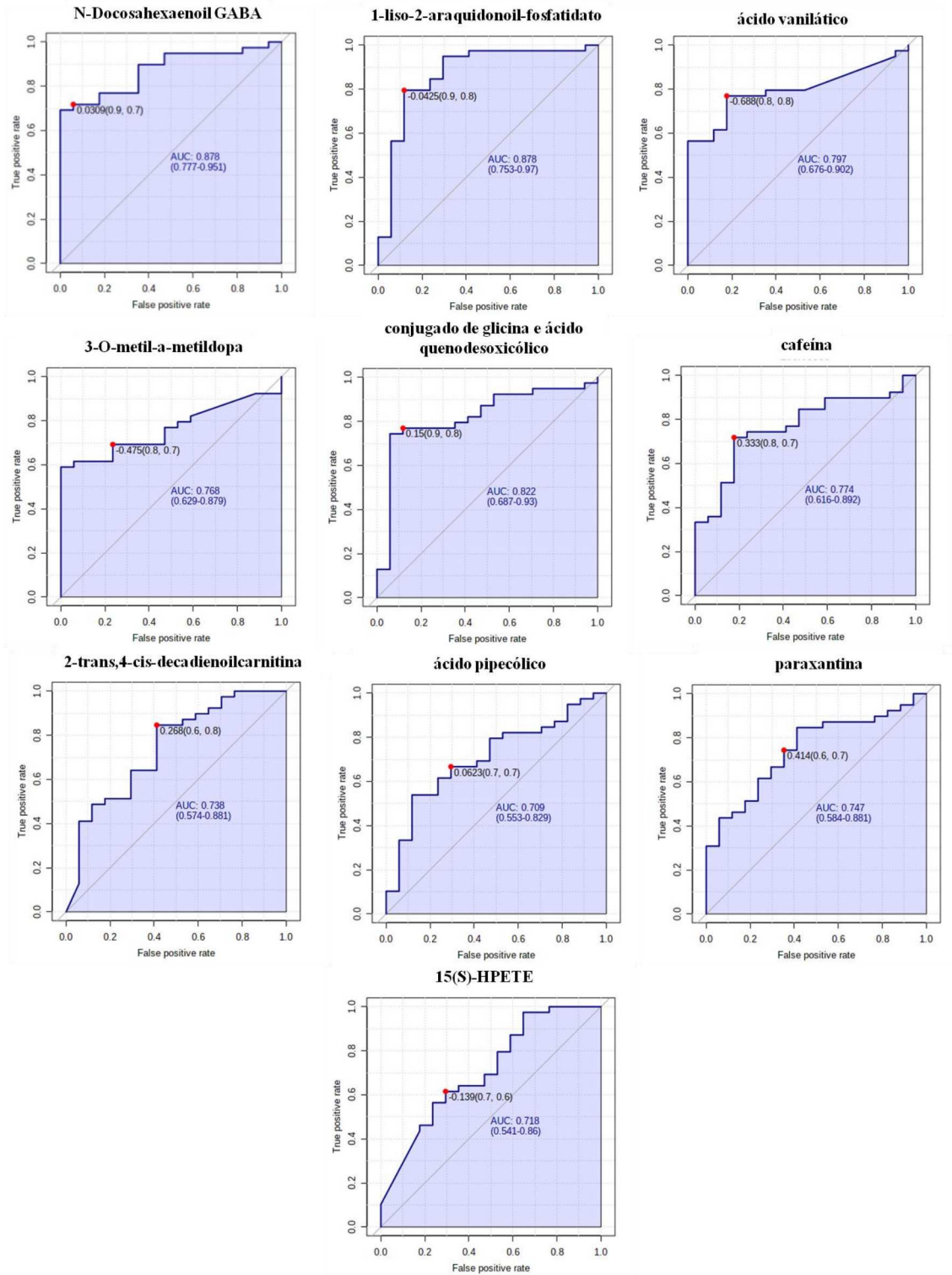


Em adição, foi realizado também um teste de permutação. O teste de permutação do Metaboanalyst é expresso em valor de  $p$  e é uma validação interna que tem confiabilidade quando o valor de  $p < 0,05$  (SZYMAŃSKA *et al.*, 2012). O valor de  $p$  encontrado para o modelo de PLS-DA foi de 0,007, como mostrado na Figura 20 (B).

Desta forma, os metabólitos significativamente diferentes entre os grupos pacientes e controles, encontrados pelos modelos de PLS-DA foram avaliados como possíveis candidatos a biomarcadores pelo uso de curvas ROC/AUC. A Figura 22 mostra o gráfico da curva ROC/AUC para cada metabólito com  $VIP > 1$  desreplicado. Além disso, na Figura 22 é possível observar que 10 dos 12 metabólitos tiveram valores de AUC significativos, ou seja, valores maiores que 0,7 e, por isso, 2 metabólitos não apresentaram curva ROC. Os excelentes resultados de AUC encontrados para cada metabólito, reforça a qualidade discriminante do modelo desenvolvido (PLS-DA), dando maior credibilidade aos resultados,

pois possuem uma bom desempenho em diferenciar os grupos paciente e controle (MANDREKAR, 2010).

Figura 22: Gráficos da curva ROC dos metabólitos com VIP > 1.



Fonte: obtida do *software* do Metaboanalyst, 2022.

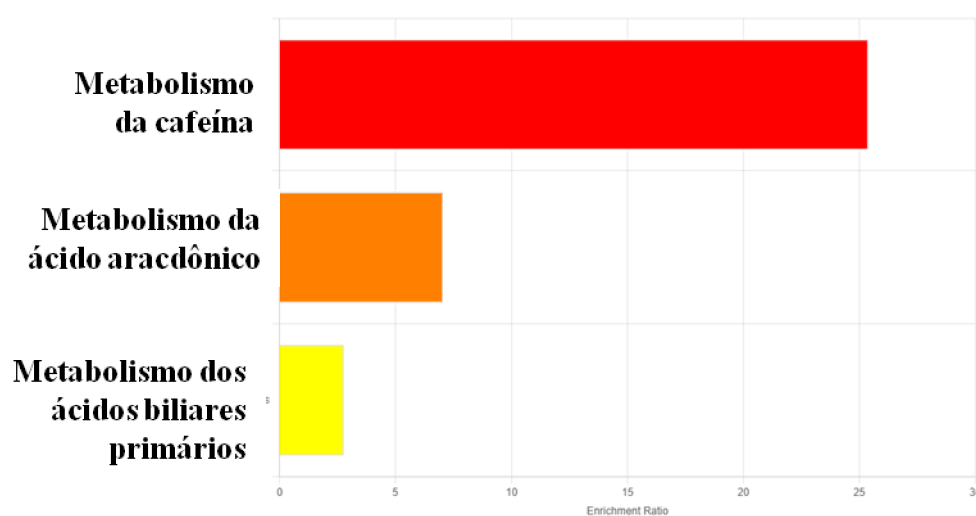
### 5.3.3 Análise estatística univariada

Nesse estudo além de utilizarmos a análise estatística multivariada foi feita também a análise univariada para os dados do MassLynx e MS-DIAL, a fim de verificar a relevância de cada metabólito desreplcado individualmente. Realizou-se, então, o teste T e como podemos observar na Tabela 5, três dos metabólitos com  $VIP > 1$  selecionados através do PLS-DA não apresentaram valores de  $p < 0,05$  e por isso não foram considerados significativos, dentro das condições do nosso estudo.

