



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2014

**Lara Alexandra
Monteiro Almeida**

**Lipidómica do plasma materno para o diagnóstico
de diabetes gestacional e trissomia 21**



**Lara Alexandra
Monteiro Almeida**

**Lipidómica do plasma materno para o diagnóstico
de diabetes gestacional e trissomia 21**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Gil, Professora Associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor António de Sousa Barros, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Agradecimentos

Os meus agradecimentos vão especialmente para a minha orientadora Doutora Ana Gil por me ter dado a oportunidade de participar neste projeto. Agradeço sinceramente pela sua ajuda, orientação e disponibilidade.

Agradeço também ao Dr. António Barros pela sua ajuda na análise multivariada e univariada.

Agradeço à Joana Pinto que contribuiu para este trabalho com os experimentos realizados no RMN, com a sua paciência e a sua ajuda na análise dos resultados.

Agradeço a Maternidade Bissaya Barreto da cidade de Coimbra pelo fornecimento das amostras utilizadas neste projeto.

Agradeço ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro que me proporcionou um ótimo ambiente para a realização deste projeto.

E por fim agradeço aos meus pais, familiares e amigos que me apoiaram incondicionalmente.

O júri

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Prof. Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil
Professora Associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Índice

Lista de abreviaturas e simbologia.....	ix
1. Introdução	1
1.1 Composição e transporte de lípidos no sangue e relação com doenças.....	1
1.1.1 Princípios do metabolismo lipídico	1
1.1.2 Alterações do metabolismo lipídico com a gravidez.....	4
1.1.3 Alterações do metabolismo lipídico com doenças da gravidez.....	5
1.1.3.1 Diabetes Mellitus Gestacional	5
1.1.3.2 Trissomia 21	17
1.2 Doenças da gravidez e diagnóstico clínico.....	23
1.2.1 Doenças do feto	24
1.2.1.1 Anomalias cromossômicas	24
1.2.1.2 Malformações do feto.....	26
1.2.1.3 Outras doenças que afetam o feto.....	28
1.2.2 Doenças da grávida.....	30
1.2.2.1 Pré-eclampsia.....	30
1.2.2.2 Diabetes mellitus gestacional	31
1.3 Métodos de análise lipídica	32
1.3.1 Aspectos gerais sobre a análise dos lípidos.....	32
1.3.2 Métodos de extração de lípidos	34
1.3.3 Outros métodos utilizados para a análise de lípidos.....	36
1.3.4 A abordagem lipidômica	37
1.3.4.1 Conceitos gerais de metabolômica	37
1.3.4.2 Espectrometria de massa (MS): princípios.....	38
1.3.4.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN): princípios .	39
1.3.4.4 Análise multivariada: princípios e aplicações	41
1.4 Objetivos.....	46
2. Materiais e métodos.....	46
2.1 Colheita e armazenamento de amostras.....	46
2.2 Métodos de extração lipídica.....	47
2.2.1 Seleção do melhor método de extração de lípidos do plasma	47

2.2.2 Estudo de doenças	49
2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹ H: aquisição de dados e processamento	49
2.4 Pré-processamento e análise dos dados de RMN	50
3. Resultados e discussão.....	53
3.1 Extração de lípidos do plasma: escolha do melhor método de extração	53
3.1.1 Avaliação da reprodutibilidade do método.....	58
3.2 Estudo de doenças da gravidez.....	60
3.2.1 Atribuição de sinais e interpretação dos espectros de RMN de extratos lipídicos do plasma	60
3.2.2 Estudo do grupo de diabetes mellitus gestacional do 2º trimestre de gravidez	66
3.2.3 Estudo do grupo de trissomia 21 do 1º e 2º trimestres de gravidez.....	77
3.2.3.1 Trissomia 21 vs. Controlos no 1º trimestre de gravidez.....	77
3.2.3.2 Trissomia 21 vs. Controlos no 2º trimestre de gravidez.....	82
4. Conclusões e perspetivas futuras.....	89
Bibliografia.....	91

