

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Investigação de Potenciais Biomarcadores em Saliva de Pacientes
Diagnosticados com Doença de Wilson**

Júlia Lima Ribeiro Ferro

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Vincenzi Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Tiago Venâncio

SÃO CARLOS - SP
2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Júlia Lima Ribeiro Ferro, realizada em 30/10/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Tiago Venâncio (UFSCar)

Prof. Dr. Nilson Antônio de Assunção (UNIFESP)

Prof. Dr. Vinicius Guimarães Ferreira (IQSC/USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedico esse trabalho à minha mãe e aos meus irmãos. Sei que eles sempre estarão ao meu lado e eu ao deles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Maria José, e aos meus irmãos, Carla e José, por todo carinho e compreensão ao longo desses anos, espero um dia retribuir e dizer que no fim valeu a pena;

À minha orientadora, Profa. Regina Vincenzi Oliveira, pela paciência e confiança depositada em mim nesses tempos difíceis. Também pela oportunidade de conhecimento e aprendizado que ela me proporcionou;

À Marília, por todo o suporte incondicional;

Aos amigos Thais, Clara e Alex pelo companheirismo e auxílio na pesquisa;

Aos amigos do PN, minha casa natal na UFSCar, especialmente ao Prof. João Batista Fernandes. Aos colegas e ex-colegas de laboratório *Separare* pelos bons momentos e churrascos;

Aos amigos da São Carlos Química que me ajudaram e torceram por mim ao longo desses anos;

Ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro e Prof. Dr. Nilson Antônio de Assunção pelas contribuições no trabalho durante as etapas preliminares de avaliação;

A todos os meus familiares e amigos que torceram para a realização dessa etapa;

À vida, por sempre mostrar o melhor caminho.

Meus agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos financiamentos em pesquisa: 2016/22215-7; 2020/05965-8 e 2014/50299-5 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil CNPq.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ANCOVA - Análise de Covariância

ANOVA – Análise de Variância

AMS - Assembléia Mundial da Saúde

ATOX 1 – Chaperona Antioxidante de Cobre 1

ATPase – Adenosina Trifosfatase

ATP7B – Gene ATP7B

ATPases tipoP – ATPases do tipo P Transportadora de Cobre

AUC – Área sob a Curva

BHMT – Betaína-Homocisteína Metiltransferase

CB – Controle Branco

CCS – Proteínas de Metalochaperone de Cobre para a SOD1

CG – Cromatografia Gasosa

CE – Eletroforese Capilar

COX – Oxidase do Citocromo C

CP – Ceruloplasmina

CTR1 – Proteína Transportadora de Cobre 1

Cu - Cobre

CV – Coeficiente de Variação

DDA – Aquisição Dependente de Dados

DMG – Dimetilglicina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DP – Doença de Parkinson

DR – Doença Rara

DW – Doença de Wilson

EIM - Erros Inatos do Metabolismo

ESI – Ionização por Eletrospray

ESI(+) - Eletrospray no Modo Positivo de Ionização

ESI(-) - Eletrospray no Modo Negativo de Ionização

EtOH - Etanol

FDR – Taxa de Falsa Descoberta

GC – Grupo Controle

GC-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

HC- Indivíduos saudáveis

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

H-DW – Indivíduos com DW e Sintomas Hepáticos

HILIC - Cromatografia de Interação Hidrofílica

HMDB – Banco de Dados do Metaboloma Humano

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

KEGG – Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomes

K-F – Anel de Kayser-Fleischer

KNN – K-Vizinhos mais próximos

LC – Cromatografia Líquida

LC-HRMS – Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução

LCR - Líquido Cefalorraquiano

MAT - Metionina Adenosiltransferase

MS – Espectrometria de Massas

MEOH - Metanol

MetS - Metionina Sintase

m/z – Razão massa/carga

NADPH - Dinucleotídeo de Nicotinamida-Adenina-Fosfato

N-DW – Indivíduos com DW e Sintomas Neurológicos

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCA – Análise de Componentes Principais

PLS-DA - Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

QC – Controle de Qualidade

QqTOF- Analisador de Massas Híbrido Quadrupolo-Tempo de Vôo

Q² - Coeficiente de Predição

R² - Coeficiente de Determinação

RDI - *Rare Disease Internacional*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNA – Ácido Ribonucleico

ROC – Característica de Operação do Receptor

RPLC – Cromatografia Líquida em Fase Reversa

RPLC ESI(+) - Cromatografia Líquida de Fase Reversa com Ionização Elestrospray no Modo Positivo de Ionização

RPLC ESI(-) - Cromatografia Líquida de Fase Reversa com Ionização Elestrospray no Modo Negativo de Ionização

RSD – Desvio Padrão Relativo

SAH - S-Adenosil-Homocisteína

SAHH - S-Adenosil-Homocisteína Hidrolase

SAM - S-Adenosilmetionina

SD – Desvio Padrão

SIG – Significativo

SMPDB – *Small Molecule Pathway Database*

S/N – Razão sinal/ruído

SOD1 – Superóxido Dismutase 1 de Cobre e Zinco

SUS - Sistema Único de Saúde

TC – Tomografia Computadorizada

THF – Ácido Tetrahidrofólico

TNG - Rede trans-Golgi

TOF – Tempo de Vôo

TR – Tempo de Retenção

UHPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

VIP – Importância da Variável de Projeção

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1- Manifestações clínicas de pacientes com DW proveniente de estudo realizado com 262 pacientes na Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	13
TABELA 1.2- Pontuação baseada em sistema de score para diagnóstico da DW.	20
TABELA 1.3- Testes de rotina para o diagnóstico da DW, achados típicos, falsos negativos e falsos positivos.	21
TABELA 3.1- Características dos Participantes do Estudo. (continuação)	34
TABELA 3.2- Perfil do gradiente cromatográfico utilizado nas análises por LC-HRMS.....	37
TABELA 4.1- Perfil dos participantes dos grupos de estudo (DW) e grupo controle (GC).....	43
TABELA 4.2- Resultados da Análise Univariada para a Classificação de Features Moleculares Significativos. (continuação).....	52
TABELA 4.3- Metabólitos anotados putativamente. Sendo, t_R (min): tempo de retenção; $VIP \geq 1,0$, p -valores $\leq 0,05$ e Taxa de Falsa Descoberta (FDR) $\leq 0,05$	55

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1- Mecanismo de distribuição de Cu nos hepatócitos. CTR1, proteína transportadora de Cu 1; Cu, cobre; COX17, oxidase do citocromo c; CCS, proteínas de metalochaperone de Cu; SOD, superoxidase dismutase de Cu/Zn; ATOX1, chaperona antioxidante de Cu 1; CP, ceruloplasmina; ATB7B, enzima transportadora de Cu; TNG, rede trans-Golgi. 8
- FIGURA 1.2- Diversas manifestações clínicas identificadas em pacientes com a DW. Contorno laranja: sintomas primários; Contorno azul, possíveis sintomas secundários da DW..... 11
- FIGURA 1.3- Sinal da face do panda, sinal neurológico característico da DW. A) Ressonância magnética ponderada em T2 apresentando a “face do panda gigante” no mesencéfalo (seta preta). B) Ressonância magnética ponderada em T2 mostrando a “face do panda em miniatura” no segmento da ponte (seta preta). Adaptado de BRITO et al (2005)..... 15
- FIGURA 1.4- Anel de Kayser-Fleischer nas manifestações da DW, causado pelo acúmulo de Cu na córnea (seta preta). 16
- FIGURA 1.5- Classificação das ciências “ômicas”. Genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica que definem o fenótipo. Adaptado de KIM et al. (2016) 24
- FIGURA 4.1- Cromatograma de íons extraídos das análises de saliva no modo RPLC com ESI(+). (A) Amostra do grupo DW; (B) Amostra do grupo GC. 44
- FIGURA 4.2- Cromatograma de íons extraídos das análises de saliva no modo RPLC com ESI(-). (A) Amostra do grupo DW; (B) Amostra do grupo GC. 45
- FIGURA 4.3- Gráficos 2D de *scores plots* da análise de componentes principais (PCA) dos dados de metabolômica global por LC-HRMS com predição de QCs. (A) Análise no modo RPLC ESI(+), (B) Análise no modo RPLC ESI(-). Verde: grupo

controle (GC), Vermelho: grupo estudo (DW) e Azul: controles de qualidade (QC). <i>Software: MetaboAnalyst</i>	47
FIGURA 4.4- Gráfico 2D de <i>score plot</i> da análise de componentes principais (PCA) dos dados de metabolômica global por LC-HRMS, em ambos os modos de ionização RPLC ESI(+) e RPLC ESI(-). Verde: grupo controle (GC) e Vermelho: grupo estudo (DW). <i>Software: MetaboAnalyst</i>	48
FIGURA 4.5- Análise Multivariada por PLS-DA e teste de permutação. (A) Gráfico 2D de <i>score plot</i> do modelo PLS-DA dos dados de metabolômica global por LC-HRMS, em ambos os modos de ionização, RPLC ESI(+) e RPLC ESI(-). Amostras do GC (verde) e DW (vermelho); (B) Resultados da validação cruzada, com plotagem de acurácia, R ² e Q ² . (C) Teste de permutação, com 1000 permutações aleatórias. <i>Software: MetaboAnalyst</i>	49
FIGURA 4.6- <i>Features</i> moleculares selecionados através do modelo PLS-DA, com VIP ≥1,0. <i>Software: MetaboAnalyst</i>	50
FIGURA 4.7- Exemplo do resultado de transformação de dados por Box-Cox pelo software Develve. (A) Distribuição do dado antes da transformação; (B) Distribuição do dado após transformação.	51
FIGURA 4.8- Boxplots (<i>box-and-whisker</i>) para os metabólitos anotados putativamente em amostras de saliva de pacientes com DW vs. grupo GC. O eixo y representa as intensidades normalizadas em <i>z-score</i> (média ± desvio padrão). O boxplot representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (<i>whiskers</i>) se estendem aos valores extremos. A significância estatística foi avaliada usando o teste de <i>t-Student</i> , com um limiar de $p \leq 0,05$. Vermelho: grupo DW e Azul: grupo controle. A) N-undecanoilglicina; B) ácido subérico; C) 9,10,13-TriHOME; D) ácido esteárico; E) nonato; F) N-metil-salsolinol; G) betaína; H) sedoheptulose 7-fosfato; I) CE(PGF1alpha); J) Cer(d18:2/20:4); K) pirocatecol; L) esfinganina; M) ácido 2-fenilpropanoico; N) isotricodermina; O) ácido palmítico.	57

- FIGURA 4.9- Análise de agrupamento hierárquico dos metabólitos putativamente anotados, $p < 0,01$, representada como *HeatMap*. 59
- FIGURA 4.10- Análise de esfinganina em amostras de saliva por metabolômica global via LC-HRMS. (A) Variabilidade da concentração relativa do metabólito esfinganina no grupo DW vs. GC. O eixo y representa as intensidades normalizadas em z -score (média \pm desvio padrão); $p \leq 0,05$. (B) Estrutura química da esfinganina. 62
- FIGURA 4.11- Análise de betaína em amostras de saliva por metabolômica global via LC-HRMS. (A) Variabilidade da concentração relativa do metabólito betaína no grupo DW vs. GC. O eixo y representa as intensidades normalizadas em z -score (média \pm desvio padrão); $p \leq 0,05$. (B) Estrutura química da betaína. 63
- FIGURA 4.12- Curvas ROC pelo método estatístico multivariado PLS-DA no ponto de corte ideal definido pela distância mínima para o canto superior esquerdo. Modelo otimizado gerou uma AUC de 0,969 (IC 95%: 0,893 - 1). 65
- FIGURA 4.13- Modelos de Previsão. (A) Curva ROC PLS-DA com 3 metabólitos como modelo de previsão. (B) Matriz de previsão das classes. *Software: MetaboAnalyst*. 66
- FIGURA 4.14: *HeatMap* dos metabólitos importantes para o modelo de predição da curva ROC. 67
- FIGURA 4.15- Impacto das vias metabólicas na análise das amostras de indivíduos com DW vs. GC. (A) Metabolismo da betaína; (B) Síntese de plasmalogênio; (C) Metabolismo dos glicerolipídios; (D) Beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos saturados de cadeia longa; (E) Via das pentoses fosfato; (F) Biossíntese de ácidos graxos; (G) Metabolismo dos esfingolipídios; (H) Metabolismo da metionina; (I) Metabolismo de ácidos graxos. *Software: MetaboAnalyst*. 69
- FIGURA 4.16- Metabolismo da metionina. S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), S-adenosilomocisteinase (SAHH), metionina sintase (MS),

isoenzimas MATI/II/III, betaína homocisteína metiltransferase (BHMT), dimetilglicina (DMG) e tetrahydrofolato (THF)..... 71

FIGURA 4.17- Biossíntese de esfingolípídeos. Condensação de palmitoil-CoA com serina, formando β -ceto esfinganina, seguida da redução de NADPH, formando esfinganina, que é acilada para formar a ceramida. Adaptado de NELSON e COX (2014). 73

RESUMO

INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES EM SALIVA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM DOENÇA DE WILSON. A doença de Wilson (DW) é uma doença autossômica recessiva caracterizada por excesso de cobre intracelular no fígado, cérebro e outros órgãos vitais. A sobrecarga de cobre no organismo pode levar a uma série de complicações graves, como problemas neurológicos, insuficiência hepática aguda ou crônica, problemas renais e manifestações psiquiátricas. A DW é uma doença progressiva e, quando não tratada, resulta em incapacidades graves e possível risco de vida. Portanto, o diagnóstico precoce é essencial para tratamento adequado e a prevenção de graves manifestações clínicas. O presente trabalho avaliou a presença de metabólitos diferenciadores em amostras de saliva de indivíduos portadores da DW em comparação com um grupo de indivíduos saudáveis. Para isso, fez-se uso de uma abordagem metabolômica global, com emprego da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS), permitindo anotar potenciais candidatos a biomarcadores e obter informações sobre alterações nas vias metabólicas dos grupos de indivíduos avaliados. Foram analisadas amostras de saliva de indivíduos com DW (n=24) e indivíduos saudáveis (n=39) e os resultados indicaram 39 metabólitos estatisticamente discriminantes ($p \leq 0,05$; $VIP \geq 1$), com a anotação putativa de 15 desses metabólitos. Dentre esses, sedoheptulose-7-fosfato, ácido palmítico, *N*-undecanoilglicina, ácido subérico e pirocatecol já foram previamente reportados e estão associados com as doenças de Alzheimer, esquizofrenia, Doença de Parkinson, câncer e doença renal. Os metabólitos *N*-metil-salsolinol, esfinganina e betaína já foram descritos como possíveis candidatos a biomarcadores da doença de Parkinson e da DW. No presente estudo, uma regulação positiva de betaína foi observada em indivíduos com a DW. Além disso, a ceramida Cer(d18:2/20:4) apresentou-se como o metabólito mais significativo na discriminação dos grupos pela curva ROC. A Cer(d18:2/20:4) mostrou-se inédito para a DW e níveis elevados de ceramidas tem sido associados com doenças neurodegenerativas, diabetes e doenças cardiovasculares e, portanto, caracteriza-se também como um metabólito importante para futuros estudos relacionados à DW. Os metabólitos relacionados à DW podem auxiliar no avanço das pesquisas de biomarcadores em síndromes raras, auxiliando um diagnóstico mais rápido e preciso. Além disso, o uso de uma amostragem não invasiva de saliva é desejável como alternativas de monitoramento fácil e acessível.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF POTENTIAL BIOMARKERS IN SALIVA FROM PATIENTS DIAGNOSED WITH WILSON DISEASE. Wilson disease (WD) is a rare inherited disorder characterized by excessive intracellular copper in the liver, brain, and other vital organs. Copper overload in the body can lead to a series of complications, including neurological problems, acute or chronic liver failure, kidney problems, and psychiatric manifestations. WD is a progressive disease and, if left untreated, results in serious and potentially life-threatening disabilities. Therefore, early diagnosis is essential for effective treatment and preventing severe clinical manifestations. The present work evaluated differentiating metabolites in saliva samples from individuals with WD compared to healthy individuals. For this, a global metabolomics approach was performed using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS), allowing the annotation of potential candidates for biomarkers, and obtaining information about changes in the metabolic pathways of the individual's group. Saliva samples from individuals with WD (n=24) and healthy individuals (n=39) were analyzed, and the results showed 39 metabolites that differed significantly between the two groups ($p \leq 0,05$; $VIP \geq 1$), with 15 of them being putatively annotated. Among these metabolites, sedoheptulose-7-phosphate, palmitic acid, *N*-undecanoylglycine, suberic acid, and pyrocatechol have been previously reported and are associated with Alzheimer disease, schizophrenia, Parkinson disease, cancer, and kidney disease. The metabolites *N*-methyl-salsolinol, sphinganine, and betaine have already been described as potential biomarkers for Parkinson and Wilson diseases. In the present study, an upregulation of betaine was observed in individuals with WD. Moreover, the metabolite ceramide Cer(d18:2/20:4) was detected as the most significant metabolite in differentiating the two groups by the ROC curve. While Cer(d18:2/20:4) is a new metabolite in the context of WD, high levels of ceramides have been linked to neurodegenerative diseases, diabetes, and cardiovascular diseases. Therefore, it is also considered an important metabolite for future studies related to WD, which can aid in faster and more accurate diagnosis of rare syndromes. Additionally, non-invasive saliva sampling is desirable as an affordable and convenient biofluid monitoring alternative.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doenças Raras: Uma Visão Global	1
1.2. Doença de Wilson.....	3
1.2.1. Fisiopatologia	6
1.2.2. Manifestações Clínicas	9
1.2.3. Diagnóstico Clínico	14
1.2.4. Tratamento para a Doença de Wilson	22
1.3. Análise Metabolômica.....	24
1.3.1. Doenças Raras e Metabolômica	29
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1. Generalidades	32
3.2. Amostras Clínicas e Indivíduos Participantes	32
3.3. Coleta e Preparo das Amostras de Saliva.....	35
3.4. Análises por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução.....	36
3.5. Mineração e Pré-processamento dos dados.....	39
3.6. Análises Estatísticas Multivariadas e Univariadas	40
3.7. Identificação dos metabólitos e Importância biológica.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
4.1. Perfil dos indivíduos	43
4.2. Análise Metabolômica Global de Saliva por LC-HRMS.....	43
4.3. Pré-processamento dos dados.....	45
4.4. Análise Multivariada	46
4.5. Análise Univariada	51

4.6. Metabólitos Anotados Putativamente	53
4.7. Curva ROC (Característica de Operação do Receptor).....	64
4.8. Alteração das vias bioquímicas	68
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
7. ANEXOS	95
8. APÊNDICES	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Raras: Uma Visão Global

Mais de 300 milhões de pessoas no mundo vivem com uma doença rara (DR), o que representa de 3,5 a 5,9% da população global. Existem mais de 6.000 doenças raras identificadas, das quais 71,9% são genéticas e destas 69,9% se manifestam durante a infância (WAKAP et al., 2020).

Em maio de 2022, em um evento na Assembléia Mundial da Saúde (AMS) em Genebra, realizado pela *Rare Disease Internacional* (RDI) foi proposta uma definição internacional para doenças raras, sendo essa: “*uma doença rara é uma condição médica com um padrão específico de sinais clínicos, sintomas e descobertas que afetam número menor ou igual a 1 em 2.000 pessoas que vivem em qualquer região definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) do mundo*”. Entretanto, apesar dos esforços para estabelecer uma definição de doença rara reconhecida internacionalmente, cada país ainda adota sua própria definição. Os Estados Unidos (EUA) definem DR como condições que afetam menos de 200.000 indivíduos, enquanto a União Europeia define uma DR como aquela que atinge 5 em cada 10.000 indivíduos. Na Colômbia, a variação é de 2 por 10.000 indivíduos. Outros países como Argentina, Chile, México, Panamá e Uruguai consideram uma DR quando atinge 5 em cada 10.000 indivíduos. No Brasil, uma doença é considerada rara quando afeta até 65 pessoas a cada 100.000 (WAINSTOCK e KATZ., 2023).

Um dos grandes desafios mundiais associados às DRs é a dificuldade dos sistemas médicos atuais em diagnosticar esses distúrbios de forma correta e precoce, pois uma ampla parcela dessas doenças tem sintomas parecidos com outras enfermidades, muitas DRs ainda não possuem um tratamento eficaz e as informações sobre as DR são bastante limitadas (FELIX et al., 2022; GIUGLIANI

et al., 2019). Toda essa dificuldade geralmente resulta em atrasos na intervenção medicamentosa e essa demora tem impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, que só depois conseguem ter acesso a medicamentos e terapias adequados. Segundo MELNIKOVA et al. (2012), menos de 10% dos pacientes com DRs recebem tratamento específico. Outro problema enfrentado pelas pessoas portadoras de uma DR é que, mesmo após receberem um diagnóstico, elas enfrentam acesso limitado ao tratamento devido aos altos custos, dificuldade de acesso a centros especializados, assim como, assistência coordenada e suporte ao paciente.

No Brasil, o Ministério da Saúde instituiu em 2014 a “Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras”, estabelecendo diretrizes para a oferta de cuidados às pessoas acometidas por doenças raras na rede pública do sistema único de saúde (SUS). Essa política define um plano anual de ação, apoio financeiro e logístico e prevê a criação de centros de tratamento de referência. Esses centros, principalmente associados a hospitais de pesquisa universitários e localizados em sua maioria nas grandes cidades e capitais, devem ser capazes de avaliar pacientes, realizar procedimentos de testes genéticos, diagnosticar, tratar e oferecer aconselhamento genético. As doenças raras no Brasil estão estruturadas em dois eixos principais: 1- DR de origem genética, incluindo anomalias congênitas e distúrbios de início tardio, deficiência intelectual e erros inatos do metabolismo; 2- DR de origem não genética, incluindo doenças infecciosas, doenças inflamatórias e autoimunes (FELIX et al., 2022; GIUGLIANI et al., 2016).

Dentro do núcleo das doenças raras de origem genéticas, destacam-se os erros inatos do metabolismo (EIM), que são distúrbios de herança autossômica, na maioria dos casos recessiva, causados por uma deficiência ou anormalidade de uma enzima, resultando em defeitos na via bioquímica correspondente. Devido à grande diversidade de vias metabólicas envolvidas nos processos enzimáticos há

uma maior dificuldade em se estabelecer um diagnóstico das doenças causadas por EIM (SILVA NETO, 2023).

Os EIMs têm uma incidência de 1/800-2500 em recém-nascidos e os diagnósticos para os EIM são divididos em testes de triagem e testes direcionados e específicos, como a detecção de biomarcadores e ensaios de atividade enzimática. Porém, nem todos EIM possuem marcadores bioquímicos e, quando ausentes, alternativas adicionais resumem-se à procedimentos invasivos como análises histopatológicas. (GHOSH et al., 2017) Os EIM são distúrbios de natureza genéticas complexas, com um gene associado a diferentes fenótipos e fenótipos semelhantes causados por mutações em diferentes genes. Por essas razões, a conscientização sobre EIM e doenças raras pode auxiliar um diagnóstico mais rápido, um tratamento mais eficaz e a uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes. Além disso, pode ajudar a impulsionar a pesquisa e o desenvolvimento por novas abordagens de triagem e diagnósticos rápidos e precisos, assim como de novas terapias para o tratamento de doenças raras. (SILVA NETO, 2023)

1.2. Doença de Wilson

A Doença de Wilson (DW) foi descrita em 1912 pelo neurologista Samuel Alexander Kinnier Wilson, que deu nome à doença, também conhecida como degeneração hepatolenticular ou degeneração progressiva lenticular (WILSON, 1912). A DW afeta aproximadamente 1/30.000-1/100.000 indivíduos no mundo e acredita-se que essa relação possa ser subestimada devido à diagnósticos errôneos atribuídos a outros distúrbios neurológicos, hepáticos ou psiquiátricos (ALA et al., 2007).

Adicionalmente, embora a DW seja reconhecidamente rara, a sua prevalência indicada pelo *Scheinberg-Sternlieb Estimate** é considerada válida para

* Em 1984, Scheinberg e Sternlieb estimaram a prevalência mundial da doença de Wilson para 1:30.000 com base em três conjuntos de dados: 1) o relatório de estatísticas vitais dos Estados Unidos, 1968-1978 (13.21/1.000.000); 2) um relatório clínico baseado na população da Alemanha Oriental sobre a prevalência (29/1.000.000); e 3) uma análise epidemiológica avançada baseada na frequência de parentesco em primeiro grau entre 289 famílias japonesas com pelo menos 1 membro da família com DW (33/1.000.000) (SANDAHL et al., 2020).

os Estados Unidos, Europa e Ásia, mas criticada para regiões com populações menores onde a DW teria uma prevalência 3-4 vezes maior do que as estimativas clínicas (SANDAHL et al., 2020), o que também a coloca como uma doença negligenciada.

A DW é uma enfermidade rara, autossômica recessiva e caracterizada por uma alteração no transporte do cobre (Cu), gerando um acúmulo progressivo do metal em vários órgãos, especialmente no fígado, cérebro, rins, placenta e córneas (LIU et al., 2015). A DW possui uma ampla variabilidade na expressão fenotípica entre indivíduos, podendo apresentar desde elevação das enzimas hepáticas, em casos assintomáticos, até insuficiência hepática fulminante (cirrose) e doenças neuropsiquiátricas incapacitantes, como sintomas graves (WEISS e SCHILSKY, 1999-2023). De forma geral, a maioria dos sintomas da DW geralmente aparece na segunda e terceira década de vida dos pacientes, no entanto, essa manifestação varia amplamente entre indivíduos, podendo ocorrer em crianças (KIM et al., 2013; MATOS et al., 2015) até idosos (YOUSEFI et al., 2019; ŽIGRAI et al., 2020).

O acúmulo anormal de Cu no organismo de pacientes com DW ocorre devido a uma mutação do gene *ATP7B*, situado no cromossomo 13, banda q14.3 (13q14.3). O gene codifica uma enzima transportadora de cobre chamada de ATPase do tipo P, essencial no metabolismo e transporte do Cu intracelular (ROSENCRANTZ e SCHILSKY, 2011). Até o momento, mais de 800 mutações no gene *ATP7B* já foram descritas (LI et al., 2021).