### 5.3.4 Análise de vias metabólicas

Após a análise estatística multivariada e univariada, foram realizadas análises de enriquecimento a partir do conjunto de metabólitos com  $VIP > 1$  para identificar quais vias metabólicas esses metabólitos participam. Na Figura 23 podemos observar que as principais vias metabólicas relacionadas com esse conjunto de metabólitos são: via de metabolismo da cafeína, metabolismo do ácido araquidônico e biossíntese de ácidos biliares primários. A via do ácido araquidônico também foi relacionada com os metabólitos presentes na análise usando o SIMCA-P<sup>+</sup> 12.0, o que proporcionou a identificação de 5 metabólitos em comum com a análise no Metaboanalyst: 3-*O*-metildopa, 15(*S*)-HPETE, 12-KETE, ácido pipecólico e 1-liso-2-araquidonoil-fosfatidato.

Figura 23: Vias metabólicas relacionadas com os metabólitos com  $VIP > 1$  selecionados no PLS-DA.

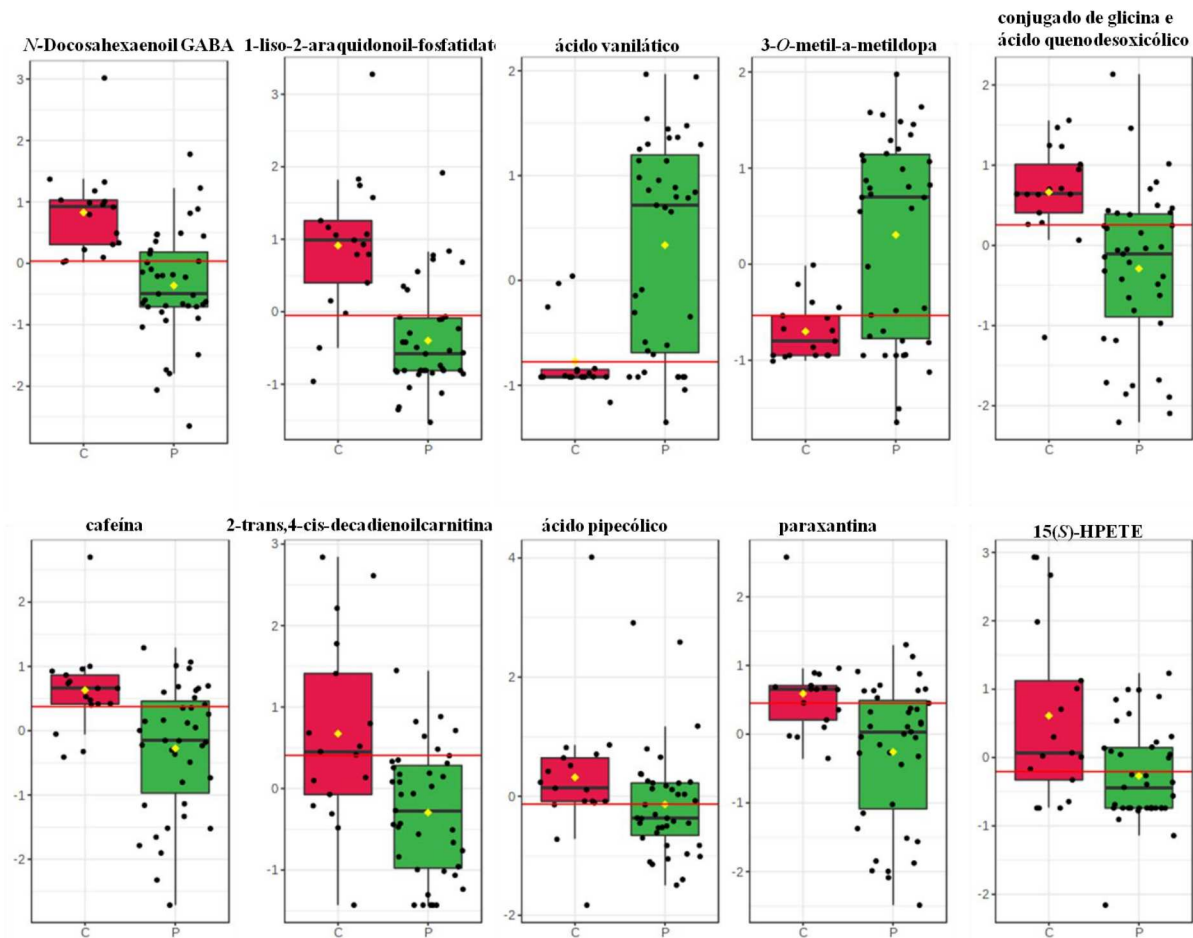


Fonte: obtida do *software* do Metaboanalyst, 2022.

Os níveis de cafeína e paraxantina se mostraram diminuídos nas amostras de pacientes com a DP quando comparados ao controle, como observado na Figura 24. Dentro desse contexto, a cafeína é a substância psicoativa mais consumida no mundo e, junto com outros dimetilmetabólitos como paraxantina e teofilina, são metabólitos antagonistas não seletivos do receptor 2A de adenosina (A2A) (CROTTY *et al.*, 2020). O receptor A2A está co-localizado no corpo estriado e se associa com receptores D2 de dopamina, tendo efeitos opostos na produção de adenilato ciclato e AMPc de modo que os antagonistas de A2A aumentam a sinalização dependente de D2, facilitando respostas mediadas por D2. Foi demonstrado também que em modelos animais de desregulação de DA, os antagonistas de A2A facilitam a sinalização do receptor de DA, normalizando a função motora (SHOOK; JACKSON, 2011). Além disso, estudos mostraram que os receptores de A2A modulava agregação e toxicidade da  $\alpha$ -sinucleína em modelo celular (SH-SY5Y) e que o bloqueio desse receptor resgatou déficits sinápticos e cognitivos em modelos animais da DP (REN; CHEN; CHEN, 2020).

A neuroinflamação está intrinsecamente relacionada à patologia da DP, pois evidências têm mostrado que respostas à neuroinflamação tem um papel importante na neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos. Acrescenta-se que estudos têm demonstrado que a cafeína pode exercer efeito anti-inflamatório, uma vez que já foi demonstrada que ela reduziu a ativação da microglia em animais com inflamação induzida por LPS (BROTHERS; MARCHALANT; WENK, 2010). Desta maneira, melhor controle da resposta neuroinflamatória mediada por microglia associada à DP e capacidade de atenuar o processo inflamatório e a expressão das células microgliais, mesmo quando introduzida nas fases posteriores do processo neurodegenerativo. Esses mecanismos são importantes para demonstrar que a cafeína e seus metabólitos têm uma importante relação com a DP (REN; CHEN; CHEN, 2020).

Figura 24: *Box plot* dos metabólitos significativos na análise ROC/AUC.



Fonte: obtida do *software* do Metaboanalyst, 2022.

Por fim, a via de síntese dos ácidos biliares também foi alterada com significância estatística. Nesse contexto, eles são sintetizados a partir do colesterol através das enzimas do citocromo P450 localizadas no citosol, retículo endoplasmático, mitocôndrias e peroxissomos dos hepatócitos. Atuam primariamente na solubilização de lipídios vindos da dieta e vitaminas lipossolúveis, influenciam os processos metabólicos atuando como moléculas sinalizadoras em receptores de membrana, além de funções secundárias como hormônios esteróides (GRANT; DEMORROW, 2020). Esta via metabólica é bastante complexa, envolvendo uma série de rotas metabólicas e intermediários, sendo que a via dos ácidos biliares vem se mostrando alterada em diferentes estudos na literatura e ainda com resultados contraditórios. Alguns estudos mostram um aumento dos seus níveis em pacientes com a DP quando comparados a controles saudáveis (LI, PEIPEI *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2018),



enquanto outros mostraram a capacidade neuroprotetora (MOREIRA *et al.*, 2017; ROSA *et al.*, 2018). E, portanto, o aumento no nível de alguns ácidos biliares seria desejável para a terapêutica da doença. Em oposição, nesse trabalho, o ácido biliar glicocenodeoxicólico se mostrou diminuído em pacientes com a DP quando comparados ao controle, como observado na Figura 24.