Palavras-chave Plasma materno, diagnóstico pré-natal, doenças da gravidez, diabetes gestacional, trissomia 21, lipidômica, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Resumo Devido à elevada incidência das doenças pré-natais, as complicações que podem causar tanto a mãe como ao feto e a necessidade da recorrência a métodos invasivos (amniocentese, amostragem das vilosidades coriônicas) para o diagnóstico, é de extrema importância desenvolver métodos de diagnósticos pré-natais não invasivos com maior sensibilidade que possam permitir, de forma rápida, o rastreio ou diagnóstico precoce e garantir o bem-estar da mãe e do feto. Os lípidos encontram-se associados ao desenvolvimento de várias patologias da gravidez, nomeadamente a diabetes gestacional, anomalias cromossômicas, malformações fetais, entre outros. A lipidômica, que se debruça sobre o estudo dos lípidos, constitui uma ferramenta analítica muito útil para a pesquisa de biomarcadores que possam ser indicadores de certas patologias. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar possíveis marcadores lipídicos presentes no plasma materno que possam ser indicativos de diabetes gestacional e trissomia 21. Numa primeira etapa foi feita a extração de amostras de plasma de mulheres saudáveis, utilizando cinco métodos de extração distintos, com o objetivo de escolher o melhor método, em termos de eficácia e reprodutibilidade, utilizando a espectroscopia de RMN. Numa segunda etapa, após a escolha do melhor método de extração, amostras de mulheres grávidas saudáveis, diagnosticadas com diabetes mellitus gestacional e com fetos afetados pela trissomia 21, no 1º e 2º trimestre de gravidez foram analisadas, utilizando ferramentas bioinformáticas (análise multivariada: PCA e PLS-DA), com o objetivo de estudar alterações na composição lipídica do plasma entre controlos e doenças. Os resultados revelaram que existem diferenças nos níveis lipídicos plasmáticos entre mulheres grávidas com diabetes mellitus gestacional e mulheres grávidas saudáveis, existindo uma maior variação nos glicérides. A análise da trissomia 21 revelou que mulheres com fetos afetados por trissomia 21 possuem níveis diminuídos de fosfolípidos, tanto no 1º como no 2º trimestre, em relação aos controlos.

Keywords Maternal plasma, prenatal diagnosis, pregnancy diseases, gestational diabetes, trisomy 21, lipidomics, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

Abstract Due to high incidence of prenatal diseases and complications that they can cause to both the mother and the fetus, it is extremely important to develop efficient methods for non-invasive prenatal diagnosis that may allow screening /early diagnosis and ensure the well-being of mother and fetus. The lipids are associated with the development of various pregnancy diseases such as diabetes mellitus, chromosomal abnormalities, fetal malformations among others. The lipidomics, which focuses on the study of lipids, is a very useful analytical tool for the detection of biomarkers that may be indicators of certain diseases. The objective of this study was to investigate possible lipid markers present in maternal plasma that may be indicative of gestational diabetes and trisomy 21. In the first stage of this work, the extraction of samples from healthy women using 5 methods of lipids extraction was carried in order to choose the best method, using NMR spectroscopy. In the second stage, after choosing the best method of extraction, samples from healthy pregnant women diagnosed with gestational diabetes mellitus and with fetuses affected by trisomy 21 (1st and 2nd trimester) of pregnancy were analyzed using bioinformatics tools (multivariate analysis: PCA and PLS-DA) to study changes in the lipid composition of the plasma between controls and disease. The findings revealed that there are differences in plasma lipid levels among pregnant women with gestational diabetes mellitus and healthy pregnant women with greater variation in the resonance of the glycerides. The analysis of trisomy 21 revealed that women with fetuses affected by trisomy 21 have decreased levels of phospholipids in both 1st and 2nd trimesters compared to controls.