No Brasil, não foram encontrados dados epidemiológicos sobre a DW, mas um estudo recente reporta que a prevalência de DW no Brasil varia de acordo com as regiões do país e que está relacionada às taxas de consanguinidade (CANÇADO e BARBOSA., 2019). Na região Sudeste do Brasil, o caso do diagnóstico de DW em um paciente de 70 anos, levou à descoberta de uma nova mutação no gene *ATP7B* no exon 8, heterozigoto, ressaltando a importância do

sequenciamento genético na descoberta de novas mutações genéticas e a importância de não descartar em pacientes idosos a possibilidade da DW (OLIVEIRA SÁ et al., 2022).

O gene *ATP7B* codifica a proteína adenosina trifosfatase (ATPase) do tipo-P, também designada de proteína de Wilson e relacionada ao transporte intracelular de íons Cu (YANG et al., 2023). A ATP7B tipo-P pertence à família das ATPases tipo-P transportadora de metais pesados, incluindo Ag^+ , Zn^{+2} , Cd^{+2} e Co^{+2} , desempenhando um papel fundamental na homeostase e nos mecanismos de biotolerância desses metais (SCHURIG-BRICCIO e GENNIS, 2012). A ATP7B tipo-P se expressa no fígado, rim, cérebro, placenta e pulmão, e os distúrbios no seu funcionamento levam a elevados níveis de $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^+$, primeiramente no fígado, e depois em outros órgãos, principalmente no cérebro (LUTSENKO et al., 2010; TELIANIDIS et al., 2013).

A grande ameaça relacionada à DW é o fato dessa ser progressiva, podendo permanecer sem diagnóstico e resultar no risco de vida se não for adequadamente tratada. As variações clínicas da DW são amplas e, em termos gerais, os pacientes podem apresentar manifestações hepáticas, neurológicas e psiquiátricas (ALA et al., 2007; BEM et al., 2011). A partir do momento que se obtêm o diagnóstico para DW, o tratamento ocorre por meio de uma dieta alimentar que seja pobre em Cu e no uso de medicamentos quelantes, a fim de remover o excesso de Cu acumulado, minimizando sua reabsorção pelo organismo (SILVA et al., 2010). A DW é uma condição clínica tratável, no entanto, precocidade do diagnóstico e início imediato do tratamento são fundamentais para aumentar as chances de sobrevivência do paciente e diminuir a possibilidade para sequelas graves, principalmente neurológicas e hepáticas (SILVA et al., 2010).

Embora exista uma combinação de exames clínicos, laboratoriais e histológicos para identificar pacientes com DW, nenhum destes testes são específicos e nem considerados padrão-ouro para fins de diagnósticos clínicos

(BRUHA et al., 2010; SÁNCHEZ-MONTEAGUDO et al., 2021). Adicionalmente, testes genéticos possuem alto custo e devido à grande quantidade de mutações já identificadas, esses se tornam impraticáveis. Desta forma, no sentido de minimizar os riscos de um diagnóstico tardio, onde não seria mais possível evitar as sequelas da DW, alguns autores recomendam que a DW seja incluída na lista de doenças de risco e que passe a integrar os testes neonatal (SÁNCHEZ-MONTEAGUDO et al., 2021).

Com base nesse cenário, justifica-se a necessidade de novas investigações e pesquisas básicas na área da medicina de precisão, que permitam o diagnóstico precoce, preciso e rápido e o aumento da eficácia dos tratamentos médicos. Técnicas ômicas, como a metabolômica, permitem avaliar as caracterizações bioquímicas e moleculares do metaboloma e as mudanças nos metabólitos relacionadas a fatores genéticos, dieta, medicamentos, fatores ambientais, entre outros, podendo eventualmente levar a novos procedimentos para o diagnóstico clínico (biomarcadores), novas terapias medicamentosas, assim como, a identificação de novos alvos terapêuticos (SILVA NETO, 2023).

1.2.1. Fisiopatologia

O Cu é um oligoelemento importante para os seres vivos, sendo essencial para o funcionamento celular como cofator catalítico para sistemas enzimáticos, participando de diversos processos biológicos (PEÑA et al., 1999). O Cu na forma livre é uma substância tóxica, capaz de causar danos irreversíveis no organismo e morte celular. Para evitar essa toxicidade do Cu, sistemas específicos de transporte intracelular facilitam seu transporte e armazenamento, através da formação de enzimas que se ligam ao metal, conhecidas como cuproenzimas (PEÑA et al., 1999).

O consumo de Cu diário recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para adultos é de 0,9 mg/dia (ANVISA, 2005), obtido através da alimentação. Os alimentos que contêm níveis elevados de Cu incluem mariscos, grãos, nozes, cogumelos, legumes, chocolate e carnes de órgãos. O Cu é absorvido a partir do jejuno no intestino delgado, difunde-se através da mucosa intestinal, é transportado através do enterócito pela enzima transportadora de Cu, ATP7A, para a circulação portal e chega ao fígado onde entra nos hepatócitos através do canal transportador de Cu 1 (CTR1) (ROSENCRANTZ e SCHILSKY, 2011). Nos hepatócitos, o Cu é então capturado por chaperonas específicas de Cu que o transportam para os determinados destinos intracelulares. No citoplasma, a metalochaperona de Cu (CCS) transporta o metal para a superóxido dismutase 1 (SOD1) dependente de Cu/Zn. Outra chaperona, conhecida como COX17, fornece Cu para a mitocôndria, onde este é incorporado ao citocromo c oxidase (COX, Complexo IV) e utilizado na cadeia de fosforilação oxidativa mitocondrial. Finalmente, a grande maioria do Cu que entra nos hepatócitos é transportado pela chaperona antioxidante de Cu, a ATOX1, para a enzima ATP7B, que se localiza no Complexo de Golgi, sendo responsável pelo transporte de Cu até a recém-sintetizada ceruloplasmina (CP), a principal proteína contendo Cu no soro sanguíneo. Outra atividade crucial da ATP7B consiste na eliminação do excesso de Cu potencialmente tóxico dos hepatócitos para a bile (POLISHCHUK, 2019; ROSENCRANTZ e SCHILSKY, 2011). A Figura 1.1 ilustra o mecanismo descrito anteriormente.

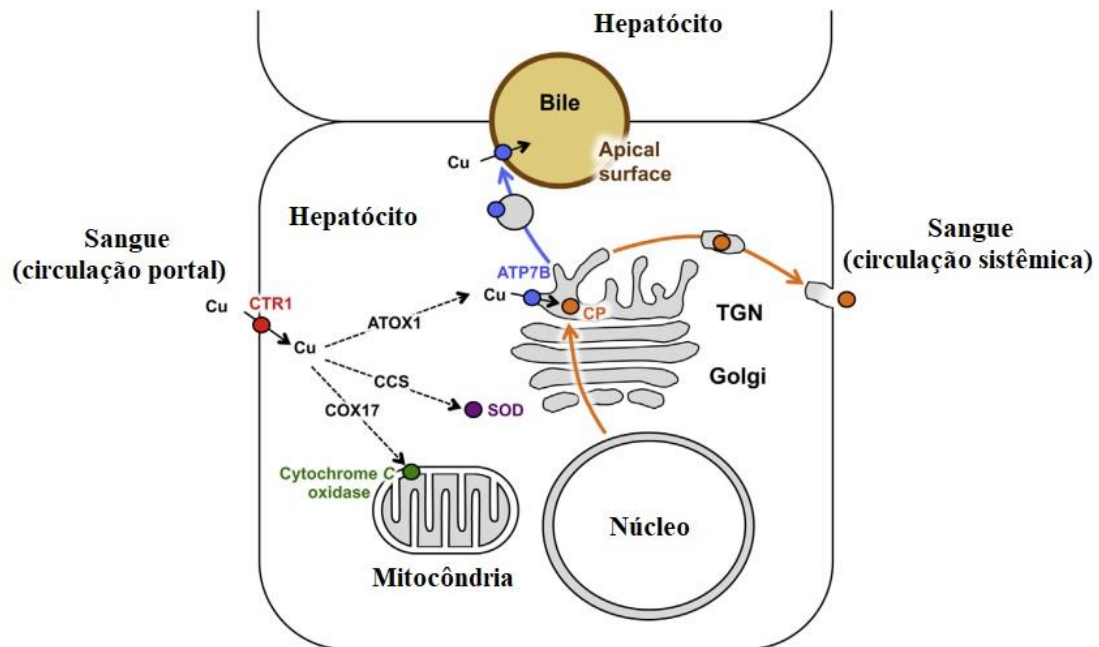


FIGURA 1.1- Mecanismo de distribuição de Cu nos hepatócitos. CTR1, proteína transportadora de Cu 1; Cu, cobre; COX17, oxidase do citocromo c; CCS, proteínas de metalochaperone de Cu; SOD, superóxido dismutase de Cu/Zn; ATOX1, chaperona antioxidante de Cu 1; CP, ceruloplasmina; ATP7B, enzima transportadora de Cu; TNG, rede trans-Golgi.

Adaptado de POLISHCHUK (2019).

No entanto, esse mecanismo fisiológico não acontece na DW. As mutações do gene *ATP7B* resultam na diminuição ou total ausência da função da ATPases tipo-P, resultando em uma deficiência na interação do Cu com a ceruloplasmina e consequente defeito da excreção biliar do Cu. O Cu hepático acumulado ocasiona toxicidade e danos celulares que se manifestam como sintomas clínicos da DW. Ocorrendo primariamente lesão hepática, evoluindo para fibrose e cirrose, até a insuficiência hepática. O Cu livre liberado para a corrente sanguínea

se acumula em outros órgãos acarretando as demais manifestações clínicas da DW (PATIL et al., 2013).

1.2.2. Manifestações Clínicas

A DW apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas, caracterizada por depósitos anormais de Cu, as quais dependem do órgão no qual o Cu se acumulou ao longo do processo patológico (SÁNCHEZ-MONTEAGUDO et al., 2021).

A doença hepática é a primeira manifestação clínica em aproximadamente 40-60% dos pacientes com DW, podendo se apresentar como insuficiência hepática crônica ou aguda (ALA et al., 2007). Geralmente, a hepatite evolui para hepatite crônica (fibrose e cirrose) quando não diagnosticada e tratada. A insuficiência hepática aguda é a forma mais grave da DW e surge acompanhada de níveis elevados de bilirrubina sérica, hipoalbuminemia e coagulopatia, encefalopatia hepática, ascite e edema periférico (TIAN et al., 2016). O quadro clínico de pacientes com DW pode ser semelhante a outras formas de hepatite crônica, o que enfatiza a necessidade de se investigar cuidadosamente esses pacientes (ALA et al., 2007).

Em pacientes jovens, a DW apresenta como sintomas a hepatite aguda, crônica ou fulminante e a sua apresentação clínica não é facilmente distinguível da hepatite viral aguda, com icterícia e desconforto abdominal (EASL, 2012). Assim, o diagnóstico da DW é difícil em indivíduos com comprometimento hepático, mas fácil em pacientes com sintomas neurológicos, sendo o grau de suspeita clínica para a DW dependente do paciente apresentar doença hepática, e/ou neuropsiquiátrica (CABRAS et al., 2015).

Após as manifestações hepáticas, os sintomas neurológicos são os mais frequentes na DW. A apresentação neurológica pode ser extremamente sutil e

intermitente por muitos anos, mas também pode se desenvolver rapidamente, levando em poucos meses à incapacidade mental completa. Em muitos casos, os sinais neurológicos são muito difíceis de serem classificados, pois os pacientes podem apresentar mais de uma anomalia, cada uma com diferentes níveis de gravidade (EASL, 2012). As manifestações neurológicas estão presentes em 18-68% dos sintomas iniciais dos pacientes com idade média de 20-30 anos. A sintomatologia é variável, destacando-se os tremores, que podem ser de repouso, postural (frequentemente com características de “bater asas”) ou cinético. Inicialmente afeta as extremidades superiores, no entanto, à medida que a doença progride pode afetar as pernas, a cabeça ou até mesmo todo o corpo. A distonia (contração muscular) também é um sintoma frequente em pacientes com sintomas neurológicos e pode ser focal, segmentar ou até generalizada. A apresentação distônica característica da DW é o riso sardônico, que se apresenta como um sorriso fixo devido à distonia do músculo risório (CZŁONKOWSKA et al., 2018; EASL, 2012).

Convulsões não são frequentes em pacientes com DW, mas podem ocorrer em até 6% dos pacientes, sendo mais comum as convulsões parciais. Outros sintomas neurológicos incluem parkinsonismo com bradicinesia (escassez e lentidão de movimentos, rigidez muscular e tremor de repouso), disartria (articulação indefinida da fala) e disfagia (dificuldades durante a deglutição) (PFEIFFER, 2016). O quadro clínico pode ser semelhante com a doença de Parkinson, devendo a DW ser sempre considerada no diagnóstico diferencial com distúrbios de movimentos (BRITO et al., 2005).

As alterações psiquiátricas podem aparecer antes dos sinais neurológicos ou hepáticos em 1/3 dos pacientes. Baixo desempenho acadêmico ou alterações de personalidade como hiperatividade, perda de controle emocional, desinibição sexual e comportamento inadequado podem ser observados em crianças, enquanto características psicóticas semelhantes a paranoia, esquizofrenia

ou depressão podem ser observadas em pacientes mais velhos. O atraso do diagnóstico em pacientes com DW que apresentam neuropsiquiatrias é frequente (EASL, 2012).

No geral, a doença de Wilson apresenta um amplo espectro de sintomas clínicos que dependem dos órgãos mais afetados (Figura 1.2) (CZŁONKOWSKA et al., 2018).

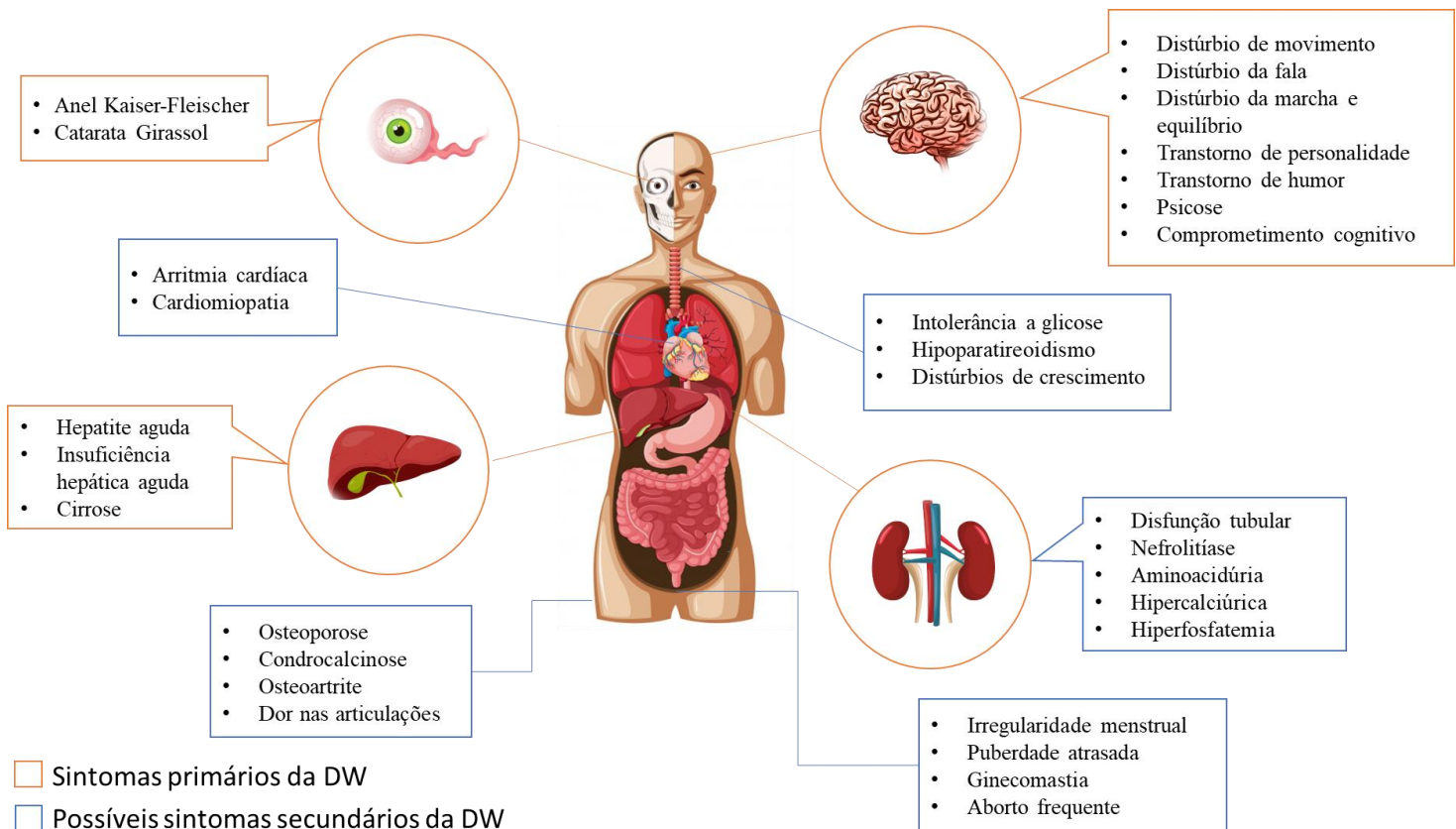


FIGURA 1.2- Diversas manifestações clínicas identificadas em pacientes com a DW. Contorno laranja: sintomas primários; Contorno azul, possíveis sintomas secundários da DW.

Adaptado de CZŁONKOWSKA et al., 2018.

No Brasil, de acordo com CANÇADO e BARBOSA (2019), pacientes com DW atendidos em clínicas pediátricas, apresentam predominantemente

manifestações hepáticas. Um estudo feito com 28 crianças com DW (faixa de idade de 2 a 18 anos no momento do diagnóstico) mostrou que 42,8% eram assintomáticas e foram identificadas por meio de triagem familiar, 25,0% apresentavam características clínicas de hepatite, 3,5% insuficiência hepática aguda com anemia hemolítica, 17,8% apresentavam enzimas hepáticas elevadas e 10,7% apresentavam hepatoesplenomegalia com sinais neurológicos, como distúrbios cerebelares, disartria, tremores e instabilidade postural (KLEINE et al., 2012).

Em pesquisa realizada por BEM et al. (2011) na região Sul do Brasil, 36 pacientes com DW com idades entre 10 e 41 anos no início dos sintomas, apresentavam as formas hepática e neurológica da doença. Nove pacientes apresentavam manifestações exclusivamente neuropsiquiátricas (25%), 14 apenas manifestações hepáticas (38,9%), 11 (30,6%) apresentavam ambas as manifestações e 2 pacientes (5,5%) eram assintomáticos.

Na maior revisão clínica conduzida no Brasil, entre adultos e crianças (ARAÚJO, 2012) foram catalogados 262 pacientes com DW, acompanhados nos Serviços de Gastroenterologia Clínica, Neurologia, Cirurgia do Fígado e Transplante Hepático, e pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de janeiro de 1946 a dezembro de 2010. As apresentações clínicas mais frequentes foram hepáticas (36,3%), neurológicas (34,7%), assintomáticas (16,8%), neuropsiquiátricas (8,3%) e hematológicas (1,9%). Uma descrição completa de todas as manifestações clínicas reportadas por ARAÚJO (2012) pode ser observada na Tabela 1.1.

TABELA 1.1- Manifestações clínicas de pacientes com DW proveniente de estudo realizado com 262 pacientes na Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Forma Clínica (%)	Modo de Apresentação	Pacientes (N)
Assintomática (16,8)	Hepatite crônica	32
	Cirrose hepática	9
	Sem hepatopatia	3
Hepática (36,3)	Cirrose hepática descompensada	55
	Cirrose hepática compensada	25
	Hepatite aguda	10
	Insuficiência hepática aguda grave	5
Neurológica (34,7)	Disartria	81
	Tremor	66
	Alteração na marcha	52
	Distonia	49
	Rigidez	45
	Alterações cerebelares	27
	Epilepsia	9
Neuro-psiquiátrica (8,3)	Alterações não psicóticas	12
	Depressão	3
	Esquizofrenia	5
	Transtorno bipolar	2
Neuro-hepática (0,8)	Cirrose hepática compensada	2
	Disartria	
	Distonia	
	Rigidez	
	Alteração na marcha	
Osteomuscular (0,4)	Artrite	1
Hematológica (1,9)	Anemia Hemolítica	5
Renal (0,8)	Síndrome de Fanconi	1
	Hematúria	1

Fonte: ARAÚJO (2012).

1.2.3. Diagnóstico Clínico

As manifestações clínicas da DW são diversas e nem sempre presentes ou facilmente identificadas, podendo ainda ser semelhante a outras doenças. Além disso, nenhum dos testes laboratoriais que indicam o acúmulo de Cu no organismo é 100% sensível e/ou específico para a DW, resultando na necessidade de combinar achados clínicos e parâmetros bioquímicos para chegar a um diagnóstico (SANCHEZ-MONTEAGUDO et al., 2021).

O primeiro caso documentado de DW no Brasil foi em 1944, em um paciente que apresentava a forma distônica da doença (CANÇADO e BARBOSA, 2019). O primeiro caso de DW diagnosticado na Clínica Neurológica do HC-FMUSP foi em 1946, o paciente apresentava a variante da doença em que predominavam tremor postural e disartria (BARBOSA et al., 2009).

A DW pode se manifestar em qualquer idade, embora a maioria se manifeste de 5 a 35 anos (EASL, 2012). O paciente mais jovem diagnosticado com cirrose devido à DW tinha 3 anos de idade (WILSON et al., 2000) e um estudo de caso relata um bebê de 9 meses diagnosticado com DW que apresentava um quadro de diarreia aguda e níveis de aminotransferase elevados, sintomatologia atípica da doença (KIM et al., 2013). Apesar da DW ser considerada uma doença jovem (raramente se manifesta após os 40 anos) há relatos de diagnósticos em dois irmãos acima dos 70 anos (ALA et al., 2005), assim como uma mulher de 67 anos, diagnosticada erroneamente como doença de Parkinson e, após manifestações hepáticas e neurológicas, diagnosticada corretamente com DW (ŽIGRAI et al, 2020).

A avaliação neurológica é realizada em pacientes com manifestações neuropsiquiátricas e também pode ser realizada em pacientes assintomáticos que demonstrem manifestações hepáticas. É possível observar alterações cerebrais nos exames de imagem como ressonância magnética nuclear (RMN) e tomografia computadorizada (TC). Nos cortes axiais na ponderação T2 da RMN podem ser

observadas lesões na região do mesencéfalo descritas com o sinal da “face do panda gigante” (Figura 1.3A), característico da DW, ocorrendo em até 20% dos pacientes com sintomas neurológicos. Também é possível ver o sinal da “face do panda em miniatura” (Figura 1.3B) porém com uma ocorrência menos frequente (BRITO et al., 2005; CZŁONKOWSKA et al., 2018).

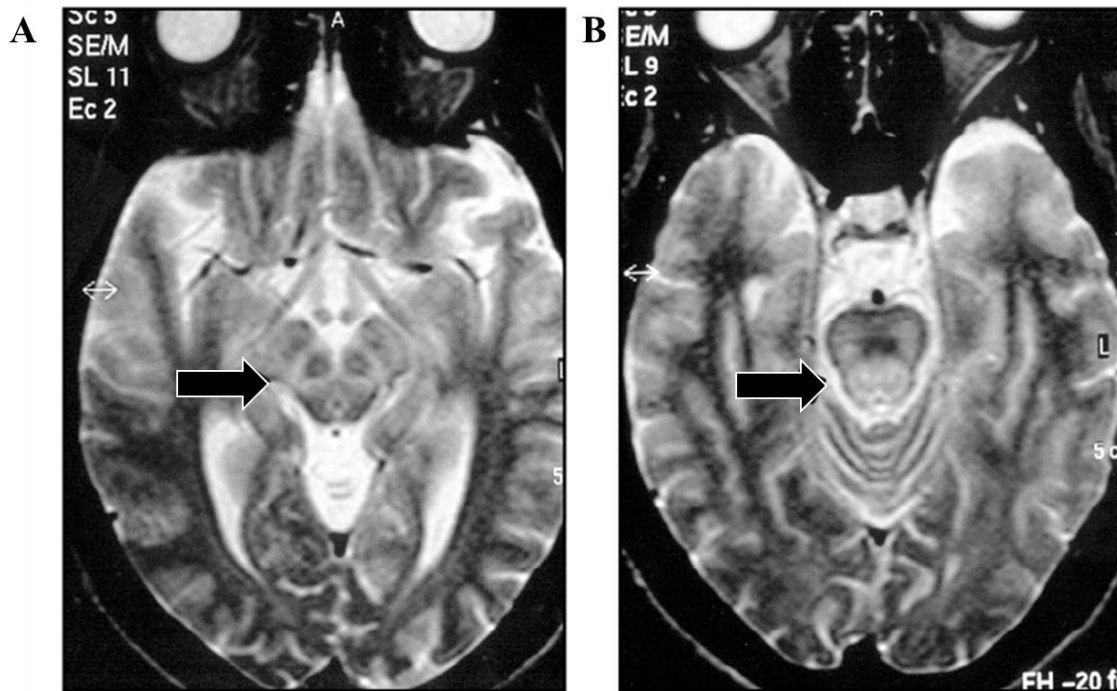


FIGURA 1.3- Sinal da face do panda, sinal neurológico característico da DW. **A)** Ressonância magnética ponderada em T2 apresentando a “face do panda gigante” no mesencéfalo (seta preta). **B)** Ressonância magnética ponderada em T2 mostrando a “face do panda em miniatura” no segmento da ponte (seta preta). Adaptado de BRITO et al (2005).