Ademais, em um modelo animal de DP, com camundongos tratados com MPTP, foi observado que os animais que recebiam tratamento com ácido biliar tiveram uma melhora na função motora, capacidade de iniciar movimentos e corrigir tremores. Além disso, os níveis de parkina, uma ubiquitina ligase E3 associada à biogênese mitocondrial, foram diminuídos em camundongos tratados com MPTP e foram atenuados naqueles tratados com ácido biliar antes do MPTP, mostrando uma atividade neuroprotetora desse ácido biliar (ROSA *et al.*, 2018). Outro estudo do mesmo grupo avaliou a morte celular dopaminérgica, estresse oxidativo e EROs, usando o modelo animal de DP induzido por MPTP. Esse estudo mostrou atividade antioxidante do ácido biliar pela prevenção da produção de EROs e pelo aumento da expressão de enzimas citoprotectoras, glutatona peroxidase e heme oxigenase-1 (MOREIRA *et al.*, 2017).

Assim, de maneira geral, a pesquisa da via dos ácidos biliares, seus principais metabólitos e receptores específicos são importantes para o estudo de doenças neurodegenerativas. Além do mais, esses ácidos biliares têm apresentado propriedades neuroprotetoras, bem como a capacidade de permear a barreira hematoencefálica, podendo fornecer propriedades farmacológicas viáveis (GRANT; DEMORROW, 2020).

Além das vias metabólicas mencionadas acima, alguns metabólitos que não foram incluídos nessas vias foram apontados como importantes segundo as análises metabolômicas e estatísticas: os metabólitos 1-liso-2-araquidonoil-fosfatidato, *N*-docosaheptaenoil GABA, ácido vanilático, 3-*O*-metil-a-metildopa (também demonstrada na análise utilizando o SIMCA), 2-trans,4-cis-decadienoilcarnitina e ácido pipecólico. Desses, apenas *N*-docosaheptaenoil GABA, o ácido vanilático e a 3-*O*-metil-a-metildopa são correlacionados positivamente com o paciente, ou seja, o grupo paciente apresentou esses metabólitos aumentados quando comparados com o grupo controle, resultados esses similares ao estudo metabolômico de ZHAO *et al.*, 2018.

Desta forma, o ácido vanilático assim como a 3-*O*-metil-a-metildopa estão envolvidos na via de degradação da *L*-dopa. A *L*-dopa é sintetizada a partir da tirosina pela enzima tirosina hidroxilase e, em seguida, a *L*-dopa formada vai ser metabolizada pela enzima catecol-*O*-metiltransferase para se transformar em 3-*O*-metil-a-metildopa, que por sua vez,

posteriormente é degradada em ácido vanilático (MEISER; WEINDL; HILLER, 2013). Portanto, é possível sugerir que há uma probabilidade de estar ocorrendo uma maior metabolização da *L*-dopa em pacientes com a DP que em indivíduos controles.

Adiante, o ácido pipecólico, um aminoácido cíclico produzido durante a degradação da lisina (BALASHOVA *et al.*, 2018) também se mostrou diminuído no grupo de pacientes com DP. A lisina é degradada a ácido pipecólico nos peroxissomos cerebrais, que são organelas com múltiplas funções, como metabolismo de EROs, oxidação de ácidos graxos, síntese de éter lipídico e sais biliares e, transporte de colesterol. Além disso, a disfunção peroxissomal tem sido associada a distúrbio neurodegenerativos e os níveis alterados de ácido pipecólico podem ser indicativos de falha peroxissomal (GONZALEZ-RIANO *et al.*, 2011).

Outro metabólito que demonstrou diferença estatística entre os dois grupos estudados foi a 2-trans,4-cis-decadienoilcarnitina, metabólito da classe acil-carnitinas. Recentemente, um estudo de ZHAO *et al.*, (2018) também mostrou uma diminuição de carnitinas em pacientes com a DP (ZHAO *et al.*, 2018). A carnitina é um constituinte intracelular essencial sintetizado a partir da lisina e ligada a peptídeos no fígado, rim e cérebro. A carnitina tem papel importante no metabolismo energético do cérebro, controlando o influxo de ácidos graxos nas mitocôndrias, facilitando a oxidação do piruvato e protegendo o neurônio de acúmulo de acil-coenzima A, que por sua vez são moléculas desestabilizadoras de membrana (MOLINA *et al.*, 1997). Dentro desse contexto, o distúrbio metabólico negativamente regulado encontrado nas análises pode ser evidência significativa de disfunção mitocondrial na fisiopatologia da DP. Além disso, um estudo de DP em modelo animal usando MPTP, também evidenciou a atividade neuroprotetora da acetil-carnitina, através da modulação da disfunção mitocondrial e redução do estresse oxidativo, gerando a proteção dos neurônios dopaminérgicos e prevenção da reatividade astrocítica (BURKS *et al.*, 2019).

O 1-liso-2-araquidonoil-fosfatidato (ácido lisofosfatídico – LFA) também foi um metabólito diminuído em pacientes com a DP em nosso estudo. O LFA é um fosfolípido bioativo que atua pelo menos cinco receptores acoplados à proteína G (LFA1 – LFA5), sendo que o sistema nervoso é um local importante para a expressão de LFA1. Já foi demonstrado que essa classe de fosfolípidios pode regular a proliferação neuronal, migração e diferenciação durante o desenvolvimento do SNC, assim como sobrevivência neuronal (YANG *et al.*, 2015).

Um estudo, em modelo animal usando 6-OHDA, demonstrou que a expressão do receptor LFA1 na substância nigra foi significativamente reduzida, sugerindo a importância do LFA via receptor LFA1 ser necessária para o desenvolvimento e sobrevivência de

neurônios dopaminérgicos. Portanto, a sinalização reduzida de LPA/LPA1 pode estar envolvida na degeneração de neurônios dopaminérgicos, contribuindo para a patogênese da DP (YANG *et al.*, 2015).

A razão em tratar os dados metabolômicos em um segundo *software* foi avaliar as ferramentas disponíveis para o tratamento de dados em uma plataforma *open-source* (aberta), no caso o programa MS-DIAL, diferentemente do Masslynx que é o software padrão de origem do equipamento analítico utilizado para as análises. Além disso, foi possível comparar os resultados gerados por ambos os softwares para os dados metabolômicos de pacientes com DP em nosso estudo.

Diante disso, o uso de *softwares* diferentes para o tratamento dos dados proporcionou a detecção de biomarcadores diferentes, mas também resultou em 5 metabólitos em comuns. A diferença entre os metabólitos resultantes das diferentes análises pode ser pelo tratamento de dados, uma vez que o software Masslynx usado nas primeiras análises é um *software* mais antigo que o MS-DIAL. Este último por ser um *software* mais moderno conta com mais parâmetros a serem ajustados que o Masslynx, entretanto, os parâmetros que eram comuns foram mantidos com o mesmo ajuste. Além disso, o MS-DIAL demanda uma maior capacidade computacional que o Masslynx, sendo as análises mais demoradas quando se faz um corte menor para obter maior número de picos como no Masslynx. Portanto, já era esperado obter resultados um pouco diferentes entre os *softwares*.