Lista de abreviaturas e simbologia

γ	Constante giromagnética
μ	Momento magnético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Apo A1	Apolipoproteína A1
Apo B	Apolipoproteína B
CAT	Catalase
DMG	Diabetes mellitus gestacional
ES	"Effect Size" (Tamanho efeito)
FID	"Free induction decay"
GA	Algoritmos genéticos
GC	"Gas Chromatography" (Cromatografia gasosa)
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
HbA _{1c}	Hemoglobina A _{1c}
HCA	"Hierarchical cluster analysis" (Análise hierárquica de "clusters")
HDL	Lipoproteína de elevada densidade
HL	"Hepatic lipase" (Lipase hepática)
HPLC	"High Performance Liquid Chromatography" (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HSQC	"Heteronuclear Single Quantum Coherence"
I	Número de spin
IDL	Lipoproteína de densidade intermédia
IMC	Índice de massa corporal
iPLS	Mínimos quadrados parciais
J-res	"J-resolved"
LPL	Lipoproteína Lipase
m/z	Razão massa-carga
MCCV	"Monte Carlo Cross Validation" (Validação cruzada de Monte Carlo)
MeDiP	Imunoprecipitação do ADN metilado
MTBE	"Methyl- tert-butyl ether" (Éter metilo terc-butílico)
MS	Espectrometria de massa

OPLS	Orthogonal Partial Least-Squares (Mínimos quadrados parciais ortogonal)
OPLS-DA	“Orthogonal Partial Least-Squares – Discriminant Analysis” (Mínimos quadrados parciais ortogonais – Análise discriminativa)
P	Momento angular
PC	Componentes principais
PCA	“Principal Component Analysis” (Análise das componentes principais)
PCR	"Real time polymerase chain reaction" (Reação em cadeia da polimerase)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PLS	“Partial Least-Squares” (Mínimos quadrados parciais)
PLS-DA	“Partial Least-Squares – Discriminant Analysis” (Partial Least-Squares - Análise discriminativa)
PQN	“Probalistic quotient normalization”
RCIU	Restrição do crescimento intrauterino
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROC	"Receiver operator characteristic" (Caraterística operativa do operador)
RPM	Rutura prematura das membranas
RSPA	“Recursive segment-wise peak alignmment”
SNC	Sistema nervoso central
SOD1	Superóxido dismutase 1
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TLC	“Thin layer Chromatography” (Cromatografia de camada fina)
TOCSY	“Total Correlation Spectroscopy” (Espectroscopia de correlação total)
T21	Trissomia 21
VIP	"Variable importance in projection" (Importância das variáveis na projeção)
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	"World Health Organization" (Organização Mundial da Saúde)

1. Introdução

Devido à grande importância dos lípidos, não só ao nível celular, mas também ao nível do organismo, o metabolismo lipídico pode afetar ou ser afetado por vários processos celulares que encontram-se fortemente implicados no desenvolvimento de várias patologias como é o caso da diabetes mellitus (1,2) e do cancro (3–5). Nos capítulos que se seguem serão descritos os princípios do metabolismo lipídico e alterações dos lípidos e sua relação com gravidez saudável e doenças da gravidez, nomeadamente a diabetes mellitus gestacional e a trissomia 21.

1.1 Composição e transporte de lípidos no sangue e relação com doenças

1.1.1 Princípios do metabolismo lipídico

O sangue constitui cerca de 8% da massa corporal de um homem adulto e desempenha três funções principais (6). Uma das funções é o transporte de gases (CO_2 e O_2), nutrientes, hormonas e calor pelo corpo. A outra função consiste na proteção do organismo através do papel que as células que o constituem desempenham no processo de inflamação, atuando na destruição de microrganismos invasivos, na destruição de substâncias patogénicas e na minimização da perda de sangue através do processo de coagulação. Além das funções acima mencionadas existe ainda a função de regulação, que consiste no ajuste do pH através da interação com ácidos e bases e no balanço da água, transportando a água para dentro e fora dos tecidos.

O sangue pode ser dividido em duas componentes: o plasma (55%) e as células (45%), podendo estes últimos serem chamados de elementos figurados do sangue (eritrócitos ou glóbulos vermelhos, os leucócitos ou glóbulos brancos), e as plaquetas (6). O plasma é um fluido extracelular constituído por água (91,5%), proteínas, enzimas, nutrientes, produtos de excreção, hormonas e gases, e pode ser separado dos elementos figurados por centrifugação. Os glóbulos vermelhos, por serem mais densos do que os glóbulos brancos, plaquetas e plasma, formam uma camada no fundo do tubo de centrífuga. Os glóbulos brancos e as plaquetas, por sua vez, formam uma camada translúcida sobre os glóbulos vermelhos e por último o plasma, que forma uma camada sobre os glóbulos brancos e plaquetas.