O anel de Kayser-Fleischer (K-F) (Figura 1.4) é um marcador importante para o diagnóstico da DW, sendo encontrado em aproximadamente 100% dos casos de pacientes com manifestações neurológicas, 40-50% dos casos com manifestação hepática e 20-30% em pacientes pré-sintomáticos (SULLIVAN et al., 2002). Os anéis de K-F são depósitos de Cu em grumos granulares na

membrana *Descemet* (membrana basal do epitélio da córnea), aparecendo como uma alteração pigmentar castanho-dourada, amarelo-dourada ou bronze. O anel de K-F só pode ser definitivamente diagnosticado por um oftalmologista, utilizando uma lâmpada de fenda. A densidade do anel correlaciona-se com a gravidade da doença, sendo encontrado principalmente em casos em que o paciente já apresenta alterações hepáticas (PATIL et al., 2013; SULLIVAN et al., 2002; WALTER et al., 2014).

Alterações semelhantes aos anéis de K-F também são observadas em distúrbios como cirrose biliar primária, colestase e distúrbios neoplásicos com alto nível de Cu sérico (por exemplo, mieloma múltiplo) e durante o uso de estrogênio (uso crônico de contraceptivos orais ou terapia de estrogênio na pós-menopausa) (DUSEK et al., 2015; SCHRAG e SCHOTT, 2012).

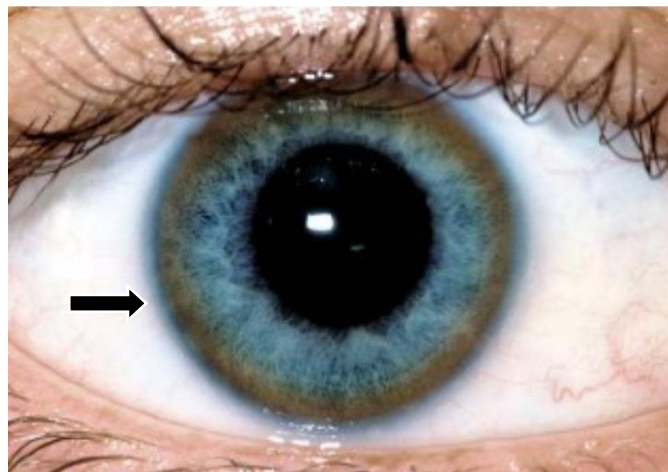


FIGURA 1.4- Anel de Kayser-Fleischer nas manifestações da DW, causado pelo acúmulo de Cu na córnea (seta preta).

Adaptado de SCHRAG e SCHOTT (2012).

Um teste de rotina em pacientes com suspeita de DW é a ceruloplasmina sérica. A ceruloplasmina sérica normalmente se apresenta em concentrações baixas em pacientes portadores da DW com sintomas neurológicos

em comparação a indivíduos saudáveis, porém pode se apresentar na faixa baixo-normal em aproximadamente 50% dos pacientes com DW e sintomas hepáticos (CAUZA et al., 1997). Os níveis de ceruloplasmina tendem a aumentar em caso de inflamação, infecção e hiperestrogenemia durante a gravidez ou como consequência de tratamentos contraceptivos. Além disso, os portadores heterozigotos da DW ocasionalmente apresentam níveis anormalmente reduzidos. Outras considerações para níveis baixos de ceruloplasmina são a má absorção, insuficiência hepática fulminante ou aceruloplasminemia. Portanto, o valor preditivo da ceruloplasmina como marcador único para o diagnóstico de DW é questionável, principalmente porque muitos pacientes com DW apresentam níveis próximos ao normal (SANCHEZ-MONTEAGUDO et al., 2021).

Uma medida útil para o diagnóstico da DW é a excreção urinária de Cu durante 24 horas. O valor da excreção urinária de Cu considerado para diagnóstico é de $>100 \mu\text{g}$ em 24 horas em pacientes com sinais e sintomas de DW. No entanto, a interpretação dos valores de excreção urinária de Cu pode ser difícil devido à sobreposição com achados de outros tipos de doença hepática, em particular lesão hepática aguda ou insuficiência hepática de qualquer etiologia (ROBERTS e SCHILSKY, 2008).

A anemia hemolítica negativa para *Coombs* (teste de antiglobulina) pode ser o único sintoma inicial da DW. No entanto, a hemólise acentuada está comumente associada a doença hepática grave. A hemólise de baixo grau pode estar associada à DW mesmo quando não há manifestações hepáticas da doença (FERENCI, 2014).

No caso de suspeita de DW, o diagnóstico pode ser confirmado por uma biópsia hepática percutânea para medir a quantidade de Cu depositado no fígado, caso os demais sinais clínicos e testes não invasivos não sejam conclusivos. Valores de Cu hepático $>250 \mu\text{g}$ por grama de peso seco do fígado é considerado

uma evidência bioquímica robusta para o diagnóstico da DW (FERENCI et al., 2005).

Outra forma de confirmar o diagnóstico para a DW é o teste genético, que também permite fazer o *screening* de irmãos assintomáticos. O teste consiste na detecção de mutações no gene *ATP7B*. No entanto, o diagnóstico genético molecular é difícil devido a mais de 500 mutações possíveis, além da maioria dos pacientes serem heterozigotos compostos, ou seja, carregam duas mutações diferentes (EASL, 2012; PATIL et al., 2013).

De acordo com as investigações de mutações do *ATP7B*, existem alguns pontos críticos de mutação, dependendo dos diferentes grupos étnicos e da localização geográfica. A mutação mais comum em pacientes da Europa Central, Oriental e do Norte é a mutação pontual H1069Q (éxon 14). Cerca de 50–80% dos pacientes com DW desses países carregam pelo menos um alelo com esta mutação, com uma frequência alélica variando entre 30 e 70% (FERENCI, 2006). Em estudo realizado no sudoeste da China com pacientes de DW, a Arg778Leu foi a mutação mais comum, representando 30% da frequência, porém sem dados conclusivos entre a correlação da mutação com os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes (LIU et al., 2015).

No Brasil, um estudo feito por DEGUTI et al (2004) identificou vinte e cinco mutações da *ATP7B*, doze delas inéditas. A mutação c.3402delC apresentou a maior frequência alélica (30,8%), seguida pela mutação c.2123T>C (p.L708P) (16,7%). A mutação europeia comum c.3207C>A (p.H1069Q) não estava presente. Um segundo estudo realizado na região Sul do Brasil, onde há forte colonização europeia, com ascendência alemã, italiana e polonesa, a mutação H1069Q, que é bastante comum na Europa, teve uma frequência alélica de 37,1% e foi a mais frequente em 23 pacientes estudados (BEM et al., 2013). Assim, pode-se concluir que as mutações presentes no gene *ATP7B* são amplas, com variações

geográficas e sem muitas evidências de correlação entre os sintomas apresentados pela DW.

Atualmente o diagnóstico da DW é dado pelo conjunto dos testes discutidos anteriormente, onde cada um tem uma pontuação baseada no *score* desenvolvido no 8º Encontro Internacional sobre DW em Leipzig (EASL, 2012). Um resumo da pontuação utilizada é apresentado na Tabela 1.2.

TABELA 1.2- Pontuação baseada em sistema de *score* para diagnóstico da DW.

Sintomas	Score
Anéis de Kayser-Fleischer	
Presentes	2
Ausentes	0
Sintomas Neurológicos	
Graves	2
Moderados	1
Ausentes	0
Ceruloplasmina Sérica	
Normal (>0,2 g/L)	0
0,1-0,2 g/L	1
<0,1 g/L	2
Anemia Hemolítica Negativa para Coombs	
Presente	1
Ausente	0
Exames Laboratoriais	
Cu no Fígado (na ausência de Colestase)	
> 250 µg (>4 µmol/g)	2
50-249 µg (0,8-4 µmol/g)	1
Normal: <50 µg (<0,8 µmol/g)	-1
Grânulos Rodamina Positivos	1
Cu Urinário (na ausência de Hepatite aguda)	
Normal	0
1-2x acima do valor normal	1
>2x acima do valor normal	2
Normal, mas >5x normal depois de Penicilamina	2
Análise de mutação da ATP7B	
Detectada nos dois cromossomos	4
Detectada em um cromossomo	1
Não detectada	0
Score Total	Avaliação
≥ 4	Diagnóstico estabelecido
3	Diagnóstico possível, necessidade de testes adicionais
≤ 2	Diagnóstico pouco provável

Fonte: SANCHEZ-MONTEAGUDO et al. (2021)

Embora a pontuação de Leipzig seja útil, nem sempre essa produz resultados claros e precisos quanto ao diagnóstico. Já os testes genéticos são caros e de difícil acesso para população (SANCHEZ-MONTEAGUDO et al., 2021).

Portanto, o diagnóstico da DW é geralmente difícil, visto que não existe um teste específico, os sintomas usualmente são complexos e a DW afeta muitos sistemas e órgãos humanos diferentes, o que resulta em sobreposição com outras patologias (LIN et al., 2014). Por se tratar de uma doença rara, o diagnóstico da DW exige cuidado minucioso, onde erros são comuns, resultando na falta de tratamento rápido e adequado para muitos pacientes (FERNANDES, 2016; LIN et al., 2014). A Tabela 1.3 resume os testes de rotina empregados no diagnóstico da DW.

TABELA 1.3- Testes de rotina para o diagnóstico da DW, achados típicos, falsos negativos e falsos positivos.

Teste	Falsos Negativos	Falsos Positivos
Ceruloplasmina sérica	-Níveis normais em pacientes com inflamação hepática; -Gravidez; -Terapia hormonal com estrogênios;	- Pacientes com má absorção, desnutrição e/ou aceruloplasminemia; - Heterozigotos;
Excreção urinária de Cu em 24h	- Coleta incorreta; - Crianças sem DW hepática;	- Necrose hepatocelular; - Colestase; - Contaminação;
Cu hepático	- Variação regional em pacientes com doença hepática ativa ou nódulos de regeneração	- Síndrome colestática;
Anéis de K-F	- Ausente em até 50% dos pacientes com DW hepática; - Ausente na maioria dos irmãos assintomáticos	- Cirrose biliar primária; - Colestase;

Fonte: Adaptado de CZLONKOWSKA et al. (2018)

1.2.4. Tratamento para a Doença de Wilson

A DW é um dos poucos distúrbios metabólicos hereditários, potencialmente fatal, com tratamento relativamente simples através do uso de medicamentos, caso seja estabelecido um diagnóstico precoce (CZLONKOWSKA et al., 2018).

Com exceção do transplante de fígado, o tratamento da DW é paliativo e destina-se a restaurar e manter o equilíbrio do Cu no organismo, não eliminando o defeito genético responsável pela doença. Sendo assim, o tratamento exige um compromisso vitalício. Apenas a limitação de ingestão de Cu na dieta geralmente é ineficaz e o uso de fármacos é necessário no tratamento (PFEIFFER, 2007). Assim, faz-se uso de medicamentos quelantes de Cu, os quais diminuem a absorção intestinal do metal e o acúmulo em outros órgãos. A penicilamina é o tratamento adotado na maioria dos casos e outras opções incluem a trientina e o Zinco (Zn) (ALA et al., 2007; SIAJ et al, 2012).

O uso de Zn no tratamento da DW tem assumido um papel importante no manejo da doença. Administrado como sais de acetato, sulfato ou gluconato, o Zn reduz a absorção intestinal de Cu dietético através da indução da formação de metalotioneína em enterócitos intestinais. O aumento da metalotioneína liga-se então ao Zn e ao Cu, aprisionando-os nas células da mucosa intestinal, que são eventualmente eliminadas e excretadas nas fezes (PFEIFFER, 2007).

A penicilamina atua como quelante de Cu. Mais de 80% da excreção de penicilamina ocorre na urina, com Cu quelado. A penicilamina também pode induzir a formação da metalotioneína. Assim, a penicilamina aumenta a excreção urinária de Cu, mas também pode levar ao sequestro de Cu intracelular livre (ALA et al., 2007). Devido aos possíveis efeitos adversos da penicilamina que ocorrem em 10-20% dos pacientes, podendo ser suficientemente graves e levar a

interrupção do tratamento, é recomendado um monitoramento regular durante a sua administração (STERNLIEB e SCHEINBERG, 1968).

A trientina também é um agente quelante de Cu com mecanismo de ação semelhante ao da penicilamina, aumentando a excreção urinária de Cu. Porém a trientina apresenta uma melhor tolerância quando comparado a penicilamina, apresentando menores efeitos colaterais (WALSHE, 1982).

O transplante de fígado em pacientes com DW corrige os defeitos metabólicos da doença e restaura a excreção normal de Cu, bem como reestabelece a função hepática a níveis normais. No entanto, o transplante de fígado é um procedimento complexo e reservado para pacientes com insuficiência hepática aguda ou cirrose descompensada (FERNANDES, 2016; MULLIGAN e BRONSTEIN, 2020).

Atualmente no Brasil, apenas os sais de penicilamina e Zn estão disponíveis para o tratamento dos pacientes com DW, uma vez que a trientina não é encontrada no SUS desde 2014. Para os pacientes com doença hepática que apresentam efeitos adversos à penicilamina, a única alternativa são os sais de Zn; o que pode ser uma fatalidade, porque a melhora é muito lenta e a condição clínica do paciente pode estar avançada para esperar por efeitos benéficos a longo prazo. Mesmo para a penicilamina, sempre ocorrem períodos de interrupção da distribuição do medicamento pelo SUS, o que também dificulta o tratamento da DW (CANÇADO e BARBOSA, 2019).

1.3. Análise Metabolômica

O termo “ômica” refere-se a qualquer tipo de estudo específico que forneça informações coletivas sobre um sistema biológico. As ômicas incluem as análises genômicas, transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas, incluindo a lipidômica ou glicômica. Cada técnica ômica é crucial para a compreensão de vários sistemas biológicos e complementa as informações fornecidas por outras abordagens (Figura 1.5). As principais vantagens da metabolômica são que os metabólitos estão intimamente relacionados aos fenótipos dos organismos vivos e fornecem informações sobre as atividades bioquímicas, refletindo os substratos e produtos do metabolismo celular. Os metabólitos são tipicamente biomoléculas de baixo peso molecular (<1.500 Da). Eles são os blocos de construção do genoma, proteoma e membranas celulares e desempenham papéis importantes na biologia como moléculas ligantes, fontes de energia e intermediários metabólicos. Seus níveis fornecem informações sobre as funções biológicas e definem os fenótipos dos sistemas biológicos em resposta a mudanças genéticas ou ambientais (KIM et al., 2016).

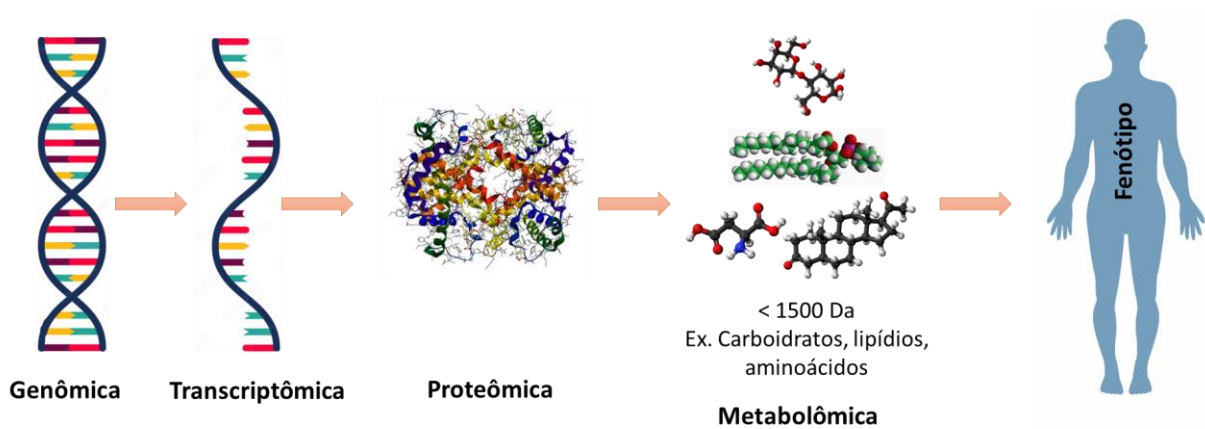


FIGURA 1.5- Classificação das ciências “ômicas”. Genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica que definem o fenótipo. Adaptado de KIM et al. (2016)

As estratégias utilizadas para investigação metabolômica podem ser classificadas de duas formas: metabolômica alvo (*target metabolomics*) ou metabolômica global (*untarget metabolomics*). A metabolômica alvo fornece informações quantitativas de um ou mais metabólitos pré-selecionados de determinada classe química ou que estejam associados a rotas metabólicas de interesse (YUAN et al., 2012). Já a metabolômica global, está baseada na análise qualitativa do maior número possível de metabólitos, contidos no metaboloma de células, biofluidos ou tecidos (WANT et al., 2013). Essas abordagens se referem a medidas comparativas entre grupos de amostras, sendo um grupo estudo e um controle. A comparação do metaboloma de um grupo sujeito a alterações ambientais ou genéticas (grupo estudo), por exemplo, com um grupo de indivíduos não alterados (grupo controle), pode fornecer informações importantes para o entendimento do fenótipo de um organismo, auxiliando na compreensão biológica de diversos sistemas (CANUTO et al., 2018).

A análise metabolômica evoluiu juntamente com o desenvolvimento da instrumentação analítica, onde diversas técnicas instrumentais vêm sendo aplicadas na análise de metabólitos, sendo as mais comuns a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massa (MS), acoplada a técnicas de separação, como a cromatografia gasosa (GC-MS), eletroforese capilar (CE-MS) e cromatografia líquida (LC-MS) (LENZ e WILSON, 2007).

O uso de RMN para estudos metabolômicos é vantajoso pelo fato desta ser uma técnica não-destrutiva, robusta, de simples preparo de amostra e reprodutível. Porém, apesar das suas vantagens, a técnica de RMN também apresenta alguns desafios, sendo o mais significativo a sua sensibilidade que, em comparação com as técnicas de LC-MS e GC-MS, pode apresentar de 10 a 100 vezes menor sensibilidade. Com isso, o emprego de LC-MS e GC-MS corresponde a mais de 80% dos trabalhos publicados em análises metabolômicas (EMWAS et al., 2019).

A técnica de detecção por MS é a mais favorável para metabolômica, uma vez que proporciona análises rápidas, alta sensibilidade e seletividade, além de ser capaz de detectar uma gama diversificada de espécies moleculares comparada as demais técnicas (KIM et al., 2016). A MS acoplada a técnicas de separação, como a cromatografia líquida (LC), cromatografia gasosa (GC) e eletroforese capilar (CE), tem várias vantagens, uma vez que possibilitam o aumento de seletividade com a separação dos compostos de interesse antes da detecção. A supressão de íons, que geralmente é causada por uma matriz biológica complexa, pode ser contornada através do emprego de técnicas de preparo de amostras para eliminar sais, proteínas e outros contaminantes. Além disso, a informação de tempo de retenção, ou migração do metabólito previamente separado, auxilia na identificação de metabólitos com o emprego de padrões analíticos (KIM et al., 2016; METZ et al., 2007).

A técnica de GC-MS é bastante empregada para a detecção de metabólitos voláteis de baixa massa molecular (50-600 Da). No entanto, para a detecção de metabólitos polares, termolábeis e não voláteis, é necessário o uso de derivatização química como etapa de preparo de amostras. A etapa de derivatização é trabalhosa e pode introduzir erros durante o procedimento, gerando perdas de analitos por volatilização, falta de reprodutibilidade, além de limitar o número de amostras a serem preparadas simultaneamente (BEALE et al., 2018). Com isso, o acoplamento LC-MS é mais atrativo do que GC-MS, uma vez que a etapa de derivatização da amostra não é necessária. Ainda a técnica de LC-MS apresenta alta robustez, sensibilidade e seletividade, sendo considerada abrangente em relação à classe de compostos a serem analisados e, devido à grande variedade de fases estacionárias disponíveis, diferentes modos de separação podem ser empregados, como a eluição no modo reverso de eluição (RPLC), a cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) e a cromatografia de troca iônica (IC) (NÚÑEZ et al., 2013).

Em geral, a fonte de ionização mais utilizada em trabalhos de metabolômica por LC-MS é a fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) em modo positivo e negativo de ionização para obter o perfil de detecção mais abrangente possível (LENZ e WILSON, 2007). A ionização por ESI é uma ionização branda, que minimiza a fragmentação das moléculas, tornando possível gerar espectros reprodutíveis e, conseqüentemente, bibliotecas de compostos. Ensaios metabolômicos por LC-MS geralmente fazem o uso de analisadores de massas de alta resolução (HRMS) para metabolômica global, como o analisador quadruplo-tempo-de-vôo (QqTof) ou Orbitrap (Thermo Scientific), os quais possibilitam a aquisição simultânea de espectros no modo *full-MS-scan* e de fragmentação (MS^2) com alta exatidão de massa (erros de massa ≤ 2 -5ppm). Os analisadores de alta resolução simplificam a identificação de compostos através da exatidão na medida de massa exata (m/z), contribuição isotópica e informações estruturais decorrentes dos espectros de fragmentação (LIU e LOCASALE, 2017).

Os dados metabolômicos obtidos por análises por LC-HRMS são complexos e requerem o uso de ferramentas de bioinformática para tornar possível a visualização e análise dos metabólitos discriminantes presentes nas amostras controle e estudo, onde frequentemente são aplicadas técnicas de análises multivariadas e univariadas (LOPES et al., 2017).

As análises multivariadas podem ser feitas por métodos não-supervisionados (onde a classificação da amostra não é levada em consideração para construção do modelo), como a análise de componentes principais (PCA), visando o entendimento global das amostras, assim como a detecção de tendências, padrões ou agrupamentos. Outro método muito utilizado nas análises multivariadas em metabolômica é o método supervisionado (onde a classificação da amostra é usada na construção do modelo), sendo a mais comum a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), com o objetivo de obter uma correlação entre as variáveis químicas e o conjunto de dados usado (PILON et al., 2020).

A análise univariada tem sido usada em conjunto com a análise multivariada para estudar a variação e testar a significância estatística de parâmetros e variáveis em estudos de metabolômica (PILON et al., 2020). Na análise univariada, os metabólitos são testados um de cada vez entre os grupos de forma independente. Antes da escolha do teste univariado, é necessário avaliar a normalidade de distribuição dos dados por meio de diferentes testes disponíveis, dependendo do tamanho do conjunto de dados. Geralmente, Shapiro-Wilks é o mais usado para avaliar a normalidade de distribuição em pequenos conjuntos de amostras, enquanto Lilliefors é mais indicado para grupo de amostras maiores. Após a confirmação da distribuição normal dos dados, testes paramétricos são aplicados para destacar as variáveis significativas, sendo os mais comuns o *teste de t-Student* e ANOVA. Quando muitos testes são realizados e uma grande quantidade de compostos são investigados, como nas análises metabolômicas, o risco de gerar falsos positivos e *overfitting* aumenta. Na metabolômica, esses erros, conhecidos como erro do tipo I, são particularmente indesejáveis porque podem comprometer os resultados do estudo. Assim, deve-se sempre aplicar correções para múltiplos testes, como a correção de Bonferroni e a taxa de falsa descoberta (FDR), que são as mais utilizadas (MASTRANGELO et al., 2015).

Os metabólitos significativamente alterados ($p \leq 0,05$) passam para a etapa de identificação, onde bancos de dados podem ser utilizados como ferramentas de pesquisa. Os mais comumente empregados são HMDB (WISHART et al., 2007), KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000), PubChem (WANG et al., 2009), LIPID MAPS (FAHY et al., 2007), entre outros. Uma vez anotados putativamente, os metabólitos são associados as suas respectivas vias metabólicas e as hipóteses sobre o problema biológico principal do estudo metabolômico são geradas (LOPES et al., 2017).

1.3.1. Doenças Raras e Metabolômica

As doenças raras muitas vezes apresentam sintomas clínicos atípicos e exigem exames laboratoriais específicos para se chegar ao diagnóstico correto. No entanto, os procedimentos convencionais são baseados em uma série de testes bioquímicos sequenciais que necessitam de várias plataformas analíticas separadas. Esse tipo de abordagem em muitos casos é lenta, demorada e complexa, enquanto o ideal são testes bioquímicos mais rápidos e precisos para permitir o diagnóstico precoce e melhor monitoramento das doenças. Nesse contexto, a metabolômica representa uma oportunidade para fornecer ferramentas inovadoras para o diagnóstico rápido de DRs, além de fornecer uma visão rica do fenótipo do indivíduo (TEBANI et al., 2016).

A metabolômica surgiu como uma promessa considerável de avanços na compreensão das DRs, incluindo a compreensão dos erros inatos do metabolismo (IEM). A aplicação da metabolômica na pesquisa de IEM já levou à descoberta de novos tipos de IEMs e à identificação de novos biomarcadores (MANDAL et al., 2018). No entanto, com centenas de IEMs conhecidos e mais de 700 metabólitos associados aos IEM, o maior desafio está na identificação de novos metabólitos detectados. Além disso, diferentemente do genoma, o metaboloma sofre grande influência do ambiente e de fatores externos, como uso de fármacos, dieta, cigarro, obesidade, saúde mental e horário de coletas de amostras dos pacientes. (SILVA NETO, 2023; MANDAL et al., 2018)

A metabolômica global permite aprofundar a compreensão dos mecanismos das doenças raras (inclusive EIMs), permitindo descobertas de biomarcadores, novas opções de tratamento e terapias personalizadas, através de perfis metabólicos obtidos de fluidos biológicos (SILVA NETO, 2023). Dentro desse cenário, podemos destacar a saliva como um fluido biológico atraente por ter diversas vantagens importantes como uma coleta não invasiva, custo mínimo, fácil

manuseio e fácil tratamento de amostras. A saliva é um fluido complexo contendo uma variedade de metabólitos, proteínas, RNAs, DNAs, enzimas, hormônios, anticorpos, constituintes antimicrobianos, fatores de crescimento e outras moléculas que podem estar associadas ao fenótipo de doenças. Se descobertas e validadas com sucesso, essas moléculas informativas podem servir como biomarcadores, levando ao uso de biofluido não invasivo para detecção e monitoramento de doenças (ZHANG et al., 2012).

