

# Identificação de biomarcadores relacionados ao risco de trombose venosa

**Palavras-Chave:** RMN de  $^1\text{H}$ , metabolômica, trombose.

**Autores:**

**Juan Andrés Herrera, IQ, UNICAMP**

**Thyerre Santana da Costa, IQ, UNICAMP**

**João Guilherme de Moraes Pontes, IQ, UNICAMP**

**Profa. Dra. Ljubica Tasic, IQ, UNICAMP**

## Introdução:

A alta mortalidade relacionada ao tromboembolismo venoso (TEV) leva essa condição, junto a outras doenças cardiovasculares, à 3<sup>o</sup> maior causa de morte no mundo, sendo que 1 a cada 4 mortes está relacionada a ela (Hospital Alemão Oswaldo Cruz, 2023; Lucilius, 2018).

Embora apresente uma grande mortalidade, a doença ainda é pouco estudada do ponto de vista metabolômico, e sua mortalidade não está relacionada ao seu tratamento em si, mas sim ao seu diagnóstico, visto que sintomas do TEV são amplamente variados e inespecíficos (Mazzolai et al., 2018). Dessa maneira, é interessante encontrar uma maneira assertiva de diagnosticar corretamente e, preferencialmente, com antecedência a presença de TEV.

Sabendo que a trombose venosa provoca diferenças metabólicas quando comparada com o metaboloma de uma pessoa saudável, é possível utilizar diferentes equipamentos e técnicas, como a ressonância magnética, podendo criar um modelo para diagnóstico (Cao et al., 2018). Visto isso, o objetivo do estudo dirigido é utilizar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do soro sanguíneo para encontrar metabólitos que diferenciam os grupos de pacientes (TEV) e controles saudáveis, e potencialmente encontrar os biomarcadores para TEV.

## Metodologia:

Foram recebidas, do hemocentro, em colaboração com o projeto FAPESP 2021/11963-0, Centros de Ciência para o Desenvolvimento: Centro de Doenças Tromboembólicas - CDT, 90 amostras de soro sanguíneo, sendo metade proveniente de pessoas diagnosticadas com trombose venosa aguda, denominado grupo de pacientes, e um grupo controle saudável, que não apresentava a doença estudada, sendo esses dois grupos cuidadosamente pareados em idade e gênero.

As amostras recebidas foram estocadas em biofreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise, para que não houvesse uma grande variação de metabólitos devido à degradação das amostras.

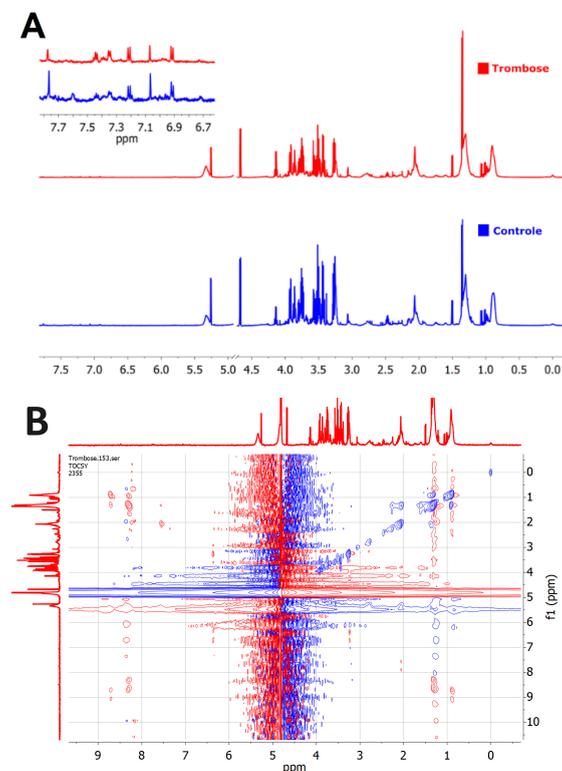
As amostras foram descongeladas e diluídas no solvente, usando  $300\text{ }\mu\text{L}$  de soro e  $300\text{ }\mu\text{L}$  de água deuterada com 0,03% m/v de ácido trimetilsilil propanóico (TSP). Essa mistura foi então centrifugada e adicionada a um tubo de RMN de 5 mm (Quintero et al., 2020). Para a análise, foi utilizado um equipamento Bruker de 600 MHz com as sequências de pulsos de noesy1d e CPMG (Carr-Purcell-Meiboom Gill) que são utilizados, respectivamente, para suprimir o sinal da água residual presente nas amostras (HDO) e com o filtro de  $T_2$ , atenuando os sinais relacionados a moléculas maiores, como proteínas e lipoproteínas (lipídios). Os espectros foram processados com a utilização do software MestReNova, onde conseguimos ajustar a linha de base, a fase, a apodização e o *binning* dos espectros (Pontes et al., 2017). Assim, com o tratamento dos espectros, pudemos exportar a matriz para o site MetaboAnalyst, aplicativo