Os lípidos constituem uma classe de moléculas insolúveis em água da qual fazem parte os ácidos gordos, os triglicéridos, os glicerofosfolípidos, os esfingolípidos e os esteróis.

Estes compostos desempenham papéis de extrema importância nos organismos vivos funcionando como lípidos de reserva de energia (ácidos gordos e triglicéridos) lípidos membranares (glicerofosfolípidos, esfingolípidos e esteróis), ou de sinalização, assumindo a função de mensageiros secundários e hormonas (7). As classes lipídicas acima mencionadas são transportadas no plasma por lipoproteínas plasmáticas, que são compostos que resultam de diferentes combinações entre apolipoproteínas, proteínas ligados a lípidos que atuam como sinais, levando as lipoproteínas a tecidos específicos ou na ativação de enzimas que atuam sobre as lipoproteínas, e lípidos. Como encontra-se ilustrado na Figura 1, as lipoproteínas consistem em partículas esféricas contendo lípidos hidrofóbicos no centro, cadeias laterais de proteínas hidrofílicas e cabeças lipídicas na superfície. Diferentes combinações entre lípidos e apolipoproteínas produzem partículas de densidades diferentes como os quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de elevada densidade (HDL), que diferem entre si na composição em proteína, fosfolípidos, colesterol e triglicéridos.

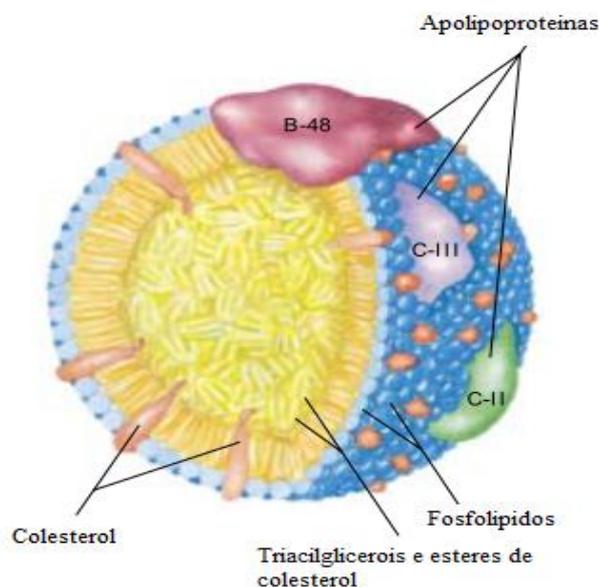


Figura 1. Estrutura molecular de um quilomicron (adaptado da referência 7).

Na Tabela 1 encontra-se representada a composição, em percentagem, de cada lipoproteína assim como a sua densidade, onde podemos observar que os quilomicrons são mais ricos em triglicéridos, assim como as lipoproteínas VLDL que apresenta maior quantidade de proteína fosfolípidos e colesterol que os quilomicrons, enquanto as

lipoproteínas LDL e HDL são mais ricas em ésteres de colesterol e proteínas, respetivamente.

Tabela 1. Composição das classes de lipoproteínas presentes no plasma (adaptado da referência 7).

Lipoproteína	Densidade (g/mL)	Composição (%)				
		Proteína	Fosfolípidos	Colesterol livre	Ésteres de colesterol	Triglicéridos
Quilomicrons	<1,006	2	9	1	3	85
VLDL	0,95-1,006	10	18	7	12	50
LDL	1,006-1,063	23	20	8	37	10
HDL	1,063-1,210	55	24	2	15	4