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar metabólitos discriminantes presentes nas amostras de saliva de indivíduos portadores da Doença de Wilson, comparativamente com um grupo de indivíduos saudáveis, e avaliar as possíveis alterações bioquímicas decorrentes da Doença de Wilson. A partir dos resultados, obter potenciais candidatos a biomarcadores que possam fornecer informações sobre as alterações nas vias metabólicas de pacientes, visando contribuições científicas para serem aplicadas no diagnóstico da doença, de forma rápida e com maior especificidade. Assim como investigar o potencial da saliva como biofluido não invasivo para auxiliar na identificação de alterações bioquímicas da Doença de Wilson.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Generalidades

Os experimentos foram realizados no *SEPARARE* - Núcleo de Pesquisa em Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os reagentes e solventes utilizados no preparo de amostras e análises por LC-HRMS foram todos de alto grau de pureza, sendo ácido fórmico (grau MS, Sigma-Aldrich, Alemanha), acetonitrila (ACN) (grau HPLC, Merck, Estados Unidos), metanol (MEOH) (grau HPLC, Merck, Estados Unidos) e etanol (grau HPLC, Merck, Estados Unidos). Todas as soluções aquosas utilizaram água ultrapura proveniente de um sistema Milli-Q (Millipore, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Para o preparo de amostras, utilizou-se micropipetas Gilson (Gilson, Estados Unidos) e/ou Eppendorf (Eppendorf, Alemanha), vórtex MS3 basic (IKA, Alemanha) e centrifuga refrigerada 5415R (Eppendorf®, Alemanha). Para a coleta das amostras de saliva foram utilizados coletores de algodão Salivette® (Sarstedt, Alemanha).

3.2. Amostras Clínicas e Indivíduos Participantes

As amostras clínicas foram coletadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP, mediante prévia aprovação pelo Comitê de Ética de Pesquisa do Hospital das Clínicas de São Paulo da Universidade de São Paulo, Escola de Medicina Protocolo 3.728.710, assim como a obtenção da assinatura do Termo de Assentimento dos participantes (Anexo1). As amostras biológicas de saliva dos pacientes com Doença de Wilson (WD) foram coletadas pela enfermeira Celina Teixeira Prado, no Hospital das

Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Clínica de Gastroenterologia. Os pacientes foram selecionados e monitorados pelo Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado. O grupo controle foram pessoas saudáveis e as amostras biológicas foram coletadas na Universidade Federal de São Carlos.

Foram coletadas amostras de saliva de 24 indivíduos portadores da DW e de 39 indivíduos saudáveis pertencentes ao grupo controle. A faixa etária dos participantes da pesquisa foi de 20 a 67 anos. Os participantes foram divididos em dois grupos: indivíduos com a doença de Wilson (DW) e indivíduos saudáveis (GC). Todas as pessoas participantes do estudo estão descritas na Tabela 3.1.

TABELA 3.1- Características dos Participantes do Estudo. *(continuação)*

Grupos						
GC			DW			
ID	Gênero		ID	Gênero		Idade (anos)
	Masculino	Feminino		Masculino	Feminino	
1			1			27
2			2			33
3			3			37
4			4			27
5			5			52
6			6			43
7			7			26
8			8			44
9			9			29
10			10			43
11			11			22
12			12			56
13			13			43
14			14			52
15			15			41
16			16			38
17			17			20
18			18			36
19			19			38
20			20			67
21			21			24
22			22			39
23			23			43
24			24			54
25						58
26						25
27						22
28						29
29						32
30						28
31						27
32						38
33						27

TABELA 3.1- Características dos Participantes do Estudo.

Grupos								
GC			DW					
ID	Gênero		Idade (anos)	ID	Gênero		Idade (anos)	ID
	Masculino	Feminino			Masculino	Feminino		
34			30					
35			31					
36			27					
37			21					
38			29					
39			24					
	18	21		14	10			
Total (n)	39			24				

3.3. Coleta e Preparo das Amostras de Saliva

As amostras de saliva foram coletadas utilizando um coletor de algodão (Salivettes®), com os participantes em jejum de 12 horas. Os coletores de algodão foram removidos dos frascos e inseridos na boca dos indivíduos e mantidos por 2 minutos, sem mastigação. Posteriormente, os Salivettes® foram removidos, colocados no frasco coletor e esses foram centrifugadas a 7.267 g a 4°C por 5 min e a saliva extraída foi transferida para tubos de centrifugação de 1,5 mL e armazenadas a -80°C até o preparo. No preparo das amostras, as amostras de saliva foram degeladas em banho de gelo e em uma alíquota de 150 µL de saliva adicionou-se 450 µL de metanol gelado para a precipitação de proteínas, sendo uma proporção de (1:3 v/v).

A mistura obtida foi armazenada a -20°C por 5 minutos, depois agitada no vórtex por 20 segundos e centrifugada a 7.267 g a 4°C por 10 minutos. A seguir, alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram transferidas para novos tubos de centrifugação de 1,5 mL e armazenados a -80°C até as análises por LC-HRMS.

Amostra de brancos controle (CBs) foram preparadas empregando-se o mesmo procedimento, no entanto, substituindo o volume da amostra de saliva por 150 μL de água Milli-Q. As amostras de controle de qualidade (QCs) foram preparadas alíquotando 15 μL de cada amostra individual de saliva de todos os participantes ($n= 63$), já submetidas à etapa de extração, e transferidas para um tubo de centrifugação de 5 mL, seguidas por homogeneização por 10 s em vórtex, gerando uma amostra representativa de todos os indivíduos participantes.

3.4. Análises por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) para a análise randomizada das amostras de saliva. Para tal, empregou-se um sistema UHPLC Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) composto por uma bomba binária (G7120A), autoinjeter (G7129B) e um compartimento de coluna (G7116B) acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução híbrido com analisador quadrupolo-tempo de vóo (QqToF) modelo Impact HD (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), com uma fonte de ionização por *eletrospray*, operando em modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) de ionização. A separação cromatográfica das amostras de saliva foi realizada no modo reverso de eluição (RPLC), empregando uma coluna Zorbax Eclipse XDB C18 (100 x 3,0 mm i.d; 3,5 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) mantida a 50 °C. As fases móveis A e B foram constituídas por: A) água com 0,1% ácido fórmico e B) ACN com 0,1% de ácido fórmico conforme gradiente descrito na Tabela 3.2. A vazão da fase móveis usada foi de 0,400 mL/min, com volume de injeção de 3 μL , temperatura do autoinjeter mantida a 15°C e um tempo total de análise de 30 min.

TABELA 3.2- Perfil do gradiente cromatográfico utilizado nas análises por LC-HRMS.

Tempo (min)	B (%)
0,00	1,00
3,00	2,00
5,00	50,00
10,00	80,00
13,00	90,00
15,00	95,00
18,00	95,00
22,00	99,00
28,00	99,00
28,10	1,00
30,00	1,00

Na etapa de limpeza da coluna, a válvula de 6 caminhos redirecionou a vazão da fase móvel para o descarte, ao mesmo tempo em que possibilitou a infusão da solução de calibração (formiato de sódio 1 mmol/L em ACN) para a fonte de ionização. Essa etapa viabiliza a aquisição de íons de referência para a calibração de massas de cada análise.

A sequencia de análise iniciou com injeção de solvente (n=3), seguida com a injeção das amostras branco (QB; n=5) e a injeção das amostras de controle de qualidade (QC; n=5). As amostras QC foram analisadas intercaladas a cada 10 injeções das amostras dos indivíduos participantes, as quais foram injetadas randomizadas.

As amostras de saliva foram analisadas no modo positivo (ESI+) e no modo negativo (ESI-) de ionização, usando aquisição dependente de dados (DDA),

com intervalo de massas m/z 50 a 1300. Os parâmetros de aquisição de dados foram definidos da seguinte forma: voltagem capilar de +4,0 kV (ESI+) e -3,5 kV (ESI-); end platte offset: 500 V; gás nebulizador: 4 bar; temperatura do gás de secagem: 180 °C; vazão de gás de secagem: 8 L/min; energia da célula de colisão: 5 eV e faixa de varredura de *full MS scan*, m/z 50-1300. O modo MS/MS de aquisição foi conduzido com radiofrequência (RF) de colisão foi definida para variar de 200,0 a 550,0 Vpp; o tempo de transferência de íons foi ajustado para variar de 50,0 a 90,0 μ s; com temporização de 50,0% em cada. As RFs 1 e 2 do funil foram de 250,0 e 150,0 Vpp, respectivamente. A RF do hexapolo foi de 50,0 Vpp, a energia do íon quadrupolo foi de 5,0 eV com armazenamento pré-pulso de 6,0 μ s. Os parâmetros usados para disparar a fragmentação MS/MS foram 2,0 Hz para baixas contagens (10.000 contagens/por 1.000 somas) e 4,0 Hz para altas contagens (100.000 contagens/por 1.000 somas), usando um tempo de ciclo total de 3s; com limite absoluto de 1.491 contagens (302 contagens/por soma de 1.000), exclusão ativa de 1 espectro; com liberação após 0,90 min, enquanto a aquisição no modo full MS scan foi definida em 2,0 Hz. A energia de colisão utilizada para fragmentação dos íons foi programada para variar de 250,0 a 100,0% dos 20 eV inicialmente ajustados.

A calibração interna do QqToF foi realizada com uma solução 1 mmol/L de formiato de sódio preparado em acetonitrila, usando um modelo de regressão quadrática de calibração de alta precisão (HPC). A solução de calibração foi injetada no final de cada análise e todos os dados MS e MS/MS foram recalibrados antes da identificação dos compostos. Os dados foram obtidos com o *Qtof Control Software v3.4* e processados com o *software Brucker Data Analysis® v4.3*, ambos da Brucker (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

3.5. Mineração e Pré-processamento dos dados

Os dados brutos foram processados no software *Data Analysis*® (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha). A detecção de picos, extração e alinhamento dos *features* moleculares dos dados adquiridos por LC-HRMS foi realizada através do software *Bruker Compass ProfileAnalysis v4.2*, onde os dados brutos foram obtidos com a elaboração de uma matriz de variáveis (*bucket table*) que representa as intensidades dos sinais em um respectivo intervalo de tempo de retenção de 0 a 26 minutos, no intervalo de m/z 50 a 1300 e com máximo de 30% de *missing values*. Para a busca das características moleculares (*Find Molecular Features*), utilizando alinhamento por tempo, foram estabelecidos os seguintes parâmetros: limite sinal/ruído (S/N) = 2, limite de coeficiente de correlação = 0.2, aquisição mínima de 10 espectros (*scans*) e filtro – *value count of bucket* ≥ 70 %.

A planilha de dados foi obtida no formato *.txt*, onde os pontos foram substituídos por vírgula e os dados foram então pré-processados utilizando o Excel (Microsoft Office 2016). Inicialmente procedeu-se com a subtração dos sinais detectadas nas amostras branco (QB) de todas as amostras dos indivíduos em estudo, onde foram excluídos todos os *features* moleculares que apresentaram intensidade de sinal inferior a 5% das intensidades dos sinais presentes nas amostras dos indivíduos. Na sequência, procedeu-se com a inspeção da qualidade dos dados empregando-se as amostras de QCs. Nessa etapa, foram verificadas a presença dos *features* moleculares detectados em pelo menos 80% do total de amostras de QCs analisadas, para assegurar a boa qualidade dos dados. Adicionalmente, a repetibilidade das análises obtidas das amostras QCs foi verificada através do desvio padrão relativo (RSD) entre todas as réplicas de injeção, com emprego do cálculo do coeficiente de variação (CV). Os *features* moleculares que apresentaram $CV \geq 30\%$ foram excluídos das amostras QCs e das amostras dos indivíduos em estudo. Adicionalmente, foram excluídos os *features*

moleculares que possuíam dados ausentes (*missing value*) superiores a 80%, tanto das amostras de QC quanto das amostras dos indivíduos em estudo. Para as amostras que possuíam *missing value* $\leq 80\%$, os dados foram imputados usando o algoritmo *k-Nearest Neighbors* (KNN) com o software online Noreva 2.0 (<http://idrblab.cn/noreva/#part2.4>). Para a normalização dos dados com relação a erros sistemáticos relacionados à variabilidade instrumental, utilizou-se o software *Lowess/Spline normalization tool v1.1* que promove uma suavização da dispersão dos dados pelo emprego das análises das amostras de controle de qualidade (QCs) localmente por correção de sinal (QC-RLSC; do inglês: *locally weighted scatter-plot smoothing*). Ou seja, o desvio do sinal de cada *feature* molecular nas amostras dos indivíduos em estudo é corrigido pela mudança no sinal do mesmo *feature* molecular, presente nas amostras de QCs, o que permite a correção da variabilidade temporal do sinal de um mesmo *feature* molecular em todas as amostras estudo e QCs.

3.6. Análises Estatísticas Multivariadas e Univariadas

Após o pré-processamento, os dados foram submetidos ao processamento no software online MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>), para a condução de análises estatísticas multivariadas. Os dados obtidos das análises provenientes do modo de ionização positivo e negativo foram escalonados utilizando o método de auto-escalonamento. A discriminação entre os grupos DW e GC foi avaliada pela Análise de Componentes Principais (PCA) e pela Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). As variáveis discriminantes (*features*) das classes foram selecionadas no modelo PLS-DA através da Importância da Variável de Projeção (VIP) onde foram considerados $VIP \text{ score} \geq 1,0$. Foi feita a validação cruzada para avaliar a capacidade preditiva do modelo, considerando-se os valores

de coeficiente de determinação (R^2), coeficientes de correlação (predição) Q^2 e teste de permutação, sendo considerados aceitáveis valores de $R^2 \geq 0,7$, $Q^2 \geq 0,5$ e p -permutação $< 0,05$.

A normalidade da distribuição dos *features* moleculares foi verificada utilizando os testes de Shapiro-Wilk. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram normalizados por transformação Box-Cox, com emprego do software Develve. Após o teste de Shapiro-Wilk, foram realizados teste de *t-Student*, com nível de confiança $p < 0,05$, para avaliar o impacto da idade dos indivíduos no grupo de dados de amostras independentes.

Com os dados normalizados, empregou-se a análise ANCOVA para obter os p -valores e taxa de falsa descoberta (FDR), permitindo selecionar o *features* moleculares estatisticamente significativos. Essas análises foram realizadas usando o software estatístico PASW versão 25.0 (SPSS, Chicago, IL). O nível de significância adotado foi de 5%.

3.7. Identificação dos metabólitos e Importância biológica

A anotação putativa dos *features* moleculares estatisticamente significativos foi realizada através de bancos de dados de livre acesso, sendo esses: *CEU Mass Mediator* (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>), *Human Metaboloma Database-HMDB* (<http://www.hmdb.ca/>) e *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram utilizadas as informações de massa exata (m/z) com exatidão < 10 ppm, os espectros de fragmentação (MS/MS) de cada íon com tolerância de 10 ppm e similaridade isotópica. Foram considerados os seguintes adutos: $[M+H]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ e $[M+H-H_2O]^+$ no modo positivo. Já para os adutos no modo negativo foram considerados: $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ e $[M-H_2O-H]^-$.

Após a anotação putativa dos metabólitos foram geradas curvas características de operação do receptor (ROC; do inglês: *receiver operating characteristic*), exibindo taxas de sensibilidade e especificidade, com um intervalo de confiança de 95%. As vias bioquímicas com importância biológica foram obtidas através da anotação dos metabólitos estatisticamente significativos, empregando a ferramenta *Pathway Analysis* do software *Metaboanalyst* v5.0, com base no banco de dados *Homo sapiens* disponibilizada pelo *Small Molecule Pathway Database* (SMPDB).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Perfil dos indivíduos

Participaram do estudo um total de 63 indivíduos sendo 24 (38,1%) do grupo estudo (DW) e 39 (61,9%) do grupo controle (GC). O grupo DW foi formado por 10 (15,9%) indivíduos do sexo feminino e 14 (22,2%) do sexo masculino, com média de idade 39 ± 12 anos. O grupo GC foi composto por 21 (33,3%) indivíduos do sexo feminino e 18 (28,6%) do sexo masculino, com média de idade 31 ± 9 anos (Tabela 4.1).

TABELA 4.1- Perfil dos participantes dos grupos de estudo (DW) e grupo controle (GC).

		<i>Grupos</i>		<i>Total</i>	
			DW	GC	
			10	21	31
<i>Sexo</i>	Feminino	Grupo	41.7%	53.8%	49.2%
		Total	15.9%	33.3%	49.2%
	Masculino	Grupo	14	18	32
		Total	58.3%	46.2%	50.8%
Total			24	39	63
			38.1%	61.9%	100.0%
<i>Idade</i>	Grupo		Média(anos)	SD (%)	
	DW	24	38.9	11.8	
	GC	39	31.1	9.3	

DW: grupo estudo com Doença de Wilson; GC: grupo controle de indivíduos saudáveis; SD: desvio padrão.

4.2. Análise Metabolômica Global de Saliva por LC-HRMS

As amostras de saliva analisadas por eluição no modo RPLC resultaram em 133 ESI(+) e 92 ESI(-) *features* moleculares, respectivamente, no

modo positivo e negativo de ionização. As Figuras 4.1 e 4.2 ilustram exemplos de cromatogramas obtidos nos diferentes modos de ionização. Pode-se observar que houve a eluição de compostos durante toda a análise cromatográfica.

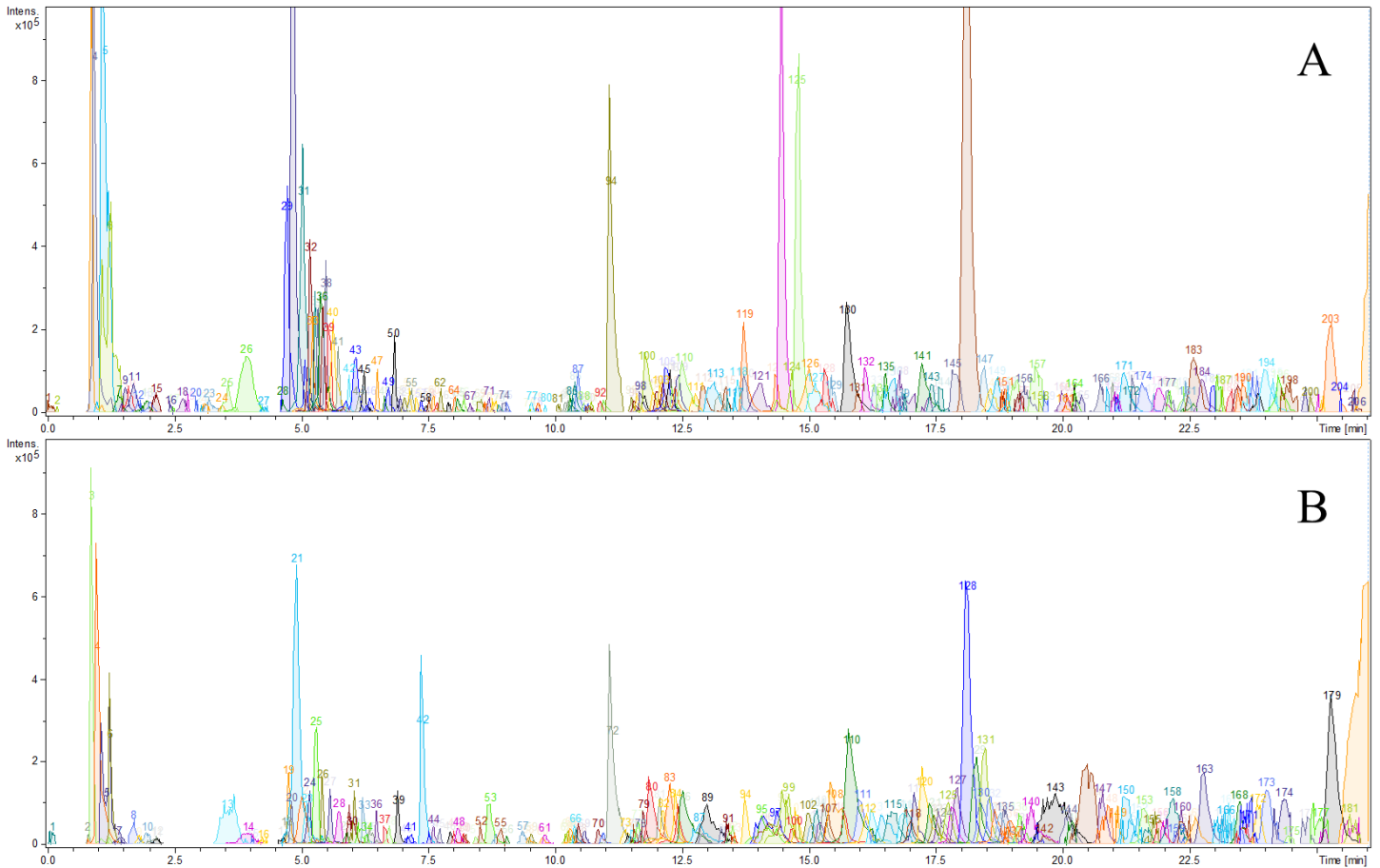


FIGURA 4.1- Cromatograma de íons extraídos das análises de saliva no modo RPLC com ESI(+). **(A)** Amostra do grupo DW; **(B)** Amostra do grupo GC.

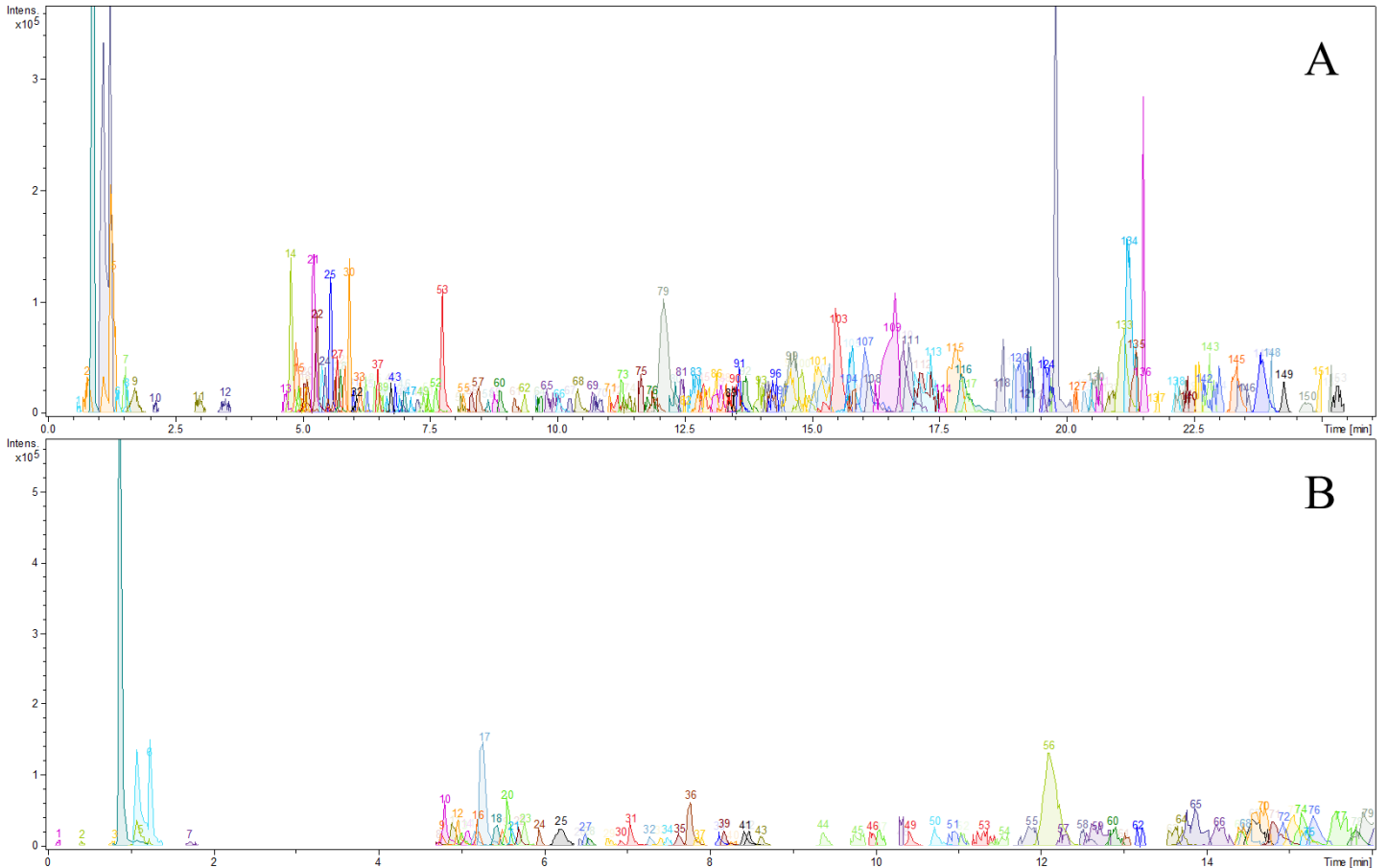


FIGURA 4.2- Cromatograma de íons extraídos das análises de saliva no modo RPLC com ESI(-). **(A)** Amostra do grupo DW; **(B)** Amostra do grupo GC.

4.3. Pré-processamento dos dados

Os dados metabolômicos gerados por LC-HRMS são de alta complexidade e em 3 dimensões, sendo esses m/z , tempo de retenção (t_R) e intensidade de sinal (*counts*). Por esse motivo foram pré-processados pelo software *Profile Analysis* para obtenção de uma matriz de dados em 2 dimensões onde está relacionado um *feature* molecular (m/z) e um tempo de retenção (t_R) (par m/z - t_R) em função da intensidade do sinal. A matriz de dados obtida foi então convertida para uma tabela Excel, onde os *features* moleculares que apresentaram intensidade de sinal superior a 5% das intensidades dos mesmos *features* moleculares detectados nas amostras QB foram mantidos, enquanto os *features* moleculares que

apresentaram coeficiente de variação (CV) > 30% entre as réplicas de análise, em relação as amostras de QC, e *missing value* > 80% foram removidos. Os demais dados faltantes foram imputados pelo método KNN e normalizados por método *LOWESS/Spline*, uma normalização que utiliza a ordem de injeção das amostras de QC para corrigir diferenças nos sinais analíticos dos *features* moleculares decorrentes de erros sistemáticos. Essas etapas são importantes para as análises estatísticas posteriores.