utilizado para as análises quimiométricas. O primeiro passo foi gerar o PLS-DA, um método assistido de discriminação de grupos com pré-processamento auto-escalado, usando a faixa espectral entre  $\delta$  0 e 8ppm. Através desse gráfico obtivemos os valores de *t-student* e *p-value* dos picos, ou seja, dos metabólitos mais significativos para a separação de grupos.

Com os metabólitos principais encontrados, foram usados apenas os dados espectrais mais importantes para a construção da matriz dos dados para realizar uma análise de componentes principais (PCA) apenas com os picos de destaque, observando a qualidade do método e dos metabólitos encontrados na separação dos grupos e no diagnóstico correto.

## Resultados e discussão:

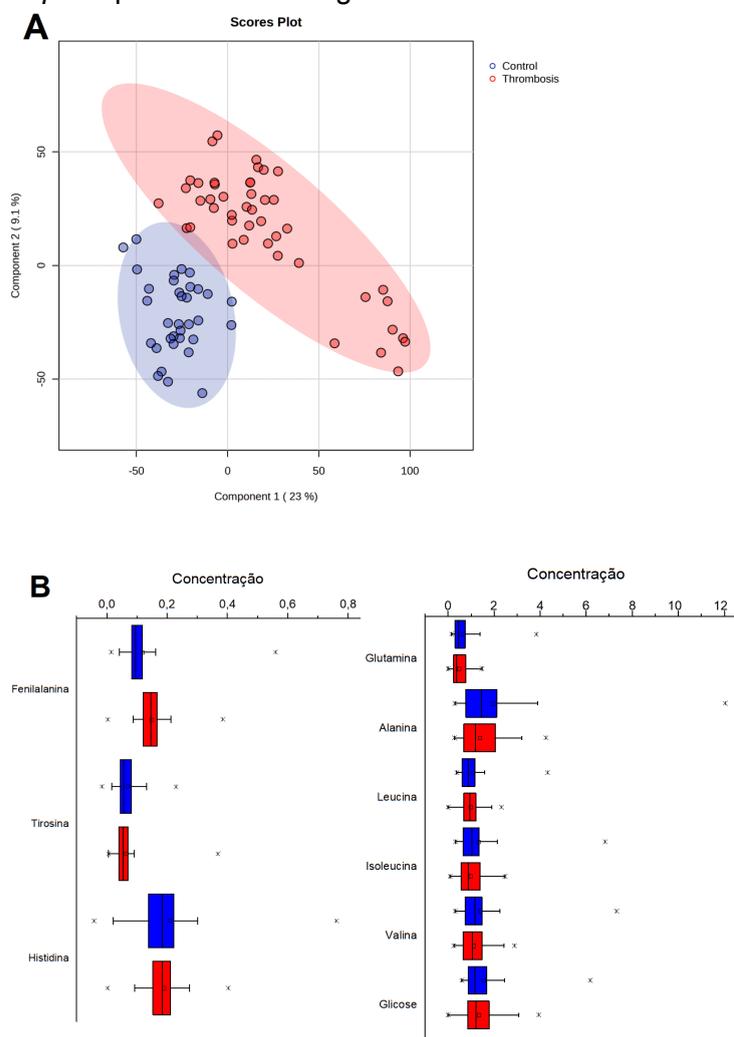
Utilizando os dados obtidos e tratados dos espectros CPMG de RMN de  $^1\text{H}$  foi possível identificar 12 diferentes metabólitos. Dentre eles, observamos lipídios e aminoácidos alifáticos e aromáticos, como tirosina e fenilalanina (Figura 1A). Além disso, a sobreposição destes espectros também serviu como uma comparação inicial dos diferentes grupos. O uso do espectro de TOCSY (RMN 2D) possibilitou a identificação dos principais metabólitos diferenciais (Figura 1B).