O transporte lipídico no sangue inclui uma via exógena e uma via endógena (8). A Figura 2 demonstra como ocorre o transporte dos lípidos no organismo. A via exógena inicia-se com a ingestão de lípidos provenientes da dieta, que são absorvidos no intestino dando origem a lipoproteínas ricas em triglicéridos, a que se dá o nome de quilomicrons (8). Esses quilomicrons sofrem posteriormente um processo de hidrólise nos vasos sanguíneos capilares de tecidos periféricos pela enzima lipoproteína lípase (LPL), levando à formação dos chamados quilomicrons remanescentes, que competem com as lipoproteínas VLDL de origem endógena pela LPL. O metabolismo lipídico endógeno começa com a produção das VLDL no fígado. As lipoproteínas VLDL são constituídas por duas frações, a VLDL1, que é secretada pelo fígado que fornece aos tecidos ácidos gordos de triglicéridos no estado após a absorção, e a VLDL2, que é o maior precursor das partículas transportadoras de colesterol, a lipoproteína de densidade intermédia (IDL) e a lipoproteína LDL (9). As lipoproteínas VLDL entram numa cascata lipolítica, onde são inicialmente processadas pela LPL e depois pela lípase hepática (HL) e convertidas em partículas de VLDL mais pequenas designadas por VLDL remanescentes ou IDL e em LDL que leva o colesterol para tecidos extra-hepáticos ou retorna ao fígado (7). Outra lipoproteína que também é produzida no fígado e no intestino delgado é a lipoproteína HDL que converte as partículas de colesterol, quilomicrons e VLDL remanescente em ésteres de colesterol necessários para a maturação de partículas de HDL. A lipoproteína HDL regressa posteriormente ao fígado onde descarrega as partículas de colesterol –

transporte reverso do colesterol (7). Existem duas subclasses da lipoproteína HDL, cuja classificação se baseia na diferença de densidade, HDL2 e HDL3 (10). A partícula HDL2 é maior e mais rica em lípidos do que a partícula HDL3, apresentando uma maior eficiência no transporte de lípidos para o fígado.

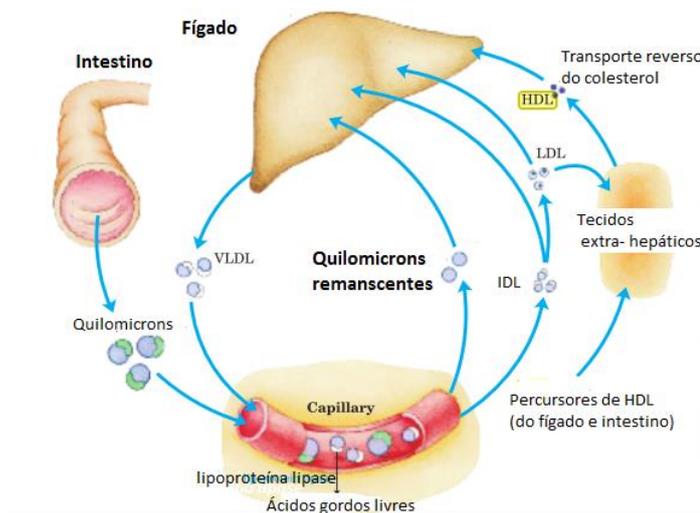


Figura 2. Transporte de lipoproteínas no organismo (adaptado da referência 7).

1.1.2 Alterações do metabolismo lipídico com a gravidez

A gravidez de evolução saudável encontra-se fortemente relacionada com adaptações metabólicas que englobam alterações nos níveis de glucose, alterações no metabolismo dos aminoácidos e proteínas e ainda no metabolismo dos lípidos (11). Uma gravidez normal caracteriza-se por um quadro hiperlipidémico onde há um aumento de todos os lípidos plasmáticos, principalmente dos triglicéridos (11). As concentrações plasmáticas de colesterol e triglicéridos sofrem um aumento de cerca de 25-50% e 200-400%, respetivamente (9). Durante o início da gravidez (primeiros dois trimestres) ocorrem inúmeras alterações no metabolismo lipídico que se manifestam através da acumulação de lípidos nos tecidos maternos e, mais tarde, no desenvolvimento de hiperlipidemia (12). O aumento dos teores de triglicéridos ocorre principalmente devido ao aumento de lipoproteínas ricas em triglicéridos (VLDL e quilomicrons) na circulação sanguínea, como consequência da diminuição da atividade da lipoproteína lipase, diminuição das lipoproteínas LDL e da “clearance” reduzida das VLDL (11–13). Para além do aumento dos triglicéridos, os níveis da lipoproteína HDL se encontram aumentados na 14ª semana de gravidez e aumentam 40% na 28ª semana de gestação (9). Este aumento deve-se às