Após a etapa de pré-processamento dos dados foram obtidos 59 *features* moleculares provenientes do modo ESI(+) e 42 *features* moleculares do modo ESI(-), sendo esses empregados nas análises estatísticas multivariadas.

4.4. Análise Multivariada

Para as análises multivariadas, os dados foram escalonados empregando-se o autoescalamento e submetidos a um método não supervisionado de reconhecimento de padrões, sendo esse a análise de componentes principais (PCA). Na análise PCA não supervisionada, não é apresentado ao modelo a classificação do conjunto de dados, permitindo avaliar o agrupamento de dados (ou a análise de *clusters*) e a predição de separação dos grupos em estudo. Primeiramente, uma análise multivariada não supervisionada PCA das amostras em estudos (DW e GC) e das amostras QCs foi realizada para avaliar a qualidade dos dados (Figura 4.3A-B). O agrupamento observado para as amostras QCs indicam a estabilidade instrumental, com a ausência de erros instrumentais, durante toda a sequência de aquisição de dados. O agrupamento das amostras QCs encontra-se localizado próximo do centro dos *plots*, sendo a variabilidade (distância euclidiana entre os pontos) no grupo de QCs menor do que a variabilidade observada para os grupos de amostras DW e GC. Esse comportamento é o esperado visto que para o grupo QCs são realizadas réplicas de

injeção, enquanto para os grupos DW e GC são realizadas réplicas biológicas. Ainda, os resultados obtidos resultaram em padrões de agrupamentos entre as amostras de cada um dos dois diferentes grupos em estudo (DW vs GC), em ambos os modos de ionização estudados. E, por ser tratar de uma análise não supervisionada, os modelos mostraram-se satisfatórios para os resultados das análises de LC-HRMS no modo positivo e negativo de ionização (Figura 4.3A e Figura 4.3B, respectivamente).

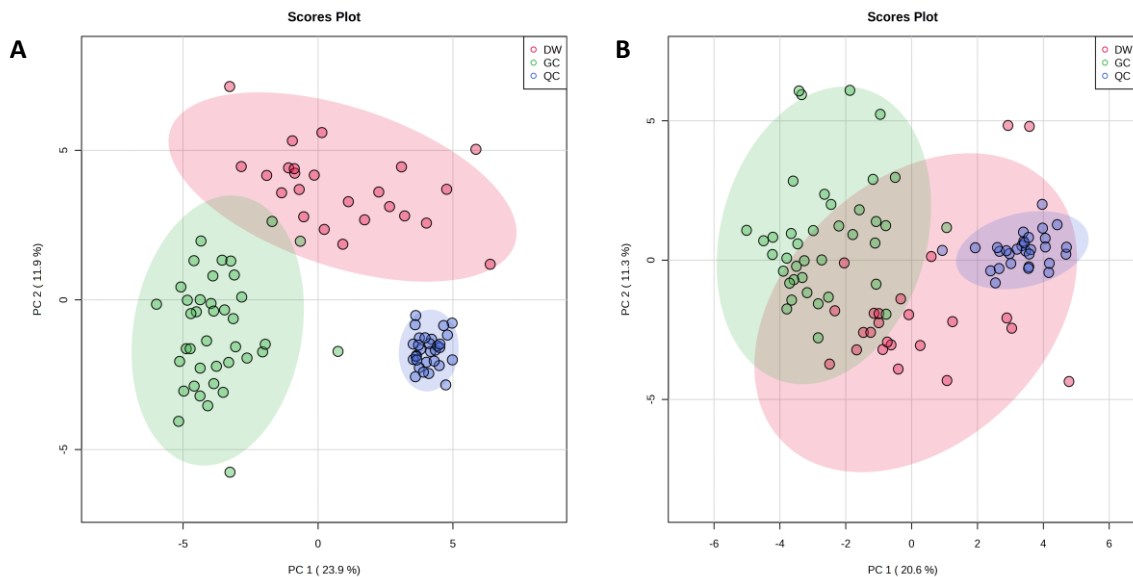


FIGURA 4.3- Gráficos 2D de *scores plots* da análise de componentes principais (PCA) dos dados de metabolômica global por LC-HRMS com predição de QCs. **(A)** Análise no modo RPLC ESI(+), **(B)** Análise no modo RPLC ESI(-). **Verde:** grupo controle (GC), **Vermelho:** grupo estudo (DW) e **Azul:** controles de qualidade (QC). *Software: MetaboAnalyst.*

A análise multivariada PCA não supervisionada (Figura 4.4), sem a predição das amostras QCs, também foi avaliada e o padrão de agrupamento indicou uma tendência de separação entre os grupos DW e GC.

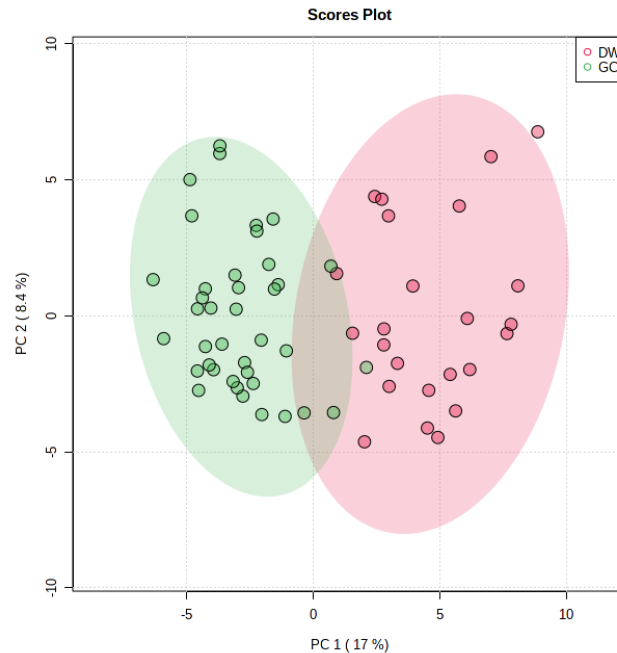


FIGURA 4.4- Gráfico 2D de *score plot* da análise de componentes principais (PCA) dos dados de metabolômica global por LC-HRMS, em ambos os modos de ionização RPLC ESI(+) e RPLC ESI(-). **Verde:** grupo controle (GC) e **Vermelho:** grupo estudo (DW). *Software: MetaboAnalyst.*

Após a combinação dos dados de aquisição por LC-HRMS [ESI(+) e ESI(-)] foi realizada uma análise discriminante com o modelo do método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para construir um modelo de classificação. Diferente do PCA, o PLS-DA é um método supervisionado onde atribui-se rotulação ao conjunto de dados. A Figura 4.5A mostra uma separação efetiva entre os grupos DW e GC, indicando o pertencimento de classe de cada amostra. Adicionalmente, a validação cruzada (*cross-validation*) do modelo foi utilizada para avaliar a capacidade preditiva do modelo com obtenção dos valores de precisão, ou ajuste do modelo (R^2), e da estimativa da capacidade preditiva (Q^2) (Figura 4.5B). Durante a validação cruzada, os dados previstos são comparados aos dados originais. Os valores de R^2 e Q^2 dependem do tipo de amostra analisada, para amostras biológicas, como é o caso, são aceitáveis valores de $R^2 > 0,7$ e $Q^2 > 0,4$

(LUNDSTEDT et al., 1998) e um bom valor da relação R^2/Q^2 dever ser > 0.7 . Na análise em questão, o coeficiente de predição (Q^2) foi de 0,78 e o ajuste do modelo R^2 foi de 0,83. (Figura 4.5B)

Realizou-se também um teste de permutação usando 1000 permutações aleatórias para avaliar a significância estatística de Q^2 , ou seja, a classificação específica dos indivíduos nos grupos DW e GC deve ser melhor que qualquer outra classificação aleatória em dois grupos arbitrários. No estudo em questão (Figura 4.5C), obteve-se um valor de $p=0,047$, sendo esse considerado estatisticamente significativo, indicando que o contraste entre os grupos é significativo e que o modelo tem poder preditivo (LUNDSTEDT et al., 1998).

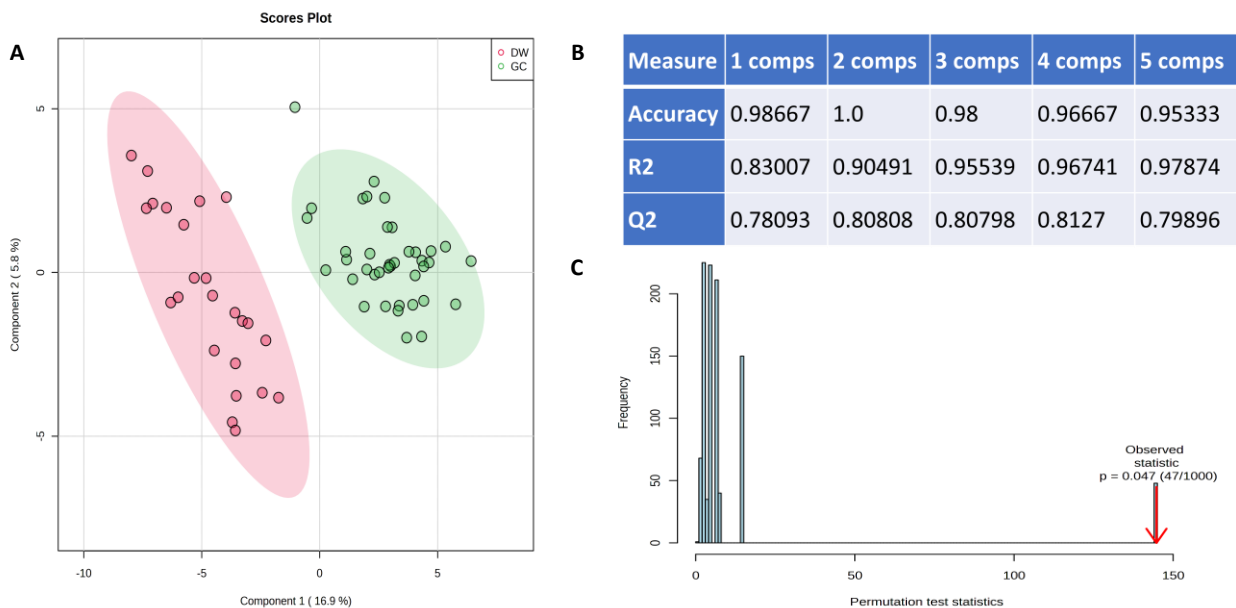


FIGURA 4.5- Análise Multivariada por PLS-DA e teste de permutação. **(A)** Gráfico 2D de *score plot* do modelo PLS-DA dos dados de metabolômica global por LC-HRMS, em ambos os modos de ionização, RPLC ESI(+) e RPLC ESI(-). Amostras do GC (verde) e DW (vermelho); **(B)** Resultados da validação cruzada, com plotagem de acurácia, R^2 e Q^2 . **(C)** Teste de permutação, com 1000 permutações aleatórias. *Software: MetaboAnalyst.*

A partir da validação do modelo PLS-DA foi possível obter os *features* moleculares responsáveis pela separação e discriminação dos grupos DW e GC. Nesse caso, a Projeção das Variáveis Importantes (VIPs) classificou 39 *features* que apresentaram valores da VIP score $\geq 1,0$ (Figura 4.6). Associado aos valores de *VIP scores*, a matriz de dados foi submetida a análise univariada para obtenção do maior número de informações que classifiquem os dados como estatisticamente significativos.

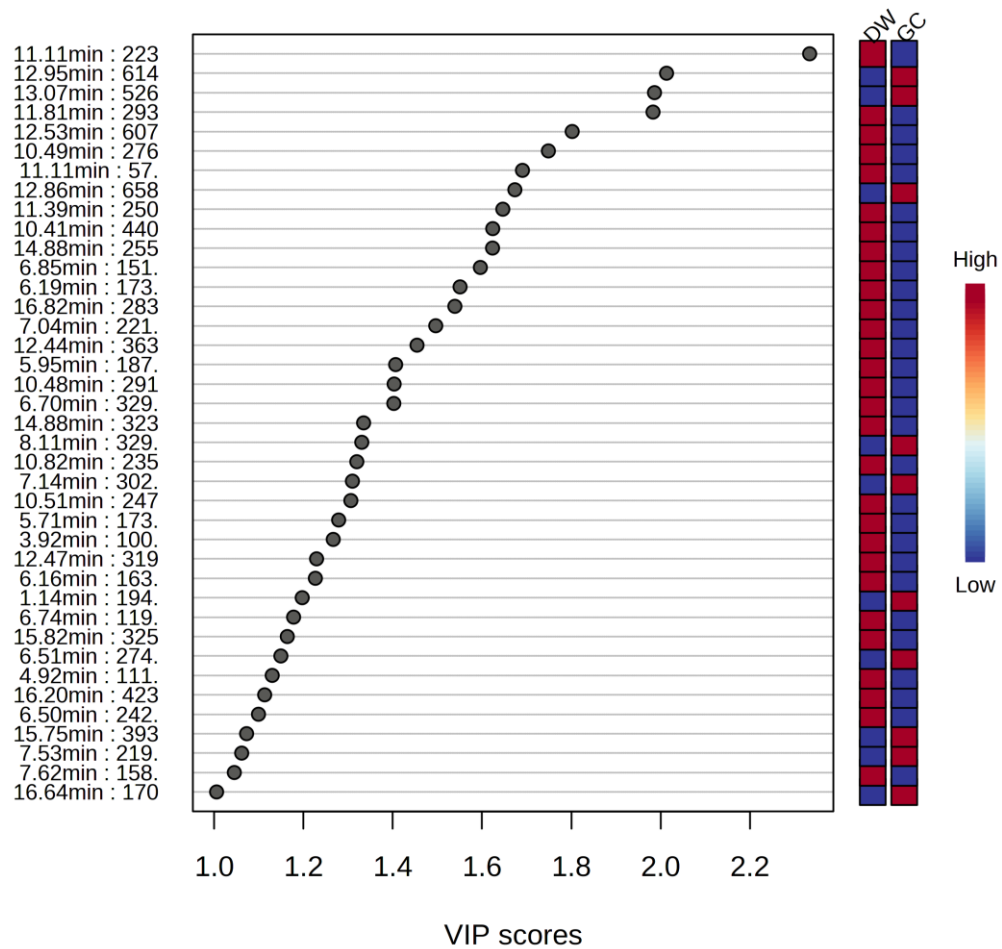


FIGURA 4.6- *Features* moleculares selecionados através do modelo PLS-DA, com $VIP \geq 1,0$. Software: *MetaboAnalyst*.

4.5. Análise Univariada

O modelo multivariado apresenta diversas vantagens na análise de amostras biológicas, ajudando a interpretar relações complexas, lineares ou não lineares. Porém, ele também apresenta alguns riscos como *overfitting* (inclusão de mais variáveis do que possa ser necessário) e a falta de poder para estimar covariáveis (variáveis contínuas que influenciam no desfecho da análise). Os testes univariados são usualmente estatisticamente mais poderosos que os testes multivariados, proporcionando uma maior probabilidade de detectar efeitos significativos, quando esses realmente existirem (AGRANONIK E MACHADO, 2011; AMARAL et al., 2022).

Antes de iniciar a análise estatística univariada, as distribuições dos dados foram verificadas usando o teste de Shapiro-Wilk. Variáveis com distribuição não normal foram transformadas por Box-Cox (Figura 4.7) para análises subsequentes. Um teste de *t-Student* para amostras independentes e um teste Qui-quadrado de Pearson (Q-Q) foram usados para comparar as características físicas (idade e sexo) dos participantes entre as amostras do GC e DW (CASTRO et al., 2022).

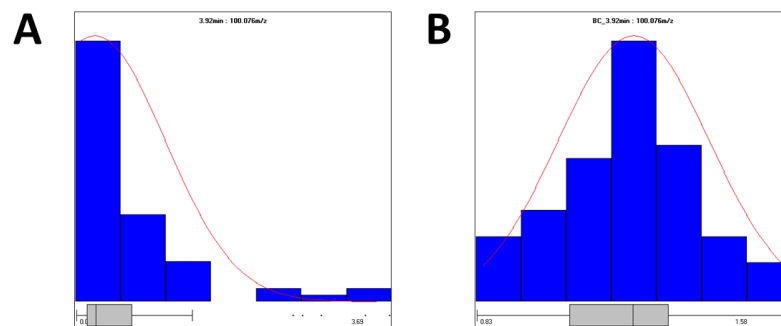


FIGURA 4.7- Exemplo do resultado de transformação de dados por Box-Cox pelo software Develve. (A) Distribuição do dado antes da transformação; (B) Distribuição do dado após transformação.

Após a normalização dos dados, o teste de *t-Student* entre os grupos DW e GC apresentou valor de significância (α) $< 0,05$, indicando que a idade dos indivíduos pertencentes aos grupos em estudo é uma covariável e que essa deve ser considerada no modelo estatístico. Dessa forma, foi aplicado o teste estatístico paramétrico ANCOVA, a qual combina as técnicas de análise de variância (ANOVA) e regressão linear simples com a incorporação de uma variável quantitativa (covariável) junto com a variável nominal em um único modelo. No teste ANCOVA, os valores de *p*-valor foram ajustados com uma Taxa de Falsa Descoberta (FDR) para minimizar erros tipo I (DUFT et al., 2020).

Por conseguinte, 39 *features* foram considerados estatisticamente significativos por apresentarem $VIP \geq 1,0$, $p \leq 0,05$ e com *p*-valores corrigido-FDR menores do que 5% (0,05) e seguiram para a etapa de anotação putativa. A Tabela 4.2 ilustra os resultados.

TABELA 4.2- Resultados da Análise Univariada para a Classificação de *Features* Moleculares Significativos. (*continuação*)

<i>Features</i>	T_R (<i>min</i>)	<i>m/z</i>	Modo de Ionização	<i>p</i> -value	FDR 5%	Conclusão
1	11.11	223.096	Positivo	$<0,001$	0.001	SIG
2	12.95	614.483	Positivo	$<0,001$	0.003	SIG
3	6.16	163.133	Positivo	$<0,001$	0.004	SIG
4	11.81	293.174	Positivo	$<0,001$	0.005	SIG
5	13.07	526.431	Positivo	$<0,001$	0.006	SIG
6	12.53	607.324	Positivo	$<0,001$	0.008	SIG
7	10.49	276.197	Negativo	$<0,001$	0.009	SIG
8	5.95	187.098	Negativo	$<0,001$	0.010	SIG
9	12.86	658.509	Positivo	$<0,001$	0.012	SIG
10	11.39	250.145	Negativo	$<0,001$	0.013	SIG
11	14.88	255.233	Negativo	$<0,001$	0.014	SIG
12	11.11	57.070	Positivo	$<0,001$	0.015	SIG

TABELA 4.2- Resultados da Análise Univariada para a Classificação de *Features* Significativos.

<i>Features</i>	T_R (min)	m/z	Modo de Ionização	p -value	FDR 5%	Conclusão
13	10.41	440.358	Positivo	<0,001	0.017	SIG
14	6.85	151.075	Positivo	<0,001	0.018	SIG
15	6.19	173.118	Negativo	<0,001	0.019	SIG
16	16.82	283.264	Negativo	<0,001	0.021	SIG
17	4.92	111.044	Positivo	<0,001	0.022	SIG
18	6.70	329.233	Negativo	<0,001	0.023	SIG
19	7.14	302.305	Positivo	<0,001	0.024	SIG
20	8.11	329.005	Positivo	<0,001	0.026	SIG
21	7.04	221.118	Negativo	<0,001	0.027	SIG
22	14.88	323.220	Negativo	<0,001	0.028	SIG
23	10.82	235.170	Negativo	<0,001	0.029	SIG
24	5.71	173.082	Negativo	<0,001	0.031	SIG
25	3.92	100.076	Positivo	<0,001	0.032	SIG
26	12.44	363.310	Positivo	0.000	0.033	SIG
27	12.47	319.284	Positivo	0.000	0.035	SIG
28	16.20	423.326	Negativo	0.000	0.036	SIG
29	6.50	242.176	Negativo	0.000	0.037	SIG
30	6.51	274.274	Positivo	0.000	0.038	SIG
31	1.14	194.117	Positivo	0.001	0.040	SIG
32	15.75	393.277	Negativo	0.001	0.041	SIG
33	10.48	291.253	Positivo	0.001	0.042	SIG
34	16.64	1706.034	Positivo	0.001	0.044	SIG
35	7.53	219.047	Positivo	0.001	0.045	SIG
36	10.51	247.226	Positivo	0.001	0.046	SIG
37	15.82	325.184	Negativo	0.001	0.047	SIG
38	6.74	119.086	Positivo	0.002	0.049	SIG
39	7.62	158.154	Positivo	0.007	0.050	SIG

T_R : tempo retenção; min: minutos; razão massa/carga (m/z); FDR: taxa de falsa descoberta; SIG: significativo.

4.6. Metabólitos Anotados Putativamente

A anotação putativa dos *features* moleculares estatisticamente significativos foi feita através da busca do valor m/z com erro de exatidão de massa

≤ 10 ppm, comparação dos espectros de fragmentação (MS/MS) e perfil isotópico de cada íon em bancos de dados disponíveis online como *Human Metabolome Database* - HMDB (<http://www.hmdb.ca/>), *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e a plataforma *CEU Mass Mediator*. A busca resulta muitas vezes em diversas possibilidades para o mesmo *feature* molecular, por isso é feita uma filtragem manual onde são descartados metabólitos que são biologicamente improváveis, como fármacos e metabólitos de origem vegetal, por exemplo. Também é considerado o tempo de retenção, onde um metabólito não eluirá em tempos de retenção distintos na mesma análise cromatográfica, além da proposta de estrutura química apresentada nos sites de busca.

Um total de 15 metabólitos foram putativamente anotados, sendo esses descritos na Tabela 4.3.

A análise no modo de eluição RPLC, como era de se esperar, privilegiou compostos com característica de baixa e média polaridade. Podemos observar algumas classes de lipídios identificados como ésteres de colesterol, ceramidas e ácidos graxos derivados. Além dos lipídios, também foi possível identificar compostos polares que eluíram com baixos tempos de retenção, como a betaína e o N-metil-salsolinol. Os cromatogramas de íons extraídos e os espectros de massas dos metabólitos identificados são apresentados no Apêndice 1.

As concentrações relativas dos metabólitos identificados foram padronizadas em *z-score* (média = 0 e múltiplos de um desvio padrão) e também demonstrados em gráficos de *boxplot* (Figura 4.8) para uma melhor visualização dos níveis alterados entre os grupos controle (GC) e estudo (DW).

TABELA 4.3- Metabólitos anotados putativamente. Sendo, t_R (min): tempo de retenção; $VIP \geq 1,0$, p -valores $\leq 0,05$ e Taxa de Falsa Descoberta (FDR) $\leq 0,05$. (continuação)

Metabólito	Código HMDB	Classe	t_R (min)	m/z exp	Aduto	Fórmula	Erro ppm	Fragmentos	P -valor	FDR	VIP
<i>N</i> -metil-salsolinol	HMDB0003626	Neurotoxina endógena	1.14	194.117	M+H ⁺	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	1	135.0446; 194.1174	0.001	0.040	1.197
Betaína	HMDB0000043	Amina quaternária	3.92	100.076	(M+H-H ₂ O) ⁺	C ₅ H ₁₂ NO ₂	0	118.0851; 100.0756	<0,001	0.032	1.267
Pirocatecol	HMDB0000957	Ácido orgânico	4.92	111.044	(M+H) ⁺	C ₆ H ₆ O ₂	1	55.0544; 111.0440	<0,001	0.022	1.130
Ácido subérico	HMDB0000893	Ácido graxo	5.71	173.082	(M-H) ⁻	C ₈ H ₁₄ O ₄	2	111.0813; 109.0662	<0,001	0.031	1.279
Nonato	HMDB0011717	Ácido graxo	5.95	187.098	(M-H) ⁻	C ₉ H ₁₆ O ₄	0	125.0963; 169.0858; 187.0977	<0,001	0.010	1.407
<i>N</i> -Undecanoilglicina	HMDB0013286	Ácido graxo	6.5	242.176	(M-H) ⁻	C ₁₃ H ₂₅ NO ₃	1	242.1762; 224.1679	<0,001	0.037	1.099
9,10,13-TriHOME	HMDB0004710	Ácido graxo	6.7	329.233	(M-H) ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	3	329.2332; 311.2240; 157.1227	<0,001	0.023	1.402
Ácido 2-fenilpropanoico	HMDB0011743	Ácido orgânico	6.85	151.075	(M+H) ⁺	C ₉ H ₁₀ O ₂	2	107.0856; 105.0704; 103.0548; 133.0653	<0,001	0.018	1.596
Esfinganina	HMDB0000269	Esfingolípido	7.14	302.305	(M+H) ⁺	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	0	302.3056; 284.2942	<0,001	0.024	1.310
Sedoheptulose-7-fosfato	HMDB0001068	Carboidrato	8.11	329.005	(M+K) ⁺	C ₇ H ₁₅ O ₁₀ P	3	98.9837; 45.0338	<0,001	0.026	1.331
Isotricodermina	HMDB0034738	Lípido	11.81	293.174	(M+H) ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₄	1	111.0447; 57.0699	<0,001	0.005	1.983

TABELA 4.3- Metabólitos anotados putativamente. Sendo, t_R (min): tempo de retenção; $VIP \geq 1,0$, p -valores $\leq 0,05$; Taxa de Falsa Descoberta (FDR) $\leq 0,05$.