**Figura 1:** (A) - Sobreposição de espectros de CPMG de RMN de  $^1\text{H}$  dos grupos controle (Azul) e pacientes (Vermelho) com recorte do pico da água. (B) - Mapa do contorno de espectro de TOCSY.

## Análise estatística:

Para a análise, foi transferida a matriz dos dados obtidos dos espectro de CPMG no formato .csv e foi então feita a análise estatística assistida (PLS-DA) (Figura 2A), que teve o principal objetivo de observar os valores de *t-student* e *p-value* para identificar os sinais, portanto metabólitos, estatisticamente significativos e também aqueles que mais contribuíram para a diferenciação dos perfis metabólicos dos dois grupos. Dentre os metabólitos em destaque, observamos fenilalanina, alanina, glicose, glutamina, histidina, leucina, isoleucina, tirosina e valina, e pudemos observar a variação na concentração de cada um desses aminoácidos através do *boxplot* apresentado na Figura 2B.



**Figura 2:** (A) - PLS-DA de 2 componentes das amostras de soro entre pacientes com trombose (vermelho) e grupo controle (azul). (B) - *Boxplot* da concentração dos aminoácidos significativos dos grupos de controle saudável (azul) e de pacientes (vermelho).

Através do gráfico apresentado na Figura 2B observamos as diferentes concentrações de cada aminoácido entre o grupo de pacientes e o grupo saudável. Dessa

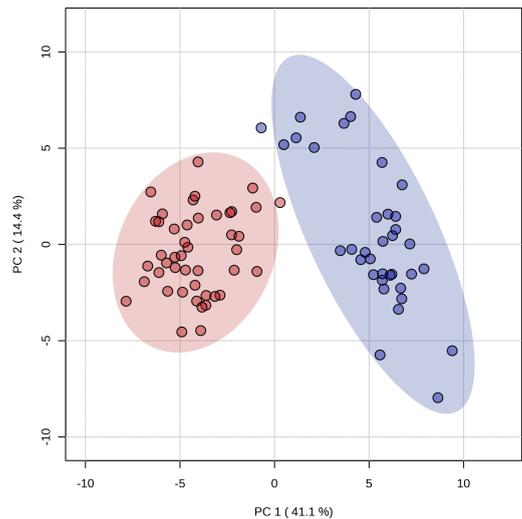
maneira, é importante entender e buscar possíveis correlações entre as variações nas concentrações dos aminoácidos com a trombose.

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), embora ainda não estejam diretamente relacionados à trombose, têm seu metabolismo associado à regulação do funcionamento das plaquetas, responsáveis pela coagulação, podendo estar relacionadas ao risco de trombose (Xu et al., 2020). É possível que exista então uma associação de menores concentrações de BCAAs (leucina, isoleucina e valina) - como as encontradas no soro do grupo com trombose - com o risco de TEV.

A presença da trombose já foi anteriormente relacionada à perturbação no ciclo do ácido cítrico, podendo ser correlacionada às menores concentrações de valina e glutamina encontradas no soro sanguíneo dos portadores de TEV (Sung et al., 2018).

Outra variação que pudemos observar nos metabólitos presentes no soro é a diminuição da glicose no soro trombótico. Essa diminuição está associada a processos anaeróbios. A trombose nos permite hipotetizar a baixa oxigenação dos tecidos, que faz com que as células realizem a fermentação láctica do piruvato formado através da glicólise. Essa baixa na oxigenação pode ser entendida tanto pelo estresse no corpo gerado pela enfermidade, quanto pelo bloqueio físico com formação do coágulo, evitando a oxigenação ideal dos tecidos (Franczyk et al., 2021).

Usando os metabólitos identificados nos espectros, foi formada uma nova matriz de dados, onde apenas os *buckets* (ou *bins*) dos aminoácidos destacados para a separação dos grupos foi mantida. Com essa nova matriz foi realizada a análise de PCA dos grupos, um método de separação não assistido (Figura 3).



**Figura 3:** PCA de 2 componentes das amostras de soro de sangue de pacientes com trombose (vermelho) e grupo controle (azul) usando os *buckets* (ou *bins*) dos metabólitos de destaque.

O gráfico de PCA indica que houve uma separação dos grupos a partir das variáveis que foram selecionadas, mas precisamos entender se o método utilizado é válido e assertivo. Para isso, precisamos observar os valores de  $Q^2$ ,  $R^2$  e da acurácia gerados no modelo de PLS-DA, que estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Valores de acurácia,  $R^2$  e  $Q^2$  de acordo com o número de componentes utilizados na análise multivariada.