## 6 CONCLUSÃO

Por meio do uso de diferentes estratégias e análises estatísticas multivariadas foi possível alcançar uma separação satisfatória entre os grupos controle e o paciente com DP e identificar metabólitos que diferenciam estes dois grupos. A partir das análises foram anotados 28 metabólitos, sendo alguns correlacionados positivamente ao grupo paciente e outros negativamente. Na análise de vias metabólicas foram identificadas 5 vias: via de metabolismo dos esfingolipídeos, da glutatona, do ácido araquidônico, da cafeína, do ácido araquidônico e biossíntese de ácidos biliares primários. Conforme dados da literatura, alguns destes metabólitos, de fato, fazem parte de vias conhecidamente afetadas pela DP e, portanto, possivelmente podem servir como novos biomarcadores da doença, enquanto outros, como ácido 3-oxoglutárico e 12-KETE, ainda não foram correlacionados com a doença. Além disso, esses resultados indicam que os estudos metabolômicos podem fornecer informações biológicas importantes sobre os metabólitos e os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença, que futuramente podem ser empregados mais facilmente no diagnóstico clínico e terapêutica da DP.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, Robert D. *et al.* Midlife milk consumption and substantia nigra neuron density at death. **Neurology** v. 86, n. 6, p. 512–519, 2016.
- ADAMIAK, Urszula *et al.* Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Levodopa in Patients With Advanced Parkinson Disease. **Clinical Neuropharmacology** v. 33, n. 3, p. 135–141, maio 2010. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00002826-201005000-00006>>.
- AGAPITO, Giuseppe; GUZZI, Pietro Hiram; CANNATARO, Mario. High Performance Analysis of Omics Data: Experiences at University Magna Graecia of Catanzaro. jul. 2017, [S.l.]: IEEE, jul. 2017. p.929–932. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/8035188/>>. 978-1-5386-3249-9. .
- AHN, Joong Kyong *et al.* A comparative metabolomic evaluation of behcet’s disease with arthritis and seronegative arthritis using synovial fluid. **PLoS ONE** v. 10, n. 8, p. 1–13 , 2015.
- ASCHERIO, Alberto *et al.* Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. **Archives of Neurology** v. 66, n. 12, p. 1460–1468 , 2009.
- ASCHERIO, Alberto; SCHWARZSCHILD, Michael A. The epidemiology of Parkinson’s disease: risk factors and prevention. **The Lancet Neurology** v. 15, n. 12, p. 1257–1272 , nov. 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7)>.
- ATKINSON, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** v. 69, n. 3, p. 89–95 , mar. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1067/mcp.2001.113989>>.
- BALASHOVA, Elena E. *et al.* Plasma Metabolome Signature in Patients with Early-stage Parkinson Disease. **Current Metabolomics** v. 6, n. 1, p. 75–82 , 22 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/150311/article>>.
- BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H.V. Parkinson disease. **European Journal of Neurology** v. 27, n. 1, p. 27–42 , 2020.
- BALKIR, Pinar; KEMAHLIOGLU, Kemal; YUCEL, Ufuk. Foodomics: A new approach in food quality and safety. **Trends in Food Science and Technology** v. 108, n. November 2020, p. 49–57 , 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.028>>.
- BANTLE, Collin M *et al.* Mitochondrial Dysfunction in Astrocytes: A Role in Parkinson’s Disease? **Frontiers in Cell and Developmental Biology** v. 8, n. January, p. 1–12 , 7 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.608026/full>>.
- BECKONERT, Olaf *et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature protocols** v. 2, n. 11, p. 2692–2703 , 2007.
- BLOEM, Bastiaan R.; DE VRIES, Nienke M.; EBERSBACH, Georg. Nonpharmacological treatments for patients with Parkinson’s disease. **Movement Disorders** v. 30, n. 11, p. 1504–1520 , 2015.

BOGDANOV, Mikhail *et al.* Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. **Brain** v. 131, n. 2, p. 389–396 , 2008.

BOGDANOV, Mikhail; UMEDA, Masato; DOWHAN, William. Phospholipid-assisted refolding of an integral membrane protein: Minimum structural features for phosphatidylethanolamine to act as a molecular chaperone. **Journal of Biological Chemistry** v. 274, n. 18, p. 12339–12345 , 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.18.12339>>.

BOLNER, Andreas *et al.* Plasma and urinary HPLC-ED determination of the ratio of 8-OHdG/2-dG in parkinson's disease. **Clinical Laboratory** v. 57, n. 11–12, p. 859–866 , 2011.

BROTHERS, Holly M.; MARCHALANT, Yannick; WENK, Gary L. Caffeine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. **Neuroscience Letters** v. 480, n. 2, p. 97–100 , 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.013>>.

BUJAK, Renata *et al.* Metabolomics for laboratory diagnostics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 113, p. 108–120 , set. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708514006128>>.

BUNNEY, P.E. *et al.* Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. **Physiology & Behavior** v. 176, n. 1, p. 139–148 , jul. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>>.

BURKS, Susan *et al.* Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine (ALC) in a chronic MPTP-induced Parkinson's disease mouse model: Endothelial and microglial effects. **Neuroscience Letters** v. 703, n. November 2018, p. 86–95 , jun. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394019301703>>.

BURTÉ, Florence *et al.* Metabolic Profiling of Parkinson ' s Disease and Mild Cognitive Impairment. **Movement Disorders** v. 00, n. 00, p. 1–6 , 2017.

CAMBIAGHI, Alice; FERRARIO, Manuela; MASSEROLI, Marco. Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. **Briefings in Bioinformatics** v. 18, n. 3, p. 498–510 , 12 abr. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bib/article-lookup/doi/10.1093/bib/bbw031>>.

CANUTO, Gisele A.B. *et al.* Metabolomics: Definitions, state-of-the-art and representative applications. **Quimica Nova** v. 41, n. 1, p. 75–91 , 2018.

CHAGAS-PAULA, Daniela A. *et al.* A metabolomic approach to target compounds from the asteraceae family for dual COX and LOX inhibition. **Metabolites** v. 5, n. 3, p. 404–430 , 2015.

CHAGAS-PAULA, Daniela Aparecida *et al.* Prediction of anti-inflammatory plants and discovery of their biomarkers by machine learning algorithms and metabolomic studies. **Planta Medica** v. 81, n. 6, p. 450–458 , 2015.

CHAHINE, Lama M.; STERN, Matthew B.; CHEN-PLOTKIN, Alice. Blood-based biomarkers for Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders** v. 20, n. SUPPL.1, p. S99–S103 , 2014. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70025-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70025-7)>.

CHANG, Kuo Hsuan *et al.* Alternations of Metabolic Profile and Kynurenine Metabolism in the Plasma of Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology** v. 55, n. 8, p. 6319–6328 , 2018.

CHAUDHURI, K Ray; SCHAPIRA, Anthony HV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **The Lancet Neurology** v. 8, n. 5, p. 464–474 , maio 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70068-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70068-7)>.

CHEAH, Irwin K. *et al.* Ergothioneine levels in an elderly population decrease with age and incidence of cognitive decline; a risk factor for neurodegeneration? **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 478, n. 1, p. 162–167 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.074>>.

CHEN, Qiao *et al.* Urine organic acids as potential biomarkers for autism-spectrum disorder in chinese children. **Frontiers in Cellular Neuroscience** v. 13, n. April, p. 1–9 , 2019.

CHEN, Tiankai *et al.* Electrospray Ionization Mass Spectrometry : A Powerful Platform for Noble-Metal Nanocluster Analysis *Angewandte*. p. 11967–11977 , 2019.

CHIU, Rossa W K *et al.* Cell-Free DNA Fragmentomics: The New “Omics” on the Block. **Clinical Chemistry** v. 66, n. 12, p. 1480–1484 , 2020.

CIPRIANI, Sara; CHEN, Xiquan; SCHWARZSCHILD, Michael A. Urate: A novel biomarker of Parkinsons disease risk, diagnosis and prognosis. **Biomarkers in Medicine** v. 4, n. 5, p. 701–712 , 2010.

CLECIUS, Ari Alves de Lima *et al.* **Cromatografia gasosa Aspectos teóricos e práticos**. [S.l: s.n.], 2019. 335 p.

CHOU, V P; HOLMAN, T R; MANNING-BOG, A B. DIFFERENTIAL CONTRIBUTION OF LIPOXYGENASE ISOZYMES TO NIGROSTRIATAL VULNERABILITY. **Neuroscience** v. 228, p. 73–82 , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.009>>.