Metabólito	Código HMDB	Classe	t_R (min)	m/z exp	Aduto	Fórmula	Erro ppm	Fragmentos	P -valor	FDR	VIP
CE(PGF1alpha)	HMDB0290249	Éster de colesterol	12.44	363.310	(M+2H) ²⁺	C ₄₇ H ₈₀ O ₅	6	57.0704; 67.0546; 71.0848	<0,001	0.033	1.454
Cer(d18:2/20:4)	HMDB0290065	Esfingolipídio	12.95	614.483	(M+H- H ₂ O) ⁺	C ₃₈ H ₆₅ NO ₆	7	57.0703; 71.0859; 83.0859; 614.4811	<0,001	0.003	2.013
Ácido palmítico	HMDB0000220	Ácido graxo	14.88	255.233	(M-H) ⁻	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1	256.2351; 255.2333	<0,001	0.014	1.624
Ácido esteárico	HMDB0000827	Ácido graxo	16.82	283.264	(M-H) ⁻	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	0	283.2602; 235.2429; 197.2244	<0,001	0.021	1.539

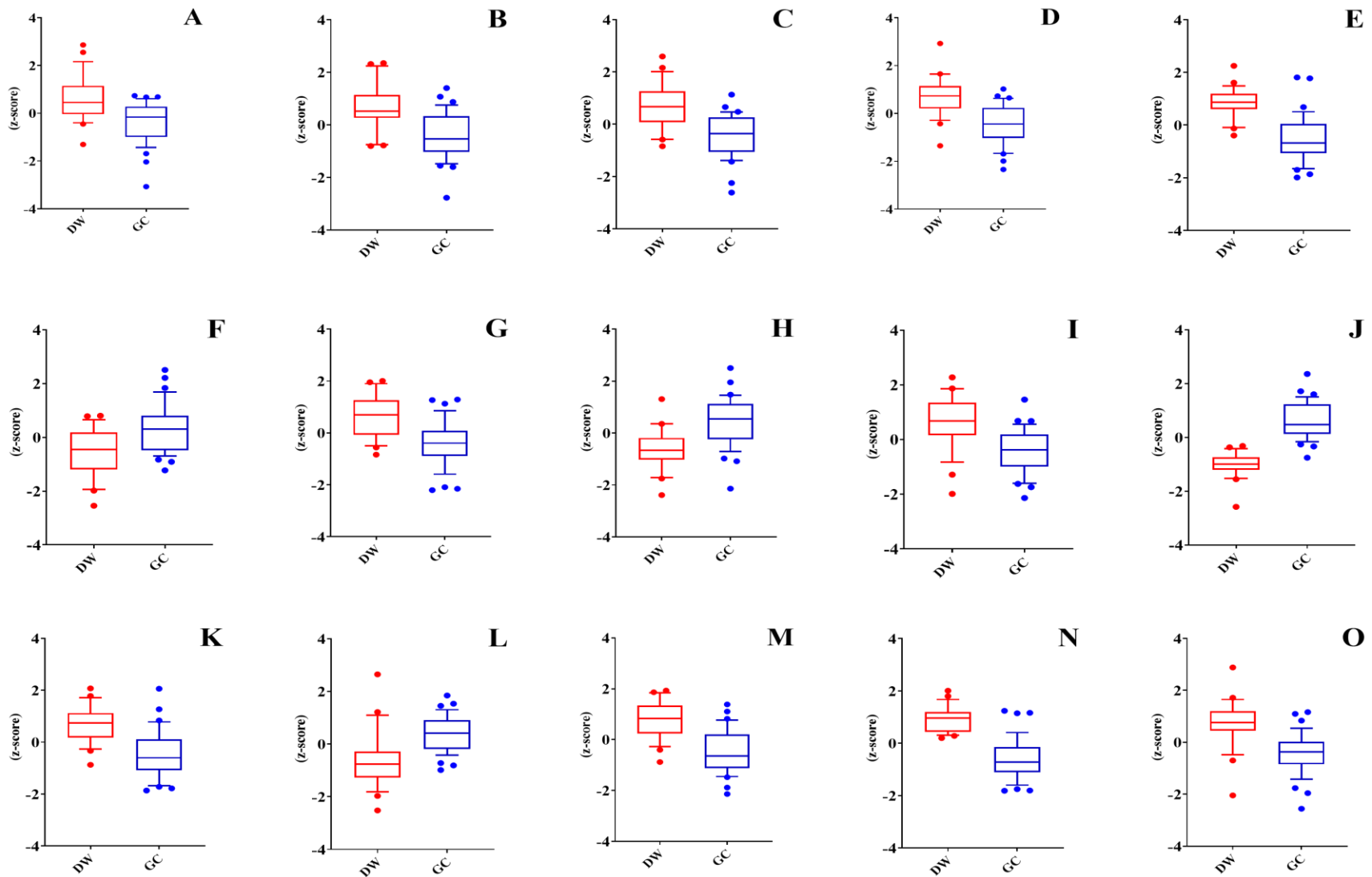


FIGURA 4.8- Boxplots (*box-and-whisker*) para os metabólitos anotados putativamente em amostras de saliva de pacientes com DW vs. grupo GC. O eixo y representa as intensidades normalizadas em *z-score* (média \pm desvio padrão). O boxplot representa a faixa interquartil (IQR), abrangendo a maioria dos dados, enquanto as extremidades (*whiskers*) se estendem aos valores extremos. A significância estatística foi avaliada usando o teste de *t-Student*, com

um limiar de $p \leq 0,05$. **Vermelho:** grupo DW e **Azul:** grupo controle. **A)** N-undecanoilglicina; **B)** ácido subérico; **C)** 9,10,13-TriHOME; **D)** ácido esteárico; **E)** nonato; **F)** N-metil-salsolinol; **G)** betaína; **H)** sedoheptulose 7-fosfato; **I)** CE(PGF1alpha); **J)** Cer(d18:2/20:4); **K)** pirocatecol; **L)** esfinganina; **M)** ácido 2-fenilpropanoico; **N)** isotricodermina; **O)** ácido palmítico.

Para aumentar o poder de visualização dos dados em termos das concentrações relativas dos metabólitos em cada grupo, é apresentado um mapa de calor (*HeatMap*) na Figura 4.9. Dentre os 15 metabólitos putativamente anotados, *N*-metil-salsolinol, esfinganina, Sedoheptulose-7-fosfato e Cer(d18:2/20:4) apresentam regulação positiva no grupo controle, enquanto os demais 11 metabólitos apresentam uma regulação positiva no grupo DW.

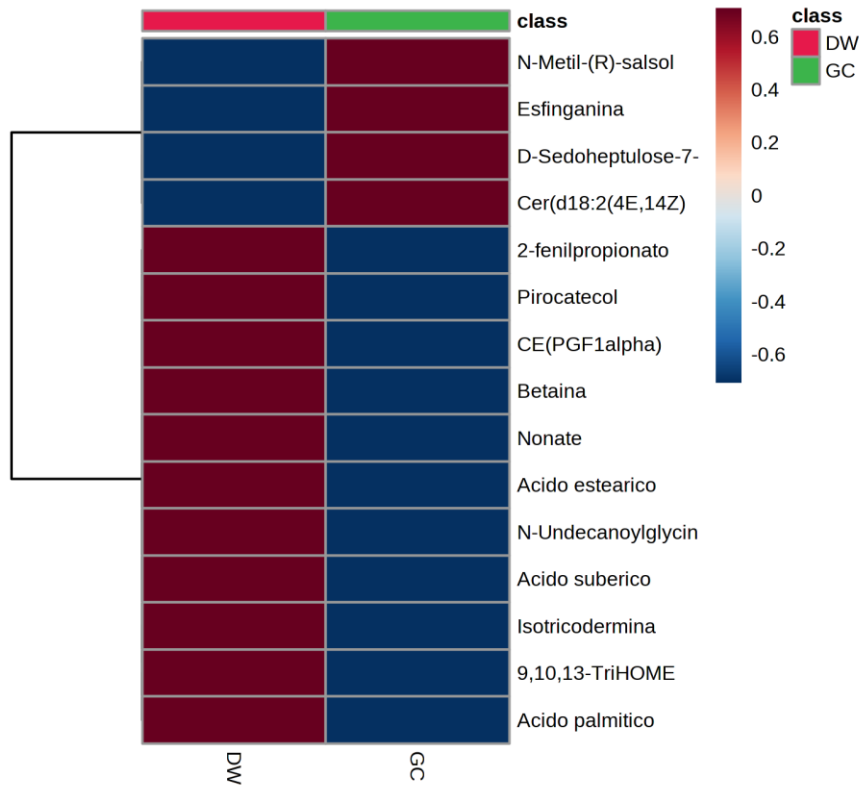


FIGURA 4.9- Análise de agrupamento hierárquico dos metabólitos putativamente anotados, $p \leq 0,01$, representada como *HeatMap*.

A análise metabolômica global revelou em sua maioria metabólitos pertencentes a classe dos lipídios. Os dez lipídios significativamente anotados pertencem majoritariamente a categorias dos ácidos graxos, seguido de esfingolipídio, ceramida e éster de colesterol. Estudos anteriores realizados com camundongos geneticamente modificados para ATP7B (modelos de estudos da

DW) demonstram que há uma desregulação no metabolismo dos lipídios, sendo o processo metabólico mais significativamente alterado e que pouco se sabe sobre essa desregulação em pacientes com a DW (HUSTER et al., 2007, LUTSENKO, 2014; WOOTON-KEE et al., 2020).

Dentre os metabólitos anotados putativamente, sedoheptulose-7-fosfato, ácido palmítico, *N*-undecanoilglicina, ácido subérico e pirocatecol, já foram reportados como sendo associados com as doenças de Alzheimer (TSURUOKA et al., 2013), esquizofrenia (XUAN et al., 2011; YANG et al., 2013), doença de Parkinson (HÉNYKOVÁ et al., 2022; NAOI et al., 2002), câncer (BROWN et al., 2016; WANG et al., 2019) e doença renal (GRONWALD et al., 2011), respectivamente.

Os metabólitos *N*-metil-salsolinol, esfinganina e betaína, foram reportados anteriormente como possíveis candidatos a biomarcadores da doença de Parkinson e da doença de Wilson. O metabólito *N*-metil-salsolinol é uma neurotoxina endógena no cérebro e um dos principais agentes causadores da morte de neurônios dopaminérgicos. Há evidências de que este tipo de produção endógena de toxinas pode estar relacionado ao desenvolvimento de uma série de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, Parkinson e a doença de Huntington (IBÁÑEZ et al., 2013).

O *N*-metil-(*R*)-salsolinol interage enantiosseletivamente no cérebro de humanos e se acumula na via dopaminérgica nigroestriatal (NAOI et al., 2002). Em estudos envolvendo pacientes com a doença de Parkinson (DP), o nível de *N*-metil-(*R*)-salsolinol aumentou significativamente no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com DP, quando comparados ao grupo controle, o que sugere seu envolvimento na patogênese da doença e candidato promissor a biomarcador (HÉNYKOVÁ et al., 2022; NAOI et al., 2002). Como a DP pode ser muitas vezes clinicamente confundida com a doença de Wilson, o *N*-metil-salsolinol pode

apresentar um papel interessante em estudos futuros para distinguir pacientes com doença de Wilson em relação a pacientes com a doença de Parkinson.

Em estudo conduzido por QIU et al. (2023) foram realizadas análises metabolômicas por LC-HRMS utilizando plasma de pacientes com DW, subdivididos em dois grupos de pacientes, os com sintomas hepáticos (H-DW) e os pacientes com sintomas neurológicos (N-DW) e, ainda, comparando o perfil metabolômico desses pacientes com os perfis metabolômicos de pacientes com cirrose hepática e pacientes com DP (doenças com sintomas semelhantes à DW). Essa comparação resultou em um segundo estudo, onde três metabólitos foram anotados com potencial para serem considerados candidatos a biomarcadores para a DW. Um dos metabólitos considerado significativo e candidato a biomarcador é a esfinganina, com concentrações relativas inferiores em pacientes N-DW quando comparada a pacientes com DP.

A esfinganina é composta por um grupo amina no carbono 2, dois grupos hidroxilas nos carbonos 1 e 3 e uma cadeia carbônica composta por 18 átomos (Figura 4.10B), sendo a molécula base e precursora de todos os esfingolipídios, da classe dos lipídios. A esfinganina existe em todas as espécies vivas, desde bactérias até humanos. Nos humanos, a esfinganina participa de diversos processos biológicos, em particular, da biossíntese dos esfingolipídios (OLIVEIRA et al., 2015).

No presente trabalho, a esfinganina foi identificada como metabólito significativo e também apresentou uma regulação negativa em pacientes com DW quando comparada ao grupo controle, como observado na Figura 4.10A.

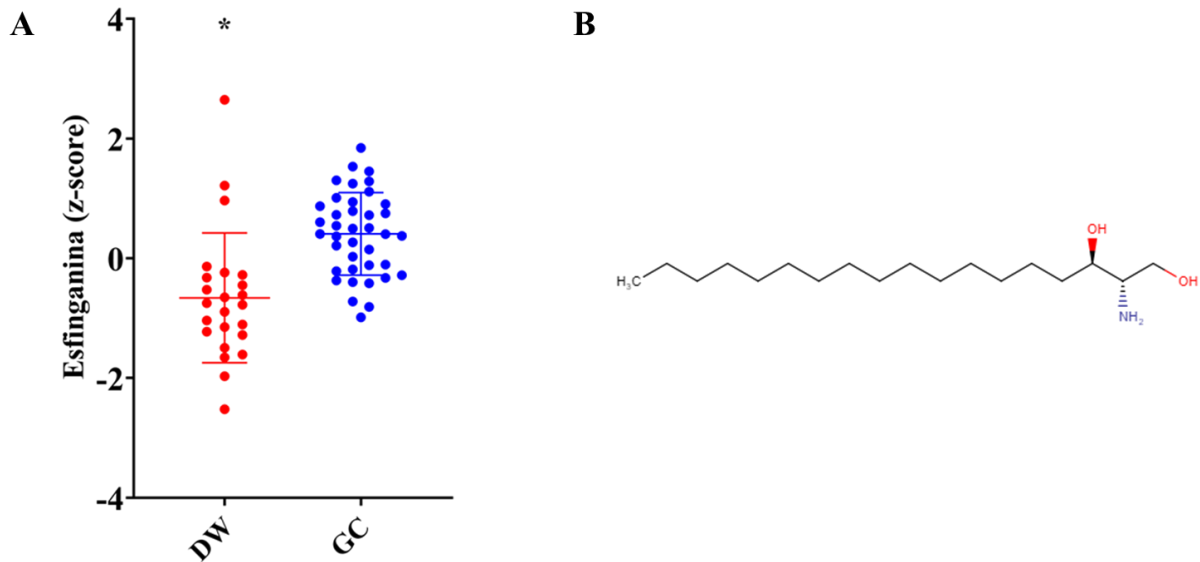


FIGURA 4.10- Análise de esfingana em amostras de saliva por metabolômica global via LC-HRMS. **(A)** Variabilidade da concentração relativa do metabólito esfingana no grupo DW vs. GC. O eixo y representa as intensidades normalizadas em *z-score* (média \pm desvio padrão); $p \leq 0,05$. **(B)** Estrutura química da esfingana.

Já no estudo apresentado por MAZI et al. (2019), o objetivo foi avaliar o perfil metabolômico através de LC-HRMS no soro de indivíduos com DW categorizados com sintomas hepáticos (H-DW), neurológicos (N-DW) e pré-clínicos (P-DW), comparados a indivíduos saudáveis (HC). Nenhum dos pacientes com DW recebeu medicação, pois as amostras foram coletadas no momento do diagnóstico. Na comparação entre os indivíduos P-DW, N-DW e H-DW versus HC, o metabólito significativamente mais alterado foi a colina. Porém, na comparação entre H-DW e HC, o metabólito significativamente alterado foi a betaína, forma oxidada da colina. Segundo os autores, os níveis elevados de betaína podem ser explicados pelo aumento da disponibilidade de colina. Para validar as descobertas, os autores verificaram a expressão de genes relacionados ao metabolismo de colina e metionina no modelo de camundongos *toxic milk Jackson*

(tx-j) do Laboratório Jackson (Maine, EUA). Os camundongos tx-j apresentam uma desregulação nos níveis de transcrição hepática de Bhmt (betaína-homocisteína-metiltransferase), reduzindo assim a entrada de betaína para a regeneração de metionina, com conseqüente acúmulo de betaína (MAZI et al. 2019).

No presente estudo, uma regulação positiva de betaína também foi observada em indivíduos com a DW em relação ao grupo controle (Figura 4.11), o que pode contribuir para estudos posteriores da investigação da betaína como um potencial candidato a biomarcador da DW.

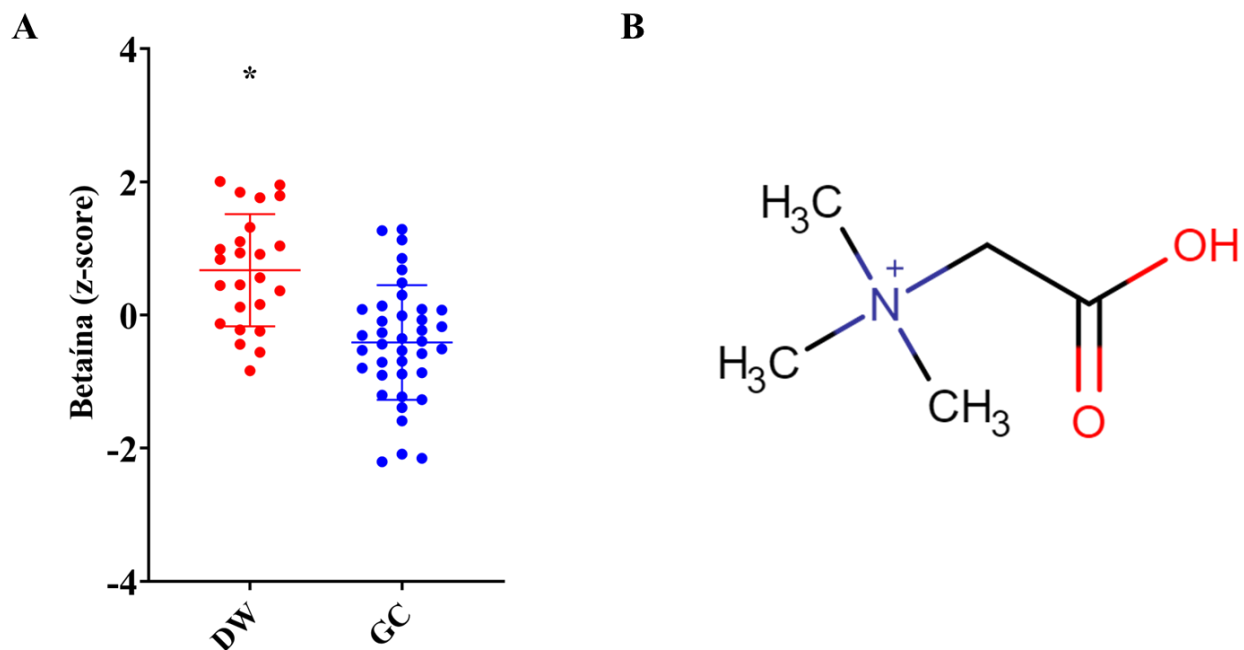


FIGURA 4.11- Análise de betaína em amostras de saliva por metabolômica global via LC-HRMS. **(A)** Variabilidade da concentração relativa do metabólito betaína no grupo DW vs. GC. O eixo y representa as intensidades normalizadas em *z-score* (média \pm desvio padrão); $p \leq 0,05$. **(B)** Estrutura química da betaína.

4.7. Curva ROC (Característica de Operação do Receptor)

As curvas ROCs multivariadas foram construídas usando o software MetaboAnalyst 5.0, empregando os dados dos 15 metabólitos putativamente anotados, sendo a curva ROC amplamente considerada como o método mais objetivo para descrever e avaliar o desempenho de um biomarcador (XIA et al., 2013).

O método de classificação e pontuação usado para criar a ROC foram os dados obtidos da análise estatística do PLS-DA. Foram criados 6 modelos correspondes a uma curva com diferentes números de metabólitos (2, 3, 5, 7, 10 e 15), como ilustrado na Figura 4.12.

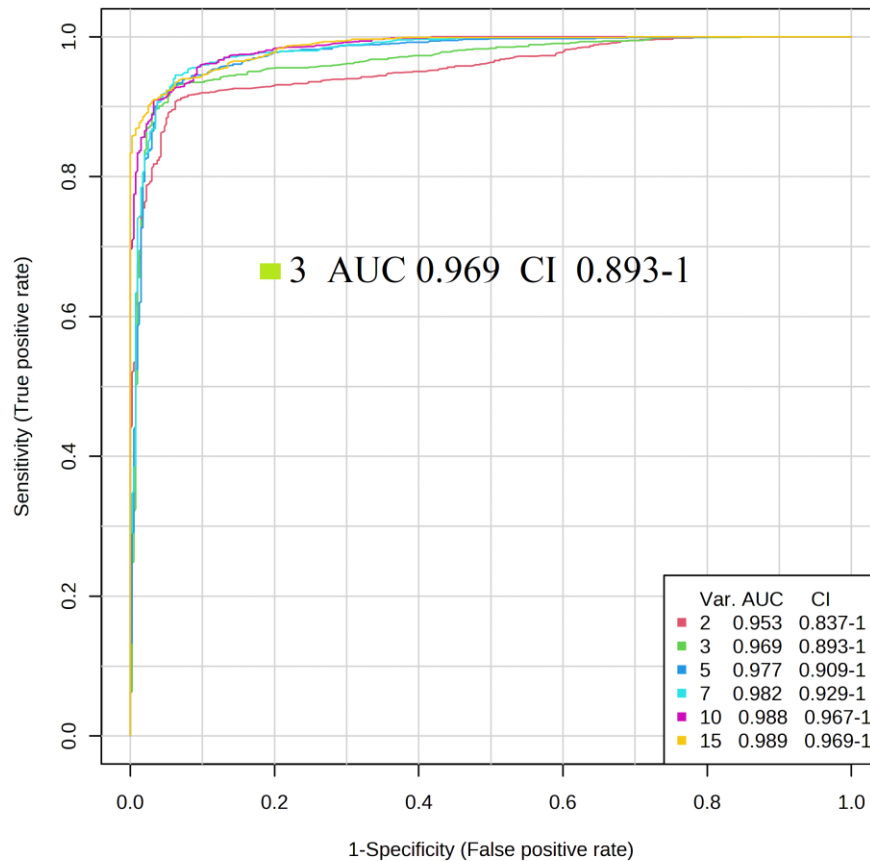


FIGURA 4.12- Curvas ROC pelo método estatístico multivariado PLS-DA no ponto de corte ideal definido pela distância mínima para o canto superior esquerdo. Modelo otimizado gerou uma AUC de 0,969 (IC 95%: 0,893 - 1).

Software: MetaboAnalyst.

As curvas ROCs obtidas apresentaram uma *Area Under The Curve* (AUC) entre 0,95 e 0,98, o que classifica o modelo como excelente, usando um intervalo de confiança de 95%. O eixo classificado como sensibilidade (*sensitivity*) mostra as taxas verdadeiro-positivo, enquanto o eixo especificidade (*specificity*) mostra as taxas de falso-positivo. Sendo assim, quanto maior a AUC entre 0-1, melhor a predição do modelo. Pode-se verificar que a AUC com a melhor classificação é a de coloração amarela com 15 metabólitos, porém o método com 3

metabólitos foi o escolhido para predição, uma vez que esse já apresentou uma AUC de 0,96 (XIA et al., 2013).

A curva ROC com 3 metabólitos apresenta AUC de 0,96, (Figura 4.13A), sendo essa uma medida satisfatória para discriminar os grupos DW e GC, como também pode ser observado na Figura 4.13B.

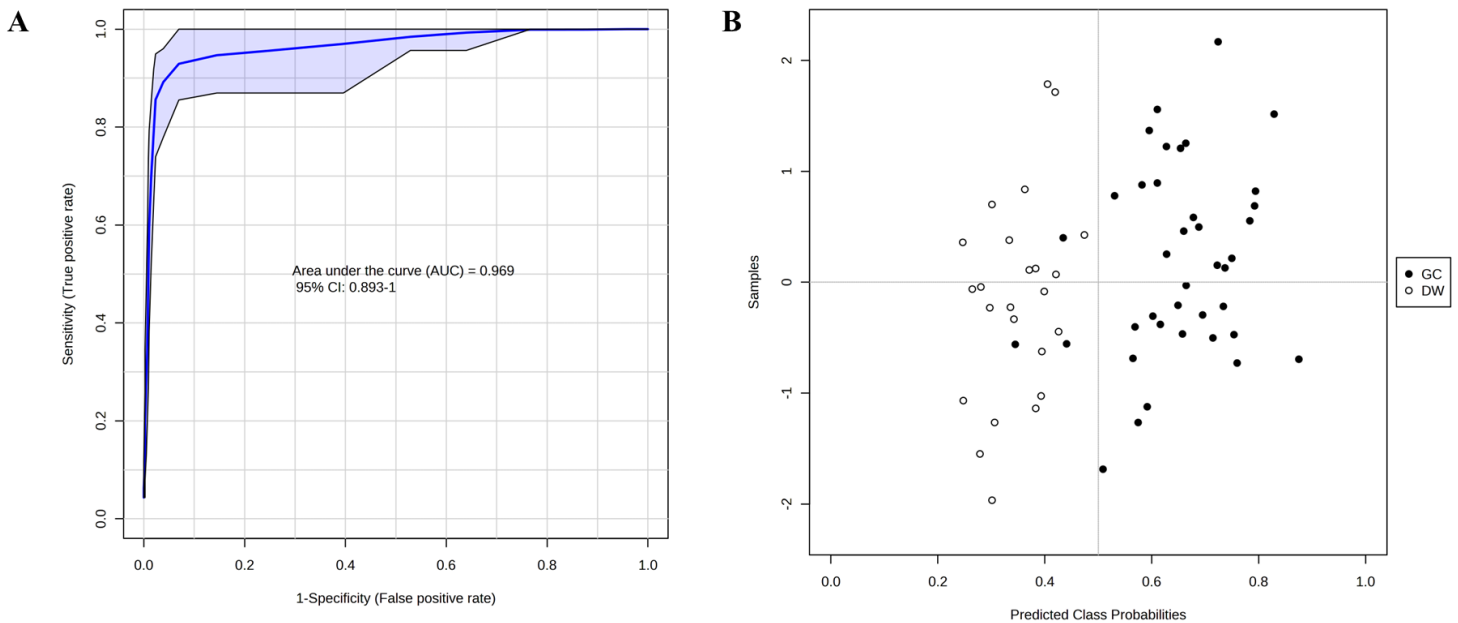


FIGURA 4.13- Modelos de Previsão. **(A)** Curva ROC PLS-DA com 3 metabólitos como modelo de previsão. **(B)** Matriz de previsão das classes. *Software: MetaboAnalyst.*

Nenhum dos modelos utilizados atingiu 100% da capacidade preditiva e de discriminação dos grupos, o que pode ser justificado pela complexidade das amostras biológicas e pelo número (n) reduzido de indivíduos participantes. No entanto, o metabólito mais significativo para discriminação dos grupos pela curva ROC foi a ceramida Cer(d18:2/20:4) (Figura 4.14), metabólito esse ainda não reportado em literatura com relação à DW, sendo esse dado de interesse para estudos posteriores de metabolômica alvo.