concentrações da hormona estrogénio, que atua no fígado para promover a produção da apo A-I e simultaneamente a diminuição da atividade da lipase hepática. Os níveis da lipoproteína LDL sofrem também uma alteração, aumentando cerca de 70% (9). Depois do parto os valores dos lípidos plasmáticos voltam à normalidade. Os ácidos gordos voltam a valores normais num espaço de três dias após o parto, enquanto os valores dos triglicéridos normalizam após cerca de duas semanas. A diminuição dos níveis lipídicos do plasma materno depende do aleitamento materno após o nascimento (11).

1.1.3 Alterações do metabolismo lipídico com doenças da gravidez

Algumas doenças pré-natais encontram-se relacionadas com alterações no metabolismo dos lípidos (ex: diabetes mellitus gestacional (DMG), pré-eclampsia, trissomia 21 (T21)), podendo assim, a busca de biomarcadores lipídicos para estas patologias ser útil no diagnóstico precoce das mesmas. No capítulo que se segue serão descritos alguns estudos que avaliaram alterações do metabolismo dos lípidos em doenças da gravidez, nomeadamente a diabetes gestacional e a trissomia 21.

1.1.3.1 Diabetes Mellitus Gestacional

Na tentativa de estabelecer uma comparação entre os níveis lipídicos plasmáticos numa gravidez normal e numa gravidez com DMG, têm sido realizados alguns estudos que se dedicam à determinação de concentrações de lípidos, lipoproteínas, apolipoproteínas, hormonas e ainda da glucose. Pretende-se sobretudo com estes estudos comparar estas concentrações com mulheres grávidas saudáveis e perceber melhor as alterações que ocorrem no metabolismo lipídico de gravidezes afetadas pela DMG. Na Tabela 2 encontram-se sumarizados, por ordem cronológica, os estudos que serão abordados neste capítulo com a respetiva descrição dos objetivos, amostras e técnicas utilizadas.

Tabela 2. Estudos lipídicos realizados em mulheres que desenvolveram DMG. HPLC – cromatografia de alta eficiência; TLC – cromatografia de camada fina; GC – cromatografia gasosa.

Estudos	Objetivos	Amostras	Métodos
1996 (14)	Estudo das concentrações de colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas HDL e LDL, apolipoproteínas A1 e B e HbA _{1c} .	Sangue DMG-n=20 Controlos-n=22	Ensaio enzimático, imunoturbidimetria
1998 (15)	Estudo das concentrações de colesterol total, triglicéridos, ácidos gordos, lipoproteínas HDL, LDL e VLDL, as hormonas da gravidez progesterona, β-estradiol e estrogénios e o controlo da glucose.	Plasma e urina DMG-n=25 Controlos-n=25	Análise espectrofotométrica, transesterificação direta, precipitação com sulfato de dextrano, imunoprecipitação, radioensaio, HPLC
1999 (16)	Estudo de ácidos gordos polinsaturados presentes em fosfolípidos, insulina e HbA _{1c} .	Plasma DMG-n=15 Controlos-n=15	TLC, GC, Radioensaio, HPLC
2005 (17)	Estudo das concentrações de colesterol, triglicéridos e lipoproteínas HDL e LDL.	Plasma 851 mulheres	Ensaio enzimático, precipitação com sulfato de dextrano
2007 (18)	Estudo das concentrações do colesterol, triglicéridos, lipoproteína LDL, as hormonas estradiol e progesterona e a susceptibilidade de oxidação da lipoproteína LDL.	Plasma DMG-n=62 Controlos-n=45	Vitros auto analyzer, HPLC
2010 (19)	Estudo da adiponectina, no metabolismo dos carboidratos (glucose e insulina) e no metabolismo lipídico (colesterol, ácidos gordos, triglicéridos e lipoproteínas HDL e LDL) .	Plasma e soro DMG-n=12 Controlos-n=38	ELISA, método da glucose oxidase, radioensaio, ensaio enzimático, ultracentrifugação, métodos colorimétricos