CROTTY, Grace F *et al.* Association of caffeine and related analytes with resistance to Parkinson disease among LRRK2 mutation carriers A metabolomic study. **Neurology** v. 95, n. 24, p. 3428–3437 , 2020.0000000000.

DAUBNER, S. Colette; LE, Tiffany; WANG, Shanzhi. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 508, n. 1, p. 1–12 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>>.

DEXTER, David T; JENNER, Peter. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine** v. 62, p. 132–144 , set. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>>.

ERIKSSON L., JOHANSSON E., KETTANEH- WOLD N., Wikström C. and Wold S. **Design of Experiments, Principles and Applications**. Third rev. ed. [S.l.]: Umetrics Academy, 2008. 329 p. .

ESPINDOLA, Foued Salmen *et al.* BIOINFORMATIC RESOURCES APPLIED ON THE OMIC SCIENCES AS GENOMIC, TRANSCRIPTOMIC, PROTEOMIC, INTERATOMIC AND METABOLOMIC. **Biosciences Journal** v. 26, n. 3, p. 463–477 , 2010.

FARRER, Matthew James. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. **Nature Reviews Genetics** v. 7, n. 4, p. 306–318 , abr. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrg1831>>.

FERNANDES, João Tiago S. *et al.* Modulation of alpha-synuclein toxicity in yeast using a novel microfluidic-based gradient generator. **Lab on a Chip** v. 14, n. 20, p. 3949–3957 , 2014.

FERRAZ, Henrique Ballalai. Tratamento da Doença de Parkinson. **Rev. Neurociências** v. 7, n. 1, p. 6–12 , 1999.

GLAAB, Enrico *et al.* Neurobiology of Disease Integrative analysis of blood metabolomics and PET brain neuroimaging data for Parkinson ' s disease. **Neurobiology of Disease** v. 124, n. January, p. 555–562 , 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.01.003>>.

GOLDSTEIN, David S; HOLMES, Courtney; SHARABI, Yehonatan. catecholamine deficiency in Parkinson ' s disease and other synucleinopathies. **Brain** v. 135, p. 1900–1913 , 2012.

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, Raúl; GARCÍA-BARRERA, Tamara; GÓMEZ-ARIZA, José Luis. Metabolite profiling for the identification of altered metabolic pathways in Alzheimer's disease. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 107, p. 75–81 , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.010>>.

GONZALEZ-RIANO, Carolina *et al.* Prognostic biomarkers of Parkinson ' s disease in the Spanish EPIC cohort : a multiplatform metabolomics approach. **npj Parkinson's Disease** p. 1–12 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41531-021-00216-4>>.

GRANT, Stephanie M.; DEMORROW, Sharon. Bile acid signaling in neurodegenerative and neurological disorders. **International Journal of Molecular Sciences** v. 21, n. 17, p. 1–25 , 2020.

HALLIWELL, Barry; CHEAH, Irwin K.; TANG, Richard M.Y. Ergothioneine – a diet-derived antioxidant with therapeutic potential. **FEBS Letters** v. 592, n. 20, p. 3357–3366 , 2018.

HAMMOND, Constance; BERGMAN, Hagai; BROWN, Peter. Pathological synchronization in Parkinson ' s disease : networks , models and treatments. **TRENDS in Neurosciences** v. 30, n. 7, p. 357–364 , 2007.

HAN, Wei *et al.* Profiling novel metabolic biomarkers for Parkinson's disease using in-depth metabolomic analysis. **Movement Disorders** v. 32, n. 12, p. 1720–1728 , dez. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mds.27173>>.



- HANACHI, Parichehr; SH, Golkho. Using HPLC to determination the composition and antioxidant activity of *Berberis vulgaris*. **European Journal of Scientific Research** v. 29, n. 1, p. 47–54 , 2009
- HATANO, Taku *et al.* Identification of novel biomarkers for Parkinson ' s disease by metabolomic technologies. **Neurol Neurosurg Psychiatry** v. 87, p. 295–301 , 2016a.
- HATANO, Taku *et al.* Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by Metabolomic technologies. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry** v. 87, n. 3, p. 295–301 , 2016b.
- HAWKINS, Douglas M. The Problem of Overfitting. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences** v. 44, n. 1, p. 1–12 , 1 jan. 2004. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci0342472>>.
- HIRAYAMA, Masaaki *et al.* Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine correlate with hallucinations rather than motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders** v. 17, n. 1, p. 46–49 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2010.11.004>>.
- HSEU, You Cheng *et al.* The Antiaging Activity of Ergothioneine in UVA-Irradiated Human Dermal Fibroblasts via the Inhibition of the AP-1 Pathway and the Activation of Nrf2-Mediated Antioxidant Genes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** v. 2020 , 2020.
- HU, Ling *et al.* Integrated Metabolomics and Proteomics Analysis Reveals Plasma Lipid Metabolic Disturbance in Patients With Parkinson ' s Disease. **Frontiers in Aging in Neuroscience** v. 13, p. 1–13 , 2020.
- IGLESIAS, Amadeu Hoshi. Introdução ao acoplamento cromatografia líquida - espectrometria de massas. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1–13 , 2013.9781626239777.
- J W LANGSTON, P BALLARD, J W TETRUD, I Irwin. Chronic Parkinsonism in Humans Due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis. v. 219, p. 979–980 , 1983.
- JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry** v. 79, n. 4, p. 368–376 , 1 abr. 2008. Disponível em: <<http://jnnp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jnnp.2007.131045>>.
- JANSEN, Robert S. *et al.* N -lactoyl-amino acids are ubiquitous metabolites that originate from CNDP2-mediated reverse proteolysis of lactate and amino acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 112, n. 21, p. 6601–6606 , 26 maio 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1424638112>>.
- KATCHBORIAN-NETO, Albert *et al.* Neuroprotective potential of Ayahuasca and untargeted metabolomics analyses: applicability to Parkinson ' s disease. **Journal of Ethnopharmacology** v. 255, n. April, p. 112743 , 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112743>>.
- KLEIN, Christine; WESTENBERGER, Ana. Genetics of Parkinson ' s Disease. **Cold Spring**

**Harbor Laboratory Press** v. 2, p. 1–15 , 2012.

KLUPCZYŃSKA, Agnieszka; DEREZIŃSKI, Paweł; KOKOT, Zenon J. Metabolomics in medical sciences - Trends, challenges and perspectives. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research** v. 72, n. 4, p. 629–641 , 2015.

LEE, Andrea; GILBERT, Rebecca M. Epidemiology of Parkinson Disease. **Neurologic Clinics** v. 34, n. 4, p. 955–965 , nov. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.012>>.0213-4853 (Print)r0213-4853 (Linking).

LEE, Kyung Hee *et al.* Chronic treatment of ascorbic acid leads to age-dependent neuroprotection against oxidative injury in hippocampal slice cultures. **International Journal of Molecular Sciences** v. 22, n. 4, p. 1–13 , 2021.

LEES, Andrew J; HARDY, John; REVESZ, Tamas. Parkinson's disease. **The Lancet** v. 373, n. 9680, p. 2055–2066 , jun. 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60492-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60492-X)>.

LEWITT, Peter *et al.* CSF xanthine , homovanillic acid , and their ratio as biomarkers of Parkinson ' s disease. **Brain Research** v. 1408, p. 88–97 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.057>>.

LI, Gen *et al.* Mechanisms of motor symptom improvement by long-term Tai Chi training in Parkinson's disease patients. **Translational Neurodegeneration** v. 11, n. 1, p. 1–10 , 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40035-022-00280-7>>.

LI, Peipei *et al.* Gut microbiota dysbiosis is associated with elevated bile acids in parkinson's disease. **Metabolites** v. 11, n. 1, p. 1–15 , 2021.