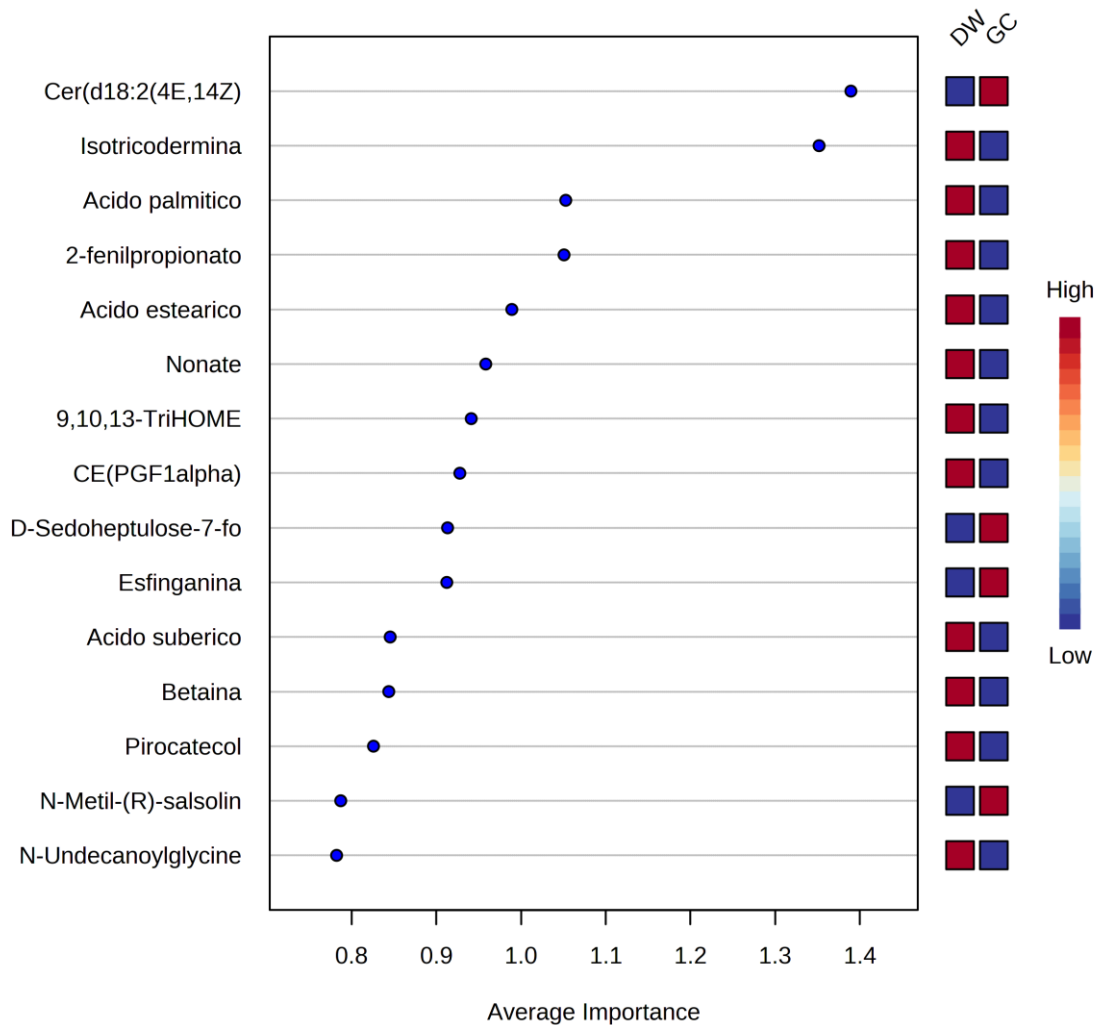


FIGURA 4.14: *HeatMap* dos metabólitos importantes para o modelo de predição da curva ROC.

Não foram encontrados estudos que reportem a ceramida Cer(d18:2/20:4) para qualquer outra doença, porém a desregulação de ceramidas é relatada em diversos distúrbios. As ceramidas são esfingolipídios biologicamente ativos produzidos por uma rede complexa de enzimas. Níveis elevados de ceramida no sangue estão associados a eventos cardiovasculares, como doenças cardíacas ateroscleróticas e valvares (ZIETZER et al., 2022). Ceramidas plasmáticas estão associadas a citocinas pró-inflamatórias em pacientes com

diabetes tipo 2, obesidade e também com doenças cardiovasculares (MELLO et al., 2009). Além disso, um estudo demonstrou a relação entre ceramida e depressão, onde a via da ceramida é considerada um alvo de interesse para antidepressivos (GULBINS et al., 2015). XING et al. (2016) investigaram a relação das ceramidas com os sintomas da doença de Alzheimer e constataram que os níveis de ceramidas estavam relacionados com os sintomas neuropsiquiátricos. De forma geral, níveis elevados de ceramidas tem sido associado com doenças neurodegenerativas, diabetes e doenças cardiovasculares (ZIETZER et al., 2022).

4.8. Alteração das vias Bioquímicas

Utilizando a ferramenta de impacto da via *Pathway Impact* do MetaboAnalyst, obteve-se os resultados de centralidade e enriquecimento das principais vias bioquímicas correspondentes com os metabólitos putativamente anotados. Para se considerar uma via metabólica relevante comumente são adotados valor de impacto $> 0,1$ e $-\log_{10}(p) > 1,0$. A pontuação do impacto da via representa uma estimativa objetiva da importância de uma determinada via em relação a uma rede metabólica global (LIU et al., 2019). O método de enriquecimento utilizado foi teste hipergeométrico, na análise topológica foi usada centralidade de intermediação relativa e a biblioteca de via metabólica selecionada foi *homo sapiens* do banco de dados SMPDB (*Small Molecule Pathway Database*).

A via alterada e de maior impacto está envolvida no metabolismo da betaína com valores de impacto de 0,13 e $-\log(p) = 0,98$. Outras vias com impactos menos expressivos, porém importantes para o nosso estudo, também são representadas na Figura 4.15.

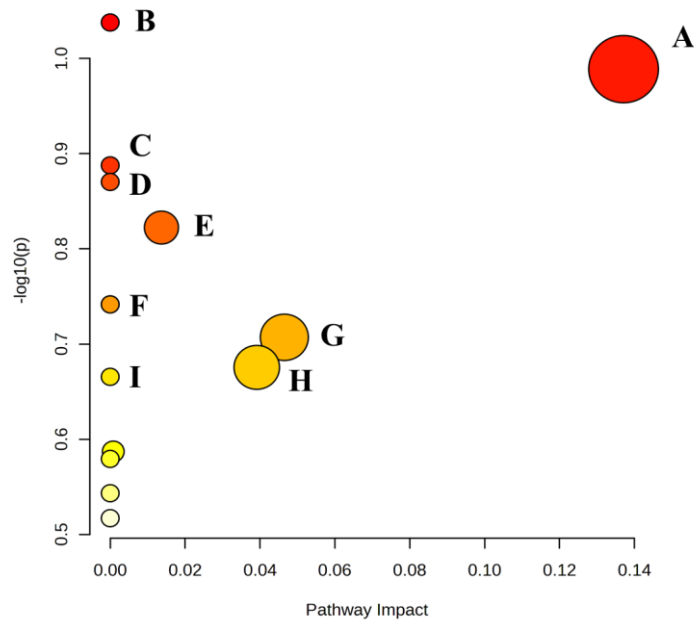


FIGURA 4.15- Impacto das vias metabólicas na análise das amostras de indivíduos com DW vs. GC. (A) Metabolismo da betaína; (B) Síntese de plasmalogênio; (C) Metabolismo dos glicerolipídios; (D) Beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos saturados de cadeia longa; (E) Via das pentoses fosfato; (F) Biossíntese de ácidos graxos; (G) Metabolismo dos esfingolipídios; (H) Metabolismo da metionina; (I) Metabolismo de ácidos graxos. *Software: MetaboAnalyst.*

Os resultados da análise de vias bioquímicas suportam os dados metabolômicos encontrados no presente trabalho e também se correlacionam com o que já foi descrito anteriormente na literatura para a DW. Para a rota metabólica da betaína e metionina, o metabólito participante putativamente anotado é a betaína. No metabolismo da metionina, a metionina é metabolizada no fígado para formar S-adenosilmetionina (SAM) via metionina adenosiltransferase (MAT). O MAT é codificado por dois genes, o MAT1A, presente em maior quantidade no fígado, que codifica as isoenzimas MATI/III, e o gene MAT2A, expresso em

menor grau no fígado e mais nos tecidos extra-hepáticos, que codifica o MATII (MAZI et al., 2019; MATO et al., 1997). Estudos anteriores relataram uma alteração nos níveis de metionina em modelos animais portadores da DW (DELGADO et al., 2008).

A SAM é o principal doador de metil para as reações de metilação do DNA e das histonas, enquanto a S-adenosil-homocisteína (SAH) inibe todas as reações de metilação dependentes de SAM. A S-adenosilomocisteinase (SAHH) é a enzima bidirecional que hidrolisa a SAH para gerar homocisteína. A metionina sintase (MS) remetila a homocisteína para formar metionina que, por sua vez, é convertida em SAM por meio das isoenzimas MATI/II/III. A homocisteína também pode ser remetilada em metionina por meio da reação catalisada pela betaína homocisteína metiltransferase (BHMT) que utiliza betaína (LE et al., 2014).

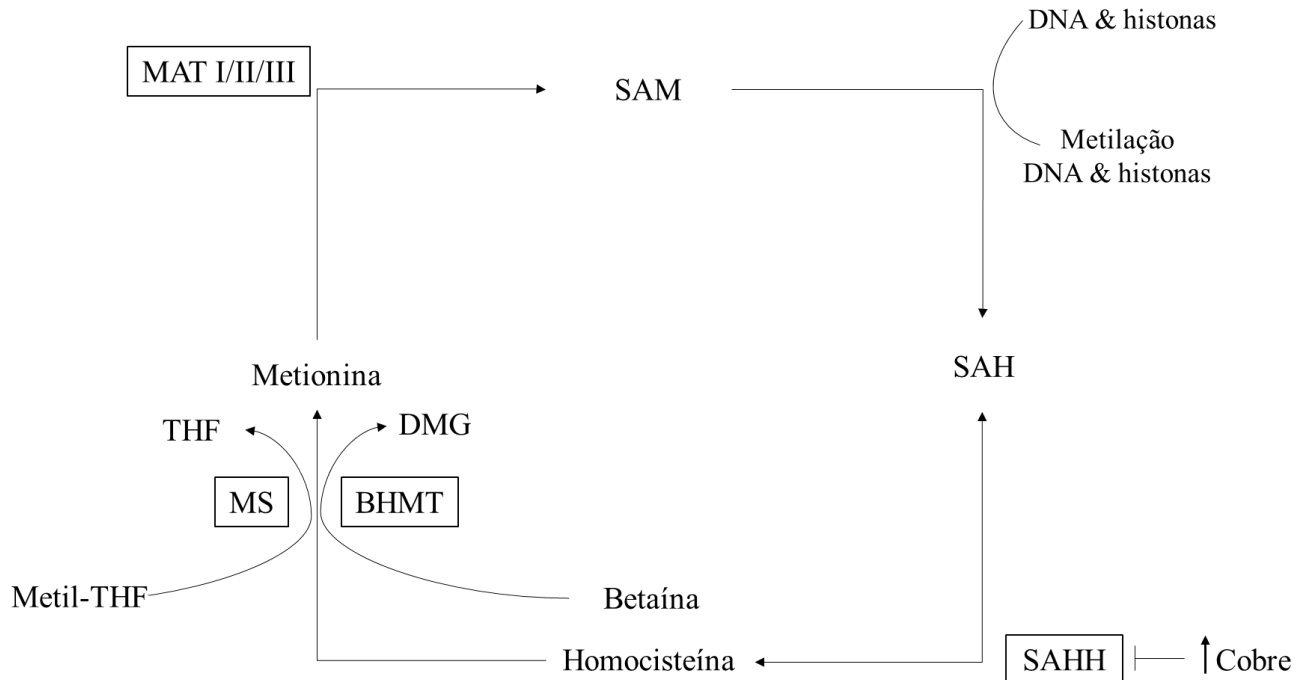


FIGURA 4.16- Metabolismo da metionina. S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosil-homocisteína (SAH), S-adenosilomocisteinase (SAHH), metionina sintase (MS), isoenzimas MATI/II/III, betaína homocisteína metiltransferase (BHMT), dimetilglicina (DMG) e tetraidrofolato (THF).

Adaptado de LE et al. (2014).

Estudo com modelos animais sugerem que a elevação dos níveis de Cu inibe a atividade e expressão da SAHH (BETHIN et al., 1995; LI et al., 2007). O estresse oxidativo gerado pelo acúmulo de Cu pode inibir a MAT I/III (DELGADO et al., 2008). Essa reação é essencial para a biossíntese do doador de metila SAM. Portanto, o acúmulo de Cu pode resultar em um ciclo de metionina desregulado e redução do potencial de metilação. O metabolismo da metionina está conectado ao ciclo da betaína, pois a betaína contribui para a regeneração da metionina a partir da homocisteína por meio da reação BHMT (MATO et al., 1997).

A síntese de plasmalogênio e beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos saturados de cadeia longa são as vias impactadas pelo metabólito ácido esteárico. A β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa é fundamental para o fornecimento de energia ao organismo e é de particular importância para o músculo cardíaco e esquelético. No entanto, vários outros tecidos, como o rim, o intestino delgado, o tecido adiposo branco e, principalmente, o fígado, podem utilizar os produtos da β -oxidação para a formação de corpos cetônicos que podem ser utilizados como energia por outros tecidos (BARTLETT e EATON, 2004). O fenótipo clínico dos distúrbios de oxidação de ácidos graxos geralmente inclui hipoglicemia hipocetótica desencadeada por jejum ou infecções, fraqueza muscular esquelética, cardiomiopatia, hepatopatia e manifestações neurológicas (ADEVA-ANDANY et al., 2019).

MAZI et al. (2019), também destaca a via da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos saturados de cadeia longa como uma via importante na DW, porém com um baixo fator de impacto, assim como foi encontrado no presente estudo.

No metabolismo dos esfingolipídios, o metabólito anotado que impacta a via bioquímica é a esfinganina, formada a partir da condensação da palmitoil-CoA com serina e redução de NADPH. A esfinganina então formada é acilada e desidrogenada para formar ceramida, precursora de todos os esfingolipídios (Figura 4.17) (NELSON e COX, 2014).

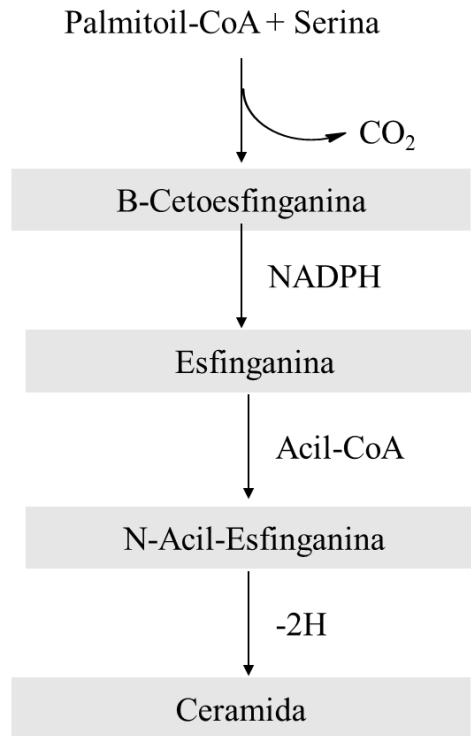


FIGURA 4.17- Biossíntese de esfingolípídeos. Condensação de palmitoil-CoA com serina, formando β -cetoesfinganina, seguida da redução de NADPH, formando esfinganina, que é acilada para formar a ceramida. Adaptado de NELSON e COX (2014).

A via metabólica dos esfingolípídeos é uma importante via celular complexa e interconectada, onde a ceramida ocupa uma posição central tanto na biossíntese como no catabolismo. Alterações no metabolismo dos esfingolípídeos geralmente estão associados com doenças que afetam o processo de enzimas que degradam os esfingolípídeos. Geralmente erros inatos do metabolismo relativamente raros, que resultam no acúmulo de esfingolípídeos (esfingolipidose) causado por defeitos nos genes que codificam proteínas que participam da degradação lisossomal dos esfingolípídeos (PRALHADA RAO et al., 2013).

O ácido palmítico é responsável pelo impacto no metabolismo dos glicerolípídeos, assim como na biossíntese e metabolismo dos ácidos graxos.

A via da pentose fosfato, impactada pelo metabólito sedoheptulose-7-fosfato, é uma rota alternativa de oxidação da glicose-6-fosfato (G6P) sem produção de ATP, porém com geração de NADPH e pentose fosfato. A via das pentoses fosfato é o maior fornecedor de NADPH para a síntese de ácidos graxos. O NADPH da via da pentose fosfato é utilizado pelas células do fígado, tecido adiposo e glândulas mamárias durante a lactação. Assim como na síntese de colesterol e hormônios esteróides (fígado, glândulas adrenais e gônadas) (HARVEY e FERRIER 2012).

Apesar de não haver relatos na literatura sobre todas as vias alteradas para a DW, todas estão relacionadas ao metabolismo lipídico. Sabe-se que o acúmulo e a deficiência de Cu estão ligados ao metabolismo lipídico, sendo assim, na DW o metabolismo lipídico é desregulado, o que corrobora com os resultados do presente estudo. Os mecanismos subjacentes que ligam o metabolismo do Cu e dos lipídios na DW não são claros. O Cu pode prejudicar o mecanismo metabólico pela ligação direta às estruturas proteicas e lipídicas ou pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) com consequente danos às organelas celulares, vitais para o metabolismo energético (MAZI et al., 2020).

5. CONCLUSÕES

A aplicação de uma abordagem metabolômica global associada ao emprego de técnicas de alta seletividade e sensibilidade (LC-HRMS) permitiu a análise das alterações metabolômicas em amostras de saliva de indivíduos portadores da doença de Wilson em comparação a um grupo controle. Através dos modelos estatísticos multivariados e univariados foi possível obter 39 *features* significativos na separação dos grupos, sendo 15 deles anotados putativamente. Betaína positivamente regulada e esfingalina negativamente regulada foram reportadas com os mesmos níveis de alteração em estudos metabolômicos anteriores da DW, o que indica importantes metabólitos que poderão contribuir no avanço de pesquisas de biomarcadores para a DW, auxiliando em um diagnóstico clínico mais preciso. Da mesma forma, vias bioquímicas que se mostraram alteradas no presente trabalho também já foram reportadas anteriormente para a DW. O modelo de curva ROC escolhido, composto por 3 metabólitos, apresentou uma AUC de 0,96, sendo uma medida satisfatória para discriminar o grupo DW e GC. O metabólito mais significativo na curva ROC foi a ceramida Cer(d18:2/20:4), metabólito ineditamente reportado para amostras envolvendo pacientes com DW, o que o torna um metabólito alvo a ser avaliado em estudos metabolômicos alvo.

Este estudo é um estudo piloto, do qual revelou-se as primeiras alterações metabolômicas em amostras de saliva relacionadas à DW. Dados os escassos estudos metabolômicos em indivíduos com DW, trabalhos futuros são necessários para um esclarecimento mais detalhado sobre metabólitos e rotas bioquímicas impactadas, incluindo estudos com técnicas de análises ortogonais, como por exemplo o modo HILIC por LC-MS e análises por GC-MS, que podem contribuir para uma análise mais abrangente e, conseqüentemente, um melhor entendimento das alterações bioquímicas envolvidas na DW. Adicionalmente, em

trabalhos futuros, pode-se conduzir análises metabolômicas alvo empregando os demais metabólitos anotados neste trabalho como etapa de validação/confirmação.

O presente trabalho reforça a utilização da saliva como potencial fluido biológico para diagnósticos menos invasivos, uma vez que potenciais biomarcadores reportados anteriormente em amostras de sangue também foram detectados nas amostras de saliva dos pacientes com DW. Assim, pode-se inferir que as características da DW podem ser refletidas igualmente na saliva.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEVA-ANDANY, M. M.; CARNEIRO-FREIRE, N.; SECO-FILGUEIRA, M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, C.; & MOURIÑO-BAYOLO, D. “Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans”. *Mitochondrion*, 46, 73-90, 2019.

AGRANONIK, M.; & MACHADO, L. R. “Análise de covariância: Uma aplicação a dados de função pulmonar, ajustados por idade”. *Clinical and Biomedical Research*, 31(2), 2011.

ALA, A.; BORJIGIN, J.; ROCHWARGER, A.; & SCHILSKY, M. “Wilson disease in septuagenarian siblings: raising the bar for diagnosis”. *Hepatology*, 41(3), 668-670, 2005.

ALA, A.; WALKER, A. P.; ASHKAN, K.; DOOLEY, J. S.; & SCHILSKY, M. L. “Wilson's disease”. *The Lancet*, 369(9559), 397-408, 2007.

AMARAL, A. G.; MORETTO, I. A.; ZANDONADI, F. D. S.; ZAMORA-OBANDO, H. R.; ROCHA, I.; SUSSULINI, A.; DE THOMAZ, A. A.; OLIVEIRA, R. V.; DOS SANTOS, A. M.; & SIMIONATO, A. V. C. “Comprehending Cardiac Dysfunction by Oxidative Stress: Untargeted Metabolomics of In Vitro Samples”. *Frontiers in Chemistry*, 10, 176, 2022.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 269, de 22 de setembro de 2005: Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 2005.

ARAUJO, F. C. “Doença de Wilson: a experiência de seis décadas no HC-FMUSP”. Dissertação de mestrado em gastroenterologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012.

BARBOSA E. R.; MACHADO A. A.; CANÇADO E. L. R.; DEGUTI M. M.; & SCAFF M. “Wilson’s disease: a case report and a historical review”. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, 67:539-43, 2009.

BARTLETT, K.; & EATON, S. “Mitochondrial β -oxidation”. *European Journal of Biochemistry*, v. 271, n. 3, p. 462-469, 2004.

BEALE, D. J.; PINU, F. R.; KOUREMENOS, K. A.; POOJARY, M. M.; NARAYANA, V. K.; BOUGHTON, B. A.; KANOJIA, K.; DAYALAN, S.; JONES, O. A. H.; & DIAS, D. A. “Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research”. *Metabolomics*, 14, 1-31, 2018.

BEM R. S. de.; RASKIN S.; MUZZILLO D. A.; DEGUTI M. M.; CANÇADO E. L. R.; ARAÚJO T. F.; NAKHLE, M. C.; BARBOSA, E. R.; MUNHOZ R. P., & TEIVE, H. A. G. “Wilson’s disease in Southern Brazil: genotype-phenotype correlation and description of two novel mutations in ATP7B gene. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, 71:503-7, 2013.

BEM, R. S. de; MUZZILLO, D. A.; DEGUTI, M. M.; BARBOSA, E. R.; WERNECK, L. C.; & TEIVE, H. A. G. “Wilson's disease in southern Brazil: a 40-year follow-up study”. *Clinics*, 66(3), 411-416, 2011.

BETHIN, K. E.; CIMATO, T. R.; & ETTINGER, M. J. “Copper Binding to Mouse Liver S-Adenosylhomocysteine Hydrolase and the Effects of Copper on Its Levels (*)”. *Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20703-20711, 1995.

BRITO, J. C. D. F.; COUTINHO, M. D. A. P.; ALMEIDA, H. J. F. D.; & NÓBREGA, P. V. D. “Doença de Wilson: diagnóstico clínico e sinais das" faces do panda" à ressonância magnética”. Relato de caso. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 63, 176-179, 2005.

BRUHA, R.; MARECEK, Z.; POSPISILOVA, L.; NEVSIMALOVA, S.; VITEK, L.; MARTASEK, P.; NEVORAL, J.; PETR TYL, J.; URBANEK, P.; JIRASKOVA, A.; & FERENCI, P. “Long-term follow-up of Wilson disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation”. *Liver International*, 31(1), 83-91, 2010.

BROWN, D. G., RAO, S.; WEIR, T. L.; O’MALIA, J.; BAZAN, M.; BROWN, R. J.; & RYAN, E. P. “Metabolomics and metabolic pathway networks from human colorectal cancers, adjacent mucosa, and stool”. *Cancer & metabolism*, 4(1), 1-12, 2016.

CABRAS, T.; SANNA, M.; MANCONI, B.; FANNI, D.; DEMELIA, L.; SORBELLO, O.; IAVARONE, F.; CASTAGNOLA, M.; FAA, G.; & MESSANA, I. “Proteomic investigation of whole saliva in Wilson’s disease”. *Journal of Proteomics*, 128, 154–163, 2015.

CANÇADO, E. L.; & BARBOSA, E. R. “Wilson Disease in South America: Brazil”. In *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE* (pp. 327-333). Academic Press, 2019.