No contexto de lipoproteínas podemos encontrar estudos realizados por Koukkou et al. e Couch et al.. O estudo realizado por Koukkou et al. consistiu na demonstração das diferenças de concentrações de lípidos, lipoproteínas e apolipoproteínas no soro entre mulheres saudáveis (controlos) e mulheres com DMG, no 3º trimestre de gravidez e 6-12 meses após terem dado à luz (14). O objetivo consistiu em compreender melhor as alterações que ocorrem no metabolismo lipídico de mulheres com DMG e envolveu dois

grupos, 20 mulheres com DMG e 22 mulheres saudáveis, divididos de acordo com a etnia, índice de massa corporal (IMC), peso, idade materna e idade gestacional. Recolheu-se amostras de sangue para determinação das concentrações de colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas HDL e LDL e apolipoproteínas A1 e B (apo A1 e B). Na Tabela 3 encontram-se representados os métodos utilizados para a determinação dos parâmetros acima mencionados.

Tabela 3. Métodos utilizados na realização do estudo (14).

Parâmetros determinados	Métodos
Colesterol Total	Ensaio enzimático
Triglicéridos	
HDL	Precipitação com sulfato de dextrano/cloreto de magnésio
LDL	Equação de Friedewald (LDL = Colesterol Total – HDL – Triglicéridos/5,0 (mg/dL))
Apolipoproteínas A1 e B	Imunoturbidimetria
HbA_{1c}	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os resultados destes ensaios indicaram que mulheres com DMG possuem níveis elevados de triglicéridos (2,92 mmol/l) e níveis baixos da lipoproteína LDL quando comparados com controlos (Tabela 4). Estas alterações são o resultado da resistência aumentada à insulina e do aumento da hormona estrogénio, visto que os estrogénios encontram-se envolvidos nas alterações do metabolismo glicolítico materno durante a gravidez, induzindo resistência a insulina (20). Não foram observadas quaisquer diferenças significativas entre os dois grupos para os níveis da lipoproteína HDL e das apolipoproteínas A1 e B. A razão LDL:Apo B foi significativamente mais baixa em mulheres com DMG, o que sugere que existe uma diferença na composição química das lipoproteínas LDL entre os dois grupos. As concentrações do colesterol total encontravam-se mais baixas nas grávidas com DMG, embora esta diferença de concentração não fosse significativa.

Tabela 4. Concentrações de lípidos, lipoproteínas e apolipoproteínas no soro de mulheres com DMG e mulheres saudáveis durante a gravidez (adaptado da referência 14).

	DMG (n=20)	Controlos (n=22)	p-value
Colesterol total (mmol/l)	6,23	6,71	0,25
Lipoproteína HDL (mmol/l)	1,71	1,72	0,97
Lipoproteína LDL (mmol/l)	3,08	4,01	<0,01
Triglicerídeos (mmol/l)	2,92	2,10	<0,05
Apo A1	1,93	1,88	0,61
Apo B	1,30	1,14	0,22
LDL:HDL	1,77	2,35	0,017
LDL:Apo B	0,94	1,19	<0,01

Este estudo possui algumas limitações como o facto de terem inferido que alterações nas lipoproteínas são o resultado de alterações na composição das mesmas, sem terem feito medições para determinação da composição química das lipoproteínas, de não terem avaliado os lípidos da dieta e de não terem determinado as concentrações de hormonas (insulina e estrogénio) e de ácidos gordos, para mostrar evidências do mecanismo responsável pelo metabolismo lipídico anormal (14).