LIESENFELD, David B; HABERMANN, Nina; OWEN, Robert W. Review of Mass Spectrometry – Based Metabolomics in Cancer Review of Mass Spectrometry – Based Metabolomics in. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention** v. 22, n. 12, p. 2182–2201 , 2013.4962215655.

LOPES, Bernardo *et al.* Biostatistics: fundamental concepts and practical applications. **Revista Brasileira de Oftalmologia** v. 73, n. 1, p. 16–22 , 2014. Disponível em: <<https://www.rbojournal.org/en/article/biostatistics-fundamental-concepts-and-practical-applications/>>.

LUAN, Hemi; LIU, Liang-feng; TANG, Zhi; ZHANG, Manwen; *et al.* Comprehensive urinary metabolomic profiling and identification of potential noninvasive marker for idiopathic Parkinson ' s disease. **Nature Publishing Group** v. 5, p. 1–11 , 2015.

LUAN, Hemi; LIU, Liang Feng; TANG, Zhi; MOK, Vincent C.T.; *et al.* Elevated excretion of biopyrrin as a new marker for idiopathic Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders** v. 21, n. 11, p. 1371–1372 , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.09.009>>.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; QUILES-ZAFRA, R. Lipidomics: An omics discipline with a key role in nutrition. **Talanta** v. 219, n. February, p. 121197 , 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121197>>.

MANDREKAR, Jayawant N. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. **Journal of Thoracic Oncology** v. 5, n. 9, p. 1315–1316 , set. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ec173d>>.

MARASCHIN, Marcelo *et al.* **BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRO&INDÚSTRIA**. [S.l: s.n.], 2016. 17–49 p. 4 v. Disponível em: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-28522009000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=>](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522009000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=>)>. Gesehen am 22.09.06. Online-Ressource.

MARCO-RAMELL, Anna *et al.* Evaluation and comparison of bioinformatic tools for the enrichment analysis of metabolomics data. **BMC Bioinformatics** v. 19, n. 1, p. 1 , 2 dez. 2018. Disponível em: <<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-017-2006-0>>.

MAWATARI, Shiro *et al.* Improvement of Blood Plasmalogens and Clinical Symptoms in Parkinson's Disease by Oral Administration of Ether Phospholipids: A Preliminary Report. **Parkinson's Disease** v. 2020, p. 1–7 , 2020.

MEISER, Johannes; WEINDL, Daniel; HILLER, Karsten. Complexity of dopamine metabolism. **Cell Communication and Signaling** v. 11, n. 1, p. 34 , 17 dez. 2013. Disponível em: <<https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-811X-11-34>>.

MELLO, Marcella Patrícia Bezerra; BOTELHO, Ana Carla Gomes. Correlation of evaluation scales utilized at Parkinson's disease applied to physical therapy. **Fisioter. Mov.** v. 23, n. 1, p. 121–127 , 2010.

MILLER, Diane B.; O'CALLAGHAN, James P. Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. **Metabolism: Clinical and Experimental** v. 64, n. 3, p. S40–S46 , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.030>>.

MING, Chi Shih *et al.* Neuroimaging of the dopamine transporter in Parkinson's disease: First study using [99mTc]-TRODAT-1 and SPECT in Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** v. 64, n. 3 A, p. 628–634 , 2006.

MIZUNO, Yoshikuni *et al.* An immunohistochemical study on  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. **Annals of Neurology** v. 35, n. 2, p. 204–210 , fev. 1994. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.410350212>>.

MOLINA, José Antonio *et al.* Decreased cerebrospinal fluid levels of neutral and basic amino acids in patients with Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences** v. 150, n. 2, p. 123–127 , 1997.

MOREIRA, Sara *et al.* Nrf2 activation by tauroursodeoxycholic acid in experimental models of Parkinson's disease. **Experimental Neurology** v. 295, p. 77–87 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.05.009>>.

MORETTI, Morgana; FRAGA, Daiane Bittencourt; RODRIGUES, Ana Lúcia S. Preventive and therapeutic potential of ascorbic acid in neurodegenerative diseases. **CNS Neuroscience**

**and Therapeutics** v. 23, n. 12, p. 921–929 , 2017.

NAGESH BABU, G. *et al.* Serum metabolomics study in a group of Parkinson's disease patients from northern India. **Clinica Chimica Acta** v. 480, n. January, p. 214–219 , maio 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.02.022>>.

ONG, W.-Y.; FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A.A. Involvement of Cytosolic Phospholipase A2, Calcium Independent Phospholipase A2 and Plasmalogen Selective Phospholipase A2 in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Conditions. **Current Medicinal Chemistry** v. 17, n. 25, p. 2746–2763 , 1 set. 2010. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=17&issue=25&spage=2746>>.

PÉPIN, Élise *et al.* Sphingosine-1-Phosphate Receptors Modulators Decrease Signs of Neuroinflammation and Prevent Parkinson's Disease Symptoms in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model. **Frontiers in Pharmacology** v. 11, n. February, p. 1–11 , 21 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.00077/full>>.

PETROVITCH, Helen *et al.* Plantation Work and Risk of Parkinson Disease in a Population-Based Longitudinal Study. v. 59 , 2002.

PICCA, Anna *et al.* Circulating amino acid signature in older people with Parkinson's disease: A metabolic complement to the EXosomes in PARKinson Disease (EXPAND) study. **Experimental Gerontology** v. 128, n. August, p. 110766 , 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110766>>.

PRATI, R. C.; BATISTA, G. E. P. A.; MONARD, M. C. Curvas ROC para avaliação de classificadores. **IEEE LATIN AMERICA TRANSACTIONS** v. 6, n. 2, p. 215–222 , 2008.

RAFFONE, Antonio *et al.* Metabolomics in endometrial cancer diagnosis: A systematic review. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica** v. 99, n. 9, p. 1135–1146 , 2020.

REN, Xiangpeng; CHEN, Jiang-fan; CHEN, Jiang-fan. Caffeine and Parkinson ' s Disease : Multiple Benefits and Emerging Mechanisms. v. 14, n. December, p. 1–12 , 2020.

ROSA, Alexandra Isabel *et al.* Tauroursodeoxycholic Acid Improves Motor Symptoms in a Mouse Model of Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology** v. 55, n. 12, p. 9139–9155 , 2018.

ROTUNNO, Melissa S. *et al.* Cerebrospinal fluid proteomics implicates the granin family in Parkinson's disease. **Scientific Reports** v. 10, n. 1, p. 1–11 , 2020.

RUBINGH, Carina M *et al.* Assessing the performance of statistical validation tools for megavariable metabolomics data. **Metabolomics** v. 2, n. 2, p. 53–61 , 2006.

S. FAHN. Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. **ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES** v. 991, p. 1–14 , 2003.

SANTOS, Fabrício R; ORTEGA, Miguel. Bioinformática aplicada à Genômica. **Biowork IV** , 2003.

SACCENTI, Edoardo *et al.* Reflections on univariate and multivariate analysis of

metabolomics data. **Metabolomics** v. 10, n. 3, p. 361–374 , 26 jun. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11306-013-0598-6>>.

SATO, Shigeto; MIZUNO, Yoshikuni; HATTORI, Nobutaka. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels as a biomarker for progression of Parkinson disease. **Neurology** v. 64, n. 6, p. 1081–1083 , 2005.

SATPUTE, R. *et al.* Neuroprotective effects of alpha-ketoglutarate and ethyl pyruvate against motor dysfunction and oxidative changes caused by repeated 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine exposure in mice. **Human & Experimental Toxicology** v. 32, n. 7, p. 747–758 , 2 jul. 2013. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327112468172>>.

SCATTON, B. *et al.* Dopamine deficiency in the cerebral cortex in Parkinson disease. **Neurology** v. 32, n. 9, p. 1039–1039 , 1 set. 1982. Disponível em: <<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.32.9.1039>>.