CANUTO, G. A.; COSTA, J. L. D.; DA CRUZ, P. L.; SOUZA, A. R. L. D.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES K. T.; & TAVARES, M. F. “Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas”. *Química Nova*, 41, 75-91, 2018.

CASTRO, A.; SIGNINI, É. F.; OLIVEIRA, J. M.; DI MEDEIROS LEAL, M. C. B.; REHDER-SANTOS, P.; MILLAN-MATTOS, J. C.; MINATEL, V.; PANTONI, C. B. F.; OLIVEIRA, R. V.; CATAI, A. M.; & FERREIRA, A. G. “The Aging Process: A Metabolomics Perspective”. *Molecules*, 27(24), 8656, 2022.

CAUZA, E.; MAIER-DOBERSBERGER, T.; POLLI, C.; KASERER, K.; KRAMER, L.; & FERENCI, P. “Screening for Wilson's disease in patients with liver diseases by serum ceruloplasmin”. *Journal of hepatology*, 27(2), 358-362, 1997.

CZŁONKOWSKA, A.; LITWIN, T.; DUSEK, P.; FERENCI, P.; LUTSENKO, S.; MEDICI, V.; RYBAKOWSKI, J. K.; WEISS, K. H.; & SCHILSKY, M. L. “Wilson disease”. *Nature reviews Disease primers*, 4(1), 21, 2018.

DEGUTI, M. M.; GENSCHEL, J.; CANCADO, E. L.; BARBOSA, E. R.; BOCHOW, B.; MUCENIC, M.; PORTA, G.; LOCHS, H.; CARRILHO, F. J.; & SCHMIDT, H. H. J. “Wilson disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients”. *Human mutation*, 23(4), 398-398, 2004.

DELGADO, M.; PÉREZ-MIGUELSANZ, J.; GARRIDO, F.; RODRÍGUEZ-TARDUCHY, G.; PÉREZ-SALA, D.; & PAJARES, M. A. “Early effects of copper accumulation on methionine metabolism”. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 2080-2090. 2008.

DUFT, R. G.; CASTRO, A.; BONFANTE, I. L.; LOPES, W. A.; SILVA, L. R.; CHACON-MIKAHIL, M. P.; LEITE, N.; & CAVAGLIERI, C. R. “Altered metabolomic profiling of overweight and obese adolescents after combined training is associated with reduced insulin resistance”. *Scientific Reports*, 10(1), 16880, 2020.

DUSEK, P.; LITWIN, T.; & CZLONKOWSKA, A. “Wilson disease and other neurodegenerations with metal accumulations”. *Neurologic clinics*, 33(1), 175-204, 2015.

EMWAS, A. H.; ROY, R.; MCKAY, R. T.; TENORI, L.; SACCENTI, E.; GOWDA, G. N.; RAFTERY, D.; ALAHMARI, F.; JAREMKO, L.; JAREMKO, M.; & WISHART, D. S. “NMR spectroscopy for metabolomics research”. *Metabolites*, 9(7), 123, 2019.

EASL, EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. “EASL clinical practice guidelines: Wilson’s disease”. *Journal of Hepatology*, 56(3), 671-685, 2012.

FAHY, E.; SUD, M.; COTTER, D.; & SUBRAMANIAM, S. “LIPID MAPS online tools for lipid research”. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W606-W612, 2007.

FÉLIX, T. M.; OLIVEIRA, B. M.; ARTIFON, M.; CARVALHO, I.; BERNARDI, F. A.; SCHWARTZ, I. V.; SAUTE, J. A.; FERRAZ, V. E. F.; ACOSTA, A. X.; SORTE, N. B.; ALVES, D.; & RARAS NETWORK GROUP. “Epidemiology of rare diseases in Brazil: protocol of the Brazilian Rare Diseases Network (RARAS-BRDN)”. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17(1), 1-13, 2022.

FERENCI, P. “Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing”. *Human genetics*, 120, 151-159, 2006.

FERENCI, P. “Whom and how to screen for Wilson disease”. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 8(5), 513-520, 2014.

FERENCI, P.; STEINDL-MUNDA, P.; VOGEL, W.; JESSNER, W.; GSCHWANTLER, M.; STAUBER, R.; DATZ, C.; HACKL, F.; WRBA, F.; BAUER, P.; & LORENZ, O. “Diagnostic value of quantitative hepatic copper determination in patients with Wilson’s Disease”. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3(8), 811-818, 2005.

FERNANDES, V. F. F. “Dificuldades do diagnóstico e tratamento da Doença de Wilson”. Dissertação de Mestrado, 38 p. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto, 2016.

GHOSH, A.; SCHLECHT, H.; HEPTINSTALL, L. E.; BASSETT, J. K.; CARTWRIGHT, E.; BHASKAR, S. S.; URQUHART, J.; ALEXANDER, B.; MONAVARI, A. A.; JAMESON, E.; SCHWAHN, B. C.; WALTER, J. H.; DOUZGOU, S., MURPHY, H., HENDRIKSZ, C., SHARMA, R., WILCOX, G., CRUSHELL, E.; MONAVARI, A. A.; MARTIN, R.; DOOLAN, A.; SENNIAPPAN, S.; RAMSDEN, S. C.; JONES, S. A.; & BANKA, S. “Diagnosing childhood-onset inborn errors of metabolism by next-generation sequencing”. *Archives of Disease in Childhood*, 102(11), 1019-1029, 2017.

GIUGLIANI, R.; VAIRO, F. P.; RIEGEL, M.; DE SOUZA, C. F.; SCHWARTZ, I. V.; & PENA, S. D. “Rare disease landscape in Brazil: report of a successful experience in inborn errors of metabolism”. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1), 1-8, 2016.

GIUGLIANI, L.; VANZELLA, C.; ZAMBRANO, M. B.; DONIS, K. C.; WALLAU, T. K. W.; COSTA, F. M. D.; & GIUGLIANI, R. “Clinical research challenges in rare genetic diseases in Brazil”. *Genetics and Molecular Biology*, 42, 305-311, 2019.

GRONWALD, W.; KLEIN, M. S.; ZELTNER, R.; SCHULZE, B. D.; REINHOLD, S. W.; DEUTSCHMANN, M.; IMMERVOLL, A-K.; BÖGER, C. A.; BANAS, B.; ECKARDT, K-U.; & OEFNER, P. J. “Detection of autosomal dominant polycystic kidney disease by NMR spectroscopic fingerprinting of urine”. *Kidney International*, 79(11), 1244-1253, 2011.

GULBINS, E.; WALTER, S.; BECKER, K. A.; HALMER, R.; LIU, Y.; REICHEL, M.; EDWARDS, M. J.; MÜLLER, C. P.; FASSBENDER, K.; KORNHUBER, J. “A central role for the acid sphingomyelinase/ceramide system in neurogenesis and major depression”. *Journal of Neurochemistry*, 134(2), 183–192, 2015.

HARVEY, R. A.; & FERRIER, D. R. *Bioquímica Ilustrada*. Tradução Carla Dalmaz e colaboradores. Artmed, 5. Ed., Porto Alegre, 2012.

HÉNYKOVÁ, E.; KALETA, M.; KLICOVA, K.; GONZALEZ, G.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; & KAŇOVSKÝ, P. “Quantitative Determination of Endogenous Tetrahydroisoquinolines, Potential Parkinson’s Disease Biomarkers, in Mammals”. *ACS Chemical Neuroscience*, 13(23), 3230-3246, 2022.

HUSTER, D.; PURNAT, T. D.; BURKHEAD, J. L.; RALLE, M.; FIEHN, O.; STUCKERT, F.; OLSON, O. N.; TEUPSER, D.; & LUTSENKO, S. “High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease”. *Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 8343-8355, 2007.

IBÁÑEZ, C.; SIMÓ, C.; BARUPAL, D. K.; FIEHN, O.; KIVIPELTO, M.; CEDAZO-MÍNGUEZ, A.; & CIFUENTES, A. “A new metabolomic workflow for early detection of Alzheimer's disease”. *Journal of Chromatography A*, 1302, 65-71, 2013.

KANEHISA, M.; & GOTO, S. "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes". *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30, 2000.

KIM, J. W.; KIM, J. H.; SEO, J. K.; KO, J. S.; CHANG, J. Y.; YANG, H. R.; & KANG, K. H. "Genetically confirmed Wilson disease in a 9-month old boy with elevations of aminotransferases". *World Journal of Hepatology*, 5(3), 156, 2013.

KIM, S. J.; KIM, S. H.; KIM, J. H.; HWANG, S.; & YOO, H. J. "Understanding metabolomics in biomedical research". *Endocrinology and Metabolism*, 31(1), 7-16, 2016.

KLEINE, R. T.; MENDES, R.; PUGLIESE, R.; MIURA, I.; DANESI, V.; & PORTA, G. "Wilson's disease: an analysis of 28 Brazilian children". *Clinics*, 67, 231-235, 2012.

LE, A.; SHIBATA, N. M.; FRENCH, S. W.; KIM, K.; KHARBANDA, K. K.; ISLAM, M. S.; LASALLE, J. M.; HALSTED, C. H.; KEEN, C. L.; & MEDICI, V. "Characterization of timed changes in hepatic copper concentrations, methionine metabolism, gene expression, and global DNA methylation in the Jackson toxic milk mouse model of Wilson disease". *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8004-8023, 2014.

LENZ, E. M.; & WILSON, I. D. "Analytical strategies in metabonomics". *Journal of Proteome Research*, 6(2), 443-458, 2007.

LI, M.; LI, Y.; CHEN, J.; WEI, W.; PAN, X.; LIU, J.; LIU, Q.; LEU, W.; ZHANG, L.; YANG, X.; LU, J.; & WANG, K. "Copper ions inhibit S-adenosylhomocysteine hydrolase by causing dissociation of NAD⁺ cofactor". *Biochemistry*, 46(41), 11451-11458, 2007.

LI, M.; MA, J.; WANG, W.; YANG, X.; & LUO, K. “Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype–phenotype correlation in Chinese patients with Wilson disease”. *BMC Gastroenterology*, 21(1), 1-21, 2021.

LIN, L. J.; WANG, D. X.; DING, N. N.; LIN, Y.; JIN, Y.; & ZHENG, C. Q. “Comprehensive analysis on clinical features of Wilson’s disease: an experience over 28 years with 133 cases”. *Neurological Research*, 36(2), 157-163, 2014.

LIU, G.; LEE, D. P.; SCHMIDT, E.; & PRASAD, G. L. “Pathway analysis of global metabolomic profiles identified enrichment of caffeine, energy, and arginine metabolism in smokers but not moist snuff consumers”. *Bioinformatics and Biology Insights*, 13, 1177932219882961, 2019.

LIU, X.; & LOCASALE, J. W. “Metabolomics: a primer”. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(4), 274-284, 2017.

LIU, Y.; ZHOU, H.; GUO, H.; & BAI, Y. “Genetic and clinical analysis in a cohort of patients with Wilson's disease in Southwestern China”. *Archives of Medical Research*, 46(2), 164-169, 2015.

LOPES, A. S.; CRUZ, E. C. S.; SUSSULINI, A.; & KLASSEN, A. “Metabolomic strategies involving mass spectrometry combined with liquid and gas chromatography”. *Metabolomics: from Fundamentals to Clinical Applications*, 77-98, 2017.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTRÖM, Å.; PETTERSEN, J.; & BERGMAN, R. “Experimental design and optimization”. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42(1-2), 3-40, 1998.

LUTSENKO, S. “Modifying factors and phenotypic diversity in Wilson's disease”. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1315, n. 1, p. 56-63, 2014.

LUTSENKO, S.; BHATTACHARJEE, A.; & HUBBARD, A. L. “Copper handling machinery of the brain”. *Metallomics*, 2(9), 596-608, 2010.

MANDAL, R.; CHAMOT, D.; & WISHART, D. S. “The role of the Human Metabolome Database in inborn errors of metabolism”. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(3), 329-336, 2018.

MASTRANGELO, A.; FERRARINI, A.; REY-STOLLE, F.; GARCIA, A.; & BARBAS, C. “From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS”. *Analytica Chimica Acta*, 900, 21-35, 2015.

MATO, J.; ALVAREZ, L.; ORTIZ, P.; & PAJARES, M. A. “S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications”. *Pharmacology & Therapeutics*, 73(3), 265-280, 1997.

MATOS, C.; MARTINS, S.; QUINTAL, I.; VIEIRA, L.; COSTA, F.; PEREIRA, F.; & SILVA, E. “Elevação das enzimas hepáticas, persistente e assintomática, como forma de apresentação da doença de Wilson em idade pediátrica”. *Revista Nascer e Crescer*, 24, 56-63, 2015.

MAZI, T. A.; SARODE, G. V.; CZLONKOWSKA, A.; LITWIN, T.; KIM, K.; SHIBATA, N. M., & MEDICI, V. “Dysregulated choline, methionine, and aromatic amino acid metabolism in patients with Wilson disease: exploratory metabolomic profiling and implications for hepatic and neurologic phenotypes”. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5937, 2019.

MAZI, T. A.; SHIBATA, N. M.; & MEDICI, V. “Lipid and energy metabolism in Wilson disease”. *Liver Research*, 4(1), 5-14, 2020.

MELLO, V. D. F. de; LANKINEN, M.; SCHWAB, U.; KOLEHMAINEN, M.; LEHTO, S.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; OREŠIČ, M.; PULKKINEN, L.; UUSITUPA, M.; & ERKKILÄ, A. T. “Link between plasma ceramides, inflammation and insulin resistance: association with serum IL-6 concentration in patients with coronary heart disease”. *Diabetologia* 52, 2612–2615, 2009.

MELNIKOVA, I. “Rare diseases and orphan drugs”. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11:267–268, 2012.

METZ, T. O.; ZHANG, Q.; PAGE, J. S.; SHEN, Y.; CALLISTER, S. J.; JACOBS, J. M.; & SMITH, R. D. “Future of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolic profiling and metabolomic studies for biomarker discovery”. *Biomarkers Med*, 1 (1), 159-185, 2007.

MULLIGAN, C., & BRONSTEIN, J. M. “Wilson disease: an overview and approach to management”. *Neurologic Clinics*, 38(2), 417-432, 2020.

NAOI, M.; MARUYAMA, W.; AKAO, Y.; & YI, H. “Dopamine-derived endogenous N-methyl-(R)-salsolinol: its role in Parkinson's disease”. *Neurotoxicology and Teratology*, 24(5), 579-591, 2002.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C. P.; LUCCI, P.; & BUSQUETS, R. “State-of-the-art in fast liquid chromatography–mass spectrometry for bio-analytical applications”. *Journal of Chromatography B*, 927, 3-21, 2013.

OLIVEIRA, F. de; ROBERTO, A.; TINOCO, L. W. “Esfingolípídios: metabólitos bioativos e modelos para o planejamento de fármacos”. *Revista Virtual de Química*, 7, 4, 1384-1401, 2015.

OLIVEIRA SÁ, M. V. B. de; PACHECO, F. J. S.; FIGUEREDO, J. L. C.; CAVANCANTE, G. H. D. S. M.; OLIVEIRA SILVA, T.; & VASCONCELOS, L. R. S. “New ATP7B Gene Mutation in a Brazilian Patient with Wilson Disease”. *European Journal of Case Reports in Internal Medicine*, 9(12), 2022.

PATIL, M.; SHETH, K. A.; KRISHNAMURTHY, A. C.; & DEVARBHAVI, H. “A review and current perspective on Wilson disease”. *Journal of clinical and experimental hepatology*, 3(4), 321-336, 2013.

PEÑA, M. M.; LEE, J.; & THIELE, D. J. “A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution”. *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1251-1260, 1999.

PFEIFFER, R. F. “Wilson disease”. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 22(4), 1246-1261, 2016.

PFEIFFER, R. F. “Wilson's disease. In: *Seminars in neurology*”. Copyright© 2007 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA., 2007. p. 123-132.

PILON, A. C.; SELEGATO, D. M.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C.; PINHO, D. R.; CARNEVALE NETO, F.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; & LOPES, N. P. “Metabolômica de plantas: métodos e desafios”. *Química Nova*, 43, 329-354, 2020.

POLISHCHUK, R. S. “Chapter 6 - Cellular Function of ATP7B (Wilson ATPase)”. *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Academic Press, p. 45-56, 2019.

PRALHADA RAO, R.; VAIDYANATHAN, N.; RENGASAMY, M.; MAMMEN OOMMEN, A.; SOMAIYA, N.; & JAGANNATH, M. R. “Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases”. *Journal of Lipids*, 2013.

QIU, Y.; SU, M.; XIAO, X.; ZHOU, D.; & XIE, L. “Metabolomic profiling of Wilson disease, an inherited disorder of copper metabolism, and diseases with similar symptoms but normal copper metabolism”. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 18, 282, 2023.

ROBERTS, E. A.; & SCHILSKY, M. L. “Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update”. *Hepatology*, 47(6), 2089-2111, 2008.

ROSENCRANTZ, R.; & SCHILSKY, M. “Wilson disease: pathogenesis and clinical considerations in diagnosis and treatment”. In *Seminars in Liver Disease*, © Thieme Medical Publishers. Vol. 31, No. 03, pp. 245-259, 2011.

SÁNCHEZ-MONTEAGUDO, A.; RIPOLLÉS, E.; BERENQUER, M.; & ESPINÓS, C. “Wilson’s disease: Facing the challenge of diagnosing a rare disease”. *Biomedicines*, 9(9), 1100, 2021.

SANDAHL, T. D.; LAURSEN, T. L.; MUNK, D. E.; VILSTRUP, H.; WEISS, K. H.; & OTT, P. “The prevalence of Wilson’s disease: an update”. *Hepatology*, 71(2), 722-732, 2020.

SCHURIG-BRICCIO, L. A.; & GENNIS, R. B. “Characterization of the PIB-Type ATPases present in *Thermus thermophilus*”. *Journal of Bacteriology*, 194(15), 4107-4113, 2012.

SCHRAG, A.; & SCHOTT, J. M. “Kayser–fleischer rings in wilson’s disease”. *The New England Journal of Medicine*, 366(12), 18, 2012.

SIAJ, R.; SAUER, V.; STÖPPELER, S.; SPIEGEL, H. U.; KÖHLER, G.; ZIBERT, A.; & SCHMIDT, H. H. “Dietary copper triggers onset of fulminant hepatitis in the Long-Evans cinnamon rat model”. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 18(39), 5542. 2012.

SILVA, A. C. da; COLÓSIMO, A. P.; & SALVESTRO, D. “Doença de Wilson (degeneração hepatolenticular): revisão bibliográfica e relato de caso”. *Revista Médica de Minas Gerais*, 20, 404-411, 2010.

SILVA NETO, B. R. S. da. “Patologias metabólicas e a medicina de precisão: uma abordagem integrada”. Editora Atena, 4, 53-61, 2023.

SULLIVAN, C. A.; CHOPDAR, A.; & SHUN-SHIN, G. A. “Dense Kayser Fleischer ring in asymptomatic Wilson's disease (hepatolenticular degeneration)”. *British Journal of Ophthalmology*, 86(1), 114-114, 2002.

STERNLIEB, I., & SCHEINBERG, I. H. “Prevention of Wilson's disease in asymptomatic patients”. *New England Journal of Medicine*, 278(7), 352-359, 1968.

TEBANI, A.; ABILY-DONVAL, L.; AFONSO, C.; MARRET, S.; & BEKRI, S. “Clinical metabolomics: the new metabolic window for inborn errors of metabolism investigations in the post-genomic era”. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1167, 2016.

TELIANIDIS, J.; HUNG, Y. H.; MATERIA, S.; & FONTAINE, S. L. “Role of the P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis”. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5, 44, 2013.

TIAN, Y.; GONG, G. Z.; YANG, X.; & PENG, F. “Diagnosis and management of fulminant Wilson’s disease: a single center’s experience”. *World Journal of Pediatrics*, 12, 209-214, 2016.

TSURUOKA, M.; HARA, J.; HIRAYAMA, A.; SUGIMOTO, M.; SOGA, T.; SHANKLE, W. R.; & TOMITA, M. “Capillary electrophoresis-mass spectrometry-based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementia patients”. *Electrophoresis*, 34(19), 2865-2872, 2013.

WAINSTOCK, D.; KATZ, A. “Advancing rare disease policy in Latin America: a call to action”. *The Lancet Regional Health–Americas*, v. 18, 2023.

WAKAP, S. N.; LAMBERT, D. M.; OLRYS, A.; RODWELL, C.; GUEYDAN, C.; LANNEAU, V.; MURPHY, D.; CAM, Y. L.; & RATH, A. “Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database”. *European Journal of Human Genetics*, 28(2), 165-173, 2020.

WALSHE, J. M. “Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride”. *The Lancet*, v. 319, n. 8273, p. 643-647, 1982.

WALTER, U.; SKOWROŃSKA, M.; LITWIN, T.; SZPAK, G. M.; JABŁONKA-SALACH, K.; SKOLOUDÍK, D.; BULSKA, E.; & CZŁONKOWSKA, A. “Lenticular nucleus hyperechogenicity in Wilson’s disease reflects local copper, but not iron accumulation”. *Journal of Neural Transmission*, 121, 1273-1279, 2014.

WANG, D.; TAN, G.; WANG, H.; CHEN, P.; HAO, J.; & WANG, Y. "Identification of novel serum biomarker for the detection of acute myeloid leukemia based on liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 166, 357-363, 2019.

WANG, Y.; XIAO, J.; SUZEK, T. O.; ZHANG, J.; WANG, J.; & BRYANT, S. H. "PubChem: a public information system for analyzing bioactivities of small molecules". *Nucleic Acids Research*, 37(suppl_2), W623-W633, 2009.

WANT, E. J.; MASSON, P.; MICHPOULOS, F.; WILSON, I. D.; THEODORIDIS, G.; PLUMB, R. S.; SHOCKCOR, J.; LOFTUS, N.; HOLMES, E.; & NICHOLSON, J. K. "Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS". *Nature Protocols*, 8(1), 17-32, 2013.

WEISS, K. H.; SCHILSKY, M. "Wilson Disease". Adam, M. P.; Feldman, J.; Mirzaa, G. M.; Pagon, R. A.; Wallace, S. E.; & Amemiya, A., editors. *GeneReviews®*. Seattle-WA: University of Washington, Seattle; 1999-2023.

WILSON, D. C.; PHILLIPS, M. J.; COX, D. W.; & ROBERTS, E. A. "Severe hepatic Wilson's disease in preschool-aged children". *The Journal of Pediatrics*, 137(5), 719-722, 2000.

WILSON, S. A. K. "Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver". *Brain*, 34, 295-509, 1912.

WISHART, D. S.; TZUR, D.; KNOX, C.; EISNER, R.; GUO, A. C.; & YOUNG, N. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research. Database*, D521-6, 2007.

WOOTON-KEE, C. R.; ROBERTSON, M.; ZHOU, Y.; DONG, B.; SUN, Z.; KIM, K. H.; LIU, H.; XU, Y.; PUTLURI, N.; SAHA, P.; COARFA, C.; MOORE,

D. D.; & NUOTIO-ANTAR, A. M. “Metabolic dysregulation in the *Atp7b*^{-/-} Wilson’s disease mouse model”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(4), 2076-2083, 2020.

XIA, J.; BROADHURST, D. I.; WILSON, M.; & WISHART, D. S. “Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial”. *Metabolomics*, 9, 280-299, 2013.

XING, Y.; TANG, Y.; ZHAO, L.; WANG, Q.; QIN, W.; ZHANG, J-L.; JIA, JI. ‘Plasma Ceramides and Neuropsychiatric Symptoms of Alzheimer’s Disease’. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 52, no. 3, pp. 1029-1035, 2016.

XUAN, J.; PAN, G.; QIU, Y.; YANG, L.; SU, M.; LIU, Y.; CHEN, J.; FENG, G.; FANG, Y.; JIA, W.; XING, Q.; & HE, L. “Metabolomic profiling to identify potential serum biomarkers for schizophrenia and risperidone action”. *Journal of Proteome Research*, 10(12), 5433-5443, 2011.

YANG, G. M., XU, L., WANG, R. M., TAO, X., ZHENG, Z. W., CHANG, S., MA, D.; ZHAO, C.; DONG, Y.; WU, S.; GUO, J.; & WU, Z. Y. “Structures of the human Wilson disease copper transporter ATP7B”. *Cell Reports*, 42(5), 2023.

YANG, J.; CHEN, T.; SUN, L.; ZHAO, Z.; QI, X.; ZHOU, K.; CAO, Y.; WANG, X.; QIU, Y.; SU, M.; ZHAO, A.; WANG, P.; YANG, P.; WU, J.; FENG, G.; HE, L.; JIA, W.; & WAN, C. “Potential metabolite markers of schizophrenia”. *Molecular Psychiatry*, 18(1), 67-78, 2013.

YOUSEFI, M.; YOUSEFI, M.; & GHARRAVI, A. M. “Late-onset Wilson disease in older patient without ophthalmological findings, a case report”. *Clinical Case Reports*, 7(6), 1253-1258, 2019.

YUAN, M.; BREITKOPF, S. B.; YANG, X.; & ASARA, J. M. “A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue”. *Nature Protocols*, 7(5), 872-881, 2012.

ZHANG, A.; SUN, H.; & WANG, X. “Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168, 1718-1727, 2012.

ZIETZER, A.; DÜSING, P.; REESE, L.; NICKENIG, G.; & JANSEN, F. “Ceramide metabolism in cardiovascular disease: a network with high therapeutic potential”. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 42(10), 1220-1228, 2022.

ŽIGRAJ, M.; VYSKOČIL, M.; TÓTHOVÁ, A.; VEREŠ, P.; BLUSKA, P.; & VALKOVIČ, P. “Late-onset Wilson's disease”. *Frontiers in Medicine*, 7, 26, 2020.

7. ANEXOS

ANEXO 1 – Termos de Assentimento dos participantes.

1

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA
PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1- Cromatogramas de íons extraídos (EIC) e os espectros correspondes dos metabólitos anotados putativamente.