Medição	1 Comp	2 Comp	3 Comp	4 Comp	5 Comp
Acurácia	0,785	0,92417	0,9875	0,9875	0,975
$R^2$	0,41488	0,83627	0,89298	0,91792	0,94429
$Q^2$	0,3219	0,73339	0,78286	0,80158	0,80127

1 Comp a 5 Comp: número de componentes.

Como podemos observar, foram obtidos valores satisfatórios para as 3 variáveis destacadas com valores acima de 80% para  $Q^2$  e acima de 90% para  $R^2$  e acurácia, quando observamos o uso de 4 componentes. O valor de  $R^2$  se refere à qualidade do *fitting* dos dados e  $Q^2$  é a capacidade preditiva do método utilizado.

## Conclusões

Destarte, com todos os dados e resultados apresentados acima percebemos que foi possível identificar metabólitos discriminatórios entre os grupos e entender suas possíveis variações em relação à condição estudada. Além disso, foi possível criar um modelo de separação satisfatório, ou

seja, aquele que apresentou valores altos de  $Q^2$ ,  $R^2$  e acurácia.

## Agradecimentos

Agradecemos ao grupo de pesquisas da Professora Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi, do Hemocentro, FCM, UNICAMP, pela colaboração no projeto FAPESP 2021/11963-0, Centros de Ciência para o Desenvolvimento: Centro de Doenças Tromboembólicas - CCT.

## Bibliografia

HOSPITAL ALEMÃO OSWALDO CRUZ. **Trombose pode levar a embolia pulmonar e matar em 30% dos casos.** *Vida & Ação - RJ*. (2023). Disponível em: [https://www.hospitaloswaldocruz.org.br/imprensa/hospital-na-midia/trombose-pode-levar-a-embolia-pulmonar-e-matar-em-30-dos-casos/#:~:text=Segundo%20o%20Minist%C3%A9rio%20da%20Sa%C3%BAde,%20morte%20cardiovascular%20no%20pa%C3%ADs](https://www.hospitaloswaldocruz.org.br/imprensa/hospital-na-midia/trombose-pode-levar-a-embolia-pulmonar-e-matar-em-30-dos-casos/#:~:text=Segundo%20o%20Minist%C3%A9rio%20da%20Sa%C3%BAde,%20morte%20cardiovascular%20no%20pa%C3%ADs.). Acesso em: 31/07/2024.

Lucilius, C. **Trombose: uma doença silenciosa alertada em dia mundial.** *Hospital de Clínicas da Unicamp*. (2018). Disponível em: <https://hc.unicamp.br/trombose-uma-doenca-silenciosa-alertada-em-dia-mundial/>. Acesso em: 31/07/2024.

Mazzolai, L.; Aboyans, V.; Ageno, W. et al. **Diagnosis and management thrombosis: a joint consensus document from the European Society of Cardiology working groups of aorta and peripheral vascular diseases and pulmonary circulation and right ventricular function.** *European Heart Journal*. 39, 4208 - 4218 (2018).

Cao, J.; Jin, Qq.; Wang, Gm. et al. **Comparison of the serum metabolic signatures based on  $^1\text{H}$  NMR between patients and a rat model of deep vein thrombosis.** *Scientific Reports - Nature*. 8, 7837 (2018).

Quintero, M.; Tasic, L. and Annichino-Bizzacchi, J. M. **Thrombosis: Current knowledge based on metabolomics by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS).** *Thrombosis Update*. 1, 100011 (2020).

Pontes, J.; Brasil, A.; Cruz, G.; Souza, R. & Tasic, L. **NMR based metabolomics**

**strategies: plants, animals and humans.** *Analytical Methods*. 7 (2017).

Xu, Y.; Jiang, H.; Chen, F. et al. **Branched-chain amino acid catabolism promotes thrombosis risk by enhancing tropomodulin-3 propionylation in platelets.** *Circulation*. 142, 49-64 (2020).

Sung, Y.; Spagou, K.; Kafeza, M. et al. **Deep vein thrombosis exhibits characteristic serum and vein wall metabolic phenotypes in the inferior vena cava ligation mouse model.** *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 5, 703-713 (2018).

Franczyk, B.; Gluba-Brzózka, A.; Ławiński, J. et al. **Metabolomic Profile in Venous Thromboembolism (VTE).** *Metabolites*. 11, 495 (2021).