SCHIESLING, Carola *et al.* Review: Familial Parkinson's disease - Genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. **Neuropathology and Applied Neurobiology** v. 34, n. 3, p. 255–271 , 2008.

SCHWARZSCHILD, Michael A. Serum Urate as a Predictor of Clinical and Radiographic Progression in Parkinson Disease. **Archives of Neurology** v. 65, n. 6, p. 716 , 1 jun. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15370834>>.6176321972.

SEET, Raymond C S *et al.* Free Radical Biology & Medicine Oxidative damage in Parkinson disease : Measurement using accurate biomarkers. **Free Radical Biology and Medicine** v. 48, n. 4, p. 560–566 , 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.026>>.

SHAO, Yaping; LE, Weidong. Recent advances and perspectives of metabolomics-based investigations in Parkinson's disease. **Molecular Neurodegeneration** v. 14, n. 1, p. 1–12 , 2019.

SHARMA, Sushil *et al.* Biomarkers in Parkinson's disease (recent update). **Neurochemistry International** v. 63, n. 3, p. 201–229 , 2013.

SHI-KAI, Y A N *et al.* “ Omics ” in pharmaceutical research : overview , applications , challenges , and future perspectives. v. 13, n. 2011, p. 3–21 , 2015.

SHOOK, Brian C.; JACKSON, Paul F. Adenosine A 2A Receptor Antagonists and Parkinson's Disease. **ACS Chemical Neuroscience** v. 2, n. 10, p. 555–567 , 19 out. 2011. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cn2000537>>.

SIANI, Francesca *et al.* Influence of estrogen modulation on glia activation in a murine model of parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience** v. 11, n. MAY, p. 1–11 , 2017.

SIVASUBRAMANIAN, M *et al.* Sphingosine kinase 2 and sphingosine-1-phosphate promotes mitochondrial function in dopaminergic neurons of mouse model of Parkinson's

disease and in MPP<sup>+</sup>-treated MN9D cells in vitro. **Neuroscience** v. 290, p. 636–648 , abr. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.032>>.6567787643.

SMOLINSKA, Agnieszka *et al.* NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. **Analytica Chimica Acta** v. 750, p. 82–97 , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.049>>.

SPICER, Rachel *et al.* Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. **Metabolomics** v. 13, n. 9, p. 1–16 , 2017.0123456789.

STOESSEL, Daniel *et al.* Promising Metabolite Profiles in the Plasma and CSF of Early Clinical Parkinson ' s Disease. **Frontiers in Aging in Neuroscience** v. 10, p. 1–14 , 2018.

SUGIMOTO, Masahiro *et al.* Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. **Current Bioinformatics** v. 7, n. 1, p. 96–108 , 1 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1574-8936&volume=7&issue=1&spage=96>>.8123525052.

SUN, Yan V; HU, Yi-juan. **Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases**. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2016. 147–190 p. 93 v. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.004>>. .

SVEINBJORNSDOTTIR, Sigurlaug *et al.* Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. **The New England Journal of Medicine** v. 343, p. 1765–1770 , 2000.

SVEINBJORNSDOTTIR, Sigurlaug. The clinical symptoms of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry** v. 139, p. 318–324 , out. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.13691>>.

SZYMAŃSKA, Ewa *et al.* Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics** v. 8, n. S1, p. 3–16 , 8 jun. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11306-011-0330-3>>.

TASSEVA, Guergana *et al.* Phosphatidylethanolamine deficiency in mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology. **Journal of Biological Chemistry** v. 288, n. 6, p. 4158–4173 , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.434183>>.

THADATHIL, Nidheesh *et al.* Brain Selective Estrogen Treatment Protects Dopaminergic Neurons and Preserves Behavioral Function in MPTP-induced Mouse Model of Parkinson's Disease. **Journal of Neuroimmune Pharmacology** , 2020.

TOCZYLOWSKA, Beata *et al.* Changes in the metabolic profiles of the serum and putamen in Parkinson's disease patients – In vitro and in vivo NMR spectroscopy studies. **Brain Research** v. 1748, n. June, p. 147118 , 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147118>>.

TROISI, Jacopo *et al.* A metabolomic signature of treated and drug-naïve patients with Parkinson's disease: a pilot study. **Metabolomics** v. 15, n. 6, p. 11 , 10 jun. 2019. Disponível

em: <<https://doi.org/10.1007/s11306-019-1554-x>>.0123456789.

TYSNES, Ole Bjørn; STORSTEIN, Anette. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission** v. 124, n. 8, p. 901–905 , 2017.

VANIYA, Arpana *et al.* Using MS-FINDER for identifying 19 natural products in the CASMI 2016 contest. **Phytochemistry Letters** v. 21, p. 306–312 , set. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2016.12.008>>.

VASCELLARI, Sarah *et al.* crossm Gut Microbiota and Metabolome Alterations Associated with Parkinson ' s Disease. **mSystems** v. 5, n. 5, p. 1–15 , 2020.

VIAANT, Mark R.; SOMMER, Ulf. Mass spectrometry based environmental metabolomics: A primer and review. **Metabolomics** v. 9, n. SUPPL.1, p. 144–158 , 2013.

VILLAS-BÔAS, SiLAS GRANATO; GOMBERT, ANDREAS K. METABOLMA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** v. 26, p. 58 , 2006.

VINAIXA, Maria *et al.* A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. **Metabolites** v. 2, n. 4, p. 775–795 , 18 out. 2012. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2218-1989/2/4/775>>.

WECKWERTH, Wolfram; MORGENTHAL, Katja. Metabolomics : from pattern REVIEWS. **Drug Discovery Today: Targets** v. 10, n. 22, p. 1551–1558 , 2005.

WEINGARTEN, Carol P *et al.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews Neuroimaging of Parkinson ' s disease : Expanding views. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v. 59, p. 16–52 , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.09.007>>.

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

WISHART, David S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Science and Technology** v. 19, n. 9, p. 482–493 , 2008.

WOOD-KACZMAR, A.; GANDHI, S.; WOOD, N. W. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine** v. 12, n. 11, p. 521–528 , 2006.

WOOD, Steven L; WESTBROOK, Jules A; BROWN, Janet E. Omic-profiling in breast cancer metastasis to bone : Implications for mechanisms , biomarkers and treatment. **Cancer Treatment Reviews** v. 40, n. 1, p. 139–152 , 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.07.006>>.

XIA, Jianguo *et al.* Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. **Metabolomics** v. 9, n. 2, p. 280–299 , 4 abr. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11306-012-0482-9>>.

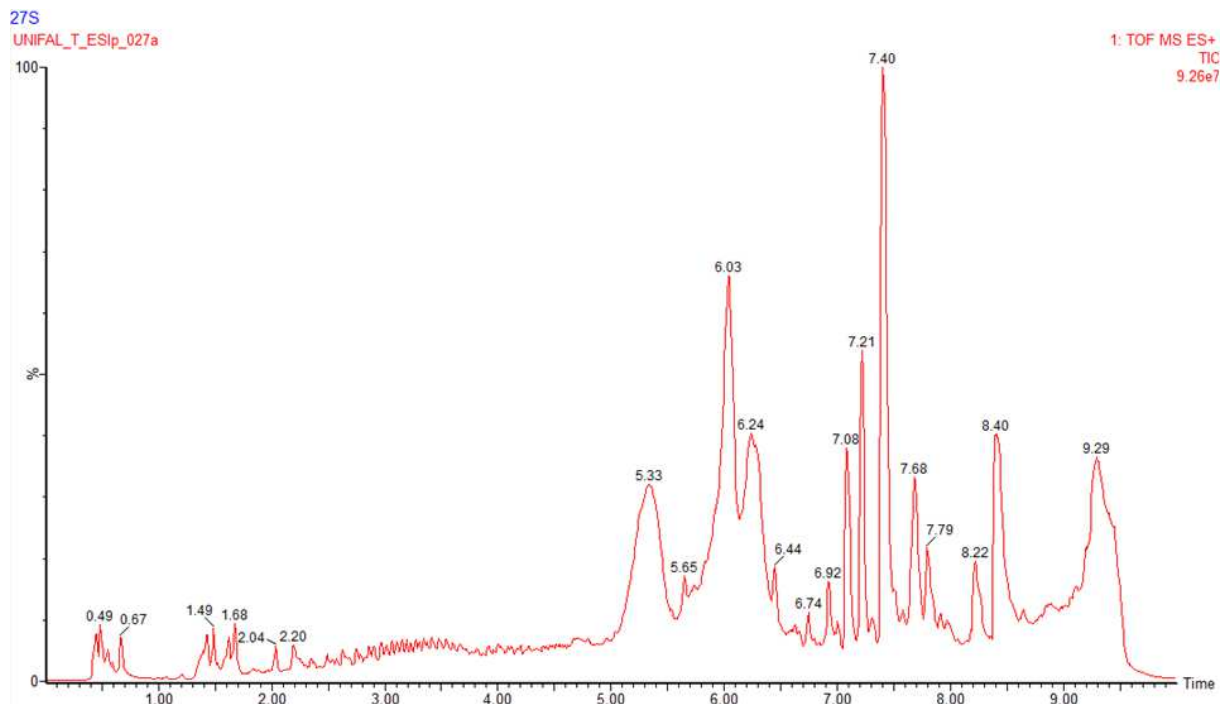
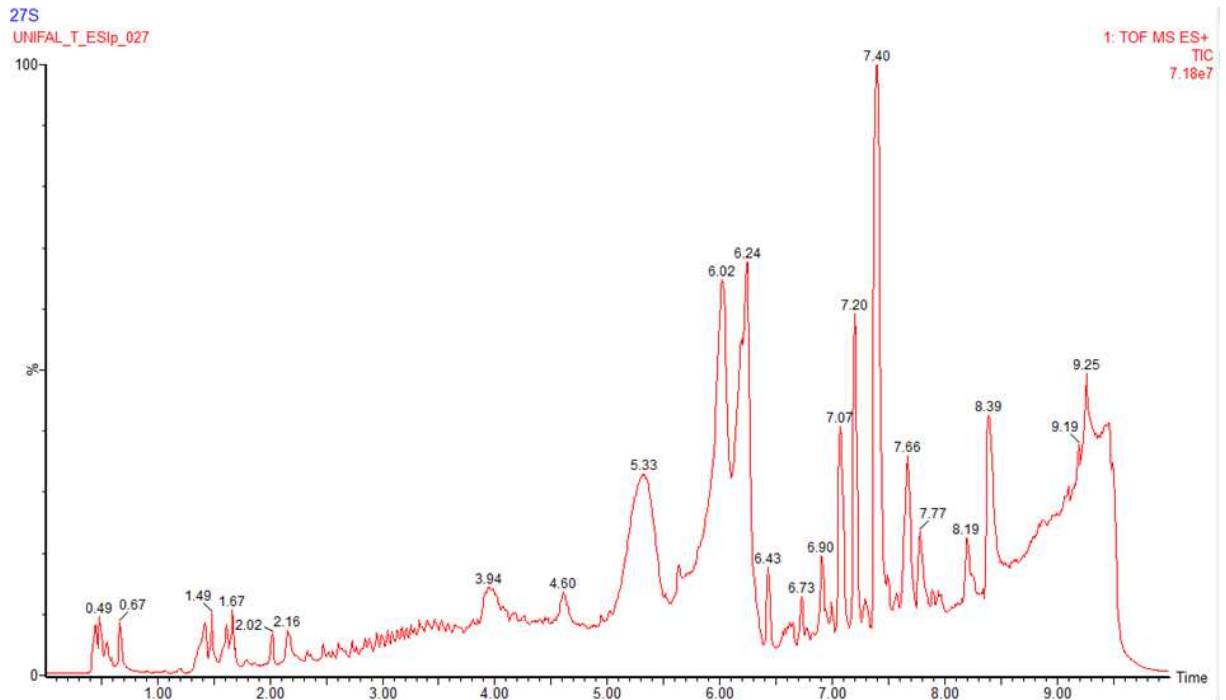
YANG, Xiao yun *et al.* LPA signaling is required for dopaminergic neuron development and is reduced through low expression of the LPA1 receptor in a 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease. **Neurological Sciences** v. 36, n. 11, p. 2027–2033 , 2015.

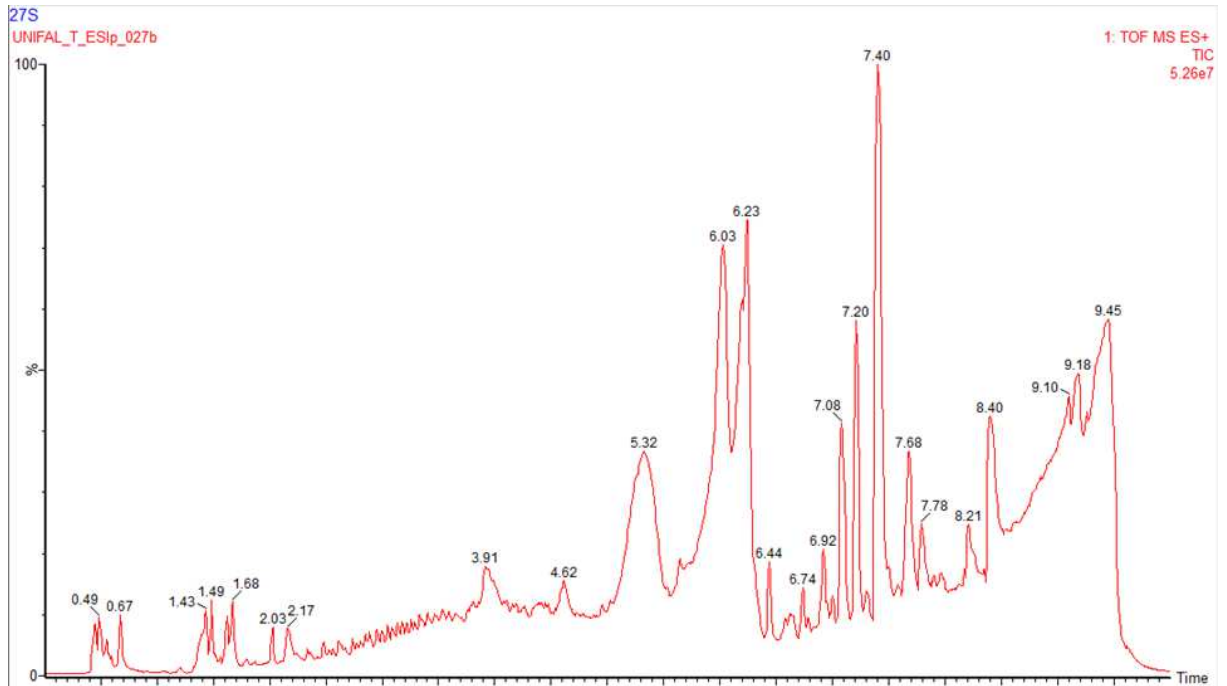
ZHANG, Aihua *et al.* Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **The Analyst** v. 137, n. 2, p. 293–300 , 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C1AN15605E>>.

ZHAO, Xiuzhen *et al.* Benefits of Vitamins in the Treatment of Parkinson's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** v. 2019, p. 1–14 , 20 fev. 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/9426867/>>



## APÊNDICE A – Cromatogramas das replicatas - modo positivo





### APÊNDICE B – Cromatogramas das replicatas - modo negativo