Couch, et al. (15), complementaram o estudo de Koukkou et al, no sentido em que para além de descreverem as perturbações lipoproteicas presentes em gravidezes com DMG, avaliaram se essas perturbações estão relacionadas com hormonas da gravidez e/ou com o controlo da glucose. Este estudo envolveu dois grupos: o grupo de diabetes gestacional (n=25) e o grupo de mulheres saudáveis (controlos, n=25), ambos no 3º trimestre de gravidez, que foram distribuídas de acordo com a idade, raça e IMC. Todas as pacientes com DMG receberam um plano de refeições que segue as recomendações de uma gravidez normal e foram agendadas três consultas pré-natais (26-30 semanas, 33-34 semanas e 37-38 semanas). Em cada consulta, foram colhidas amostras de sangue e urina (determinação de cetonas). Uma vez que os macronutrientes podem alterar os níveis lipídicos plasmáticos (15), foi também avaliada a ingestão de calorias e de macronutrientes entre as 26-38 semanas de gestação (Tabela 5). Os resultados mostraram diferenças significativas entre os grupos na ingestão de proteínas e carboidratos. Grávidas com DMG consumiram significativamente mais proteínas e menos carboidratos do que as mulheres saudáveis, em todas as semanas de gestação em estudo.

Tabela 5. Ingestão de macronutrientes das 26-38 semanas de gestação em mulheres com DMG e mulheres saudáveis (adaptado da referência 15).

Semanas de gestação	Energia (Kcal/d)	Proteína (g/d)	Carboidratos (g/d)	Gordura total (g/d)	Gordura saturada (g/d)	Gordura polinsaturada (g/d)	Colesterol (mg/d)
Controlos							
26-30	2132±981	84±25	275±104	79±50	28±14	15±12	259±104
33-34	2152±546	86±28	280±71	81±38	30±15	16±13	265±173
37-38	2334±971	81±28	204±177	93±75	35±25	16±14	291±248
DMG							
26-30	1836±531	94±31	196±68	78±25	30±14	13±7	286±143
33-34	2034±481	104±35	219±58	86±27	30±11	16±9	340±214
37-38	2072±726	102±25	223±91	89±42	32±15	16±8	373±194

Para realização deste estudo foram determinados os níveis de colesterol total, triglicéridos, ácidos gordos, lipoproteína HDL e as suas subfrações HDL2 e HDL3, lipoproteína LDL, triglicérideos da lipoproteína VLDL (VLDL TG), as hormonas prolactina, estrogénio (β -estradiol) e progesterona, e a hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) (Tabela 6).

Tabela 6. Métodos utilizados na realização do estudo (15)

Parâmetros determinados	Métodos
Colesterol Total	Análise espectrofotométrica
Triglicéridos	
Ácidos gordos	
HDL, HDL2 e HDL3	Precipitação com sulfato de dextrano
LDL	Imunoprecipitação
VLDL TG	HDL – Triglicéridos e LDL TG - Colesterol
Prolactina	Radioimunoensaio
B-estradiol	
Progesterona	
HbA_{1c}	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os resultados mostraram que as concentrações de ácidos gordos, triglicéridos plasmáticos e triglicérideos presentes em cada fração das lipoproteínas aumentaram significativamente, nos dois grupos, com o avançar da gravidez, apresentando concentrações mais elevadas (Tabela 7) para o grupo de DMG, em todas as semanas gestacionais. O aumento dos níveis de triglicéridos deveu-se ao aumento da lipoproteína VLDL (Tabela 7). As concentrações de colesterol aumentaram com o decorrer da gravidez

e mostram-se mais elevados nos controlos em todas as semanas de estudo. As concentrações de HDL 2 e HDL3 foram significativamente mais elevadas no grupo de diabetes gestacional em comparação com os controlos. Os níveis da lipoproteína LDL encontravam-se aumentados nos controlos, com uma pequena diminuição nas 33-34 semanas de gravidez. As concentrações plasmáticas da prolactina, estrogénio e de progesterona aumentaram significativamente com o tempo de gestação, com níveis mais elevados nas mulheres com DMG. As perturbações existentes nestas três hormonas podem ser características da DMG, afetando o metabolismo dos triglicédeos presentes nas lipoproteínas durante gravidez. O estrogénio aumenta a produção endógena dos triglicédeos da lipoproteína VLDL, reduz a atividade da lipoproteína lipase do tecido adiposo e inibe a atividade da lipase hepática, fazendo com que haja um aumento dos triglicédeos da lipoproteína VLDL (15). A interação entre estrogénio e progesterona favorece a hipertrigliceridemia. A prolactina inibe a lipoproteína lipase do tecido adiposo enquanto estimula a lipoproteína lipase do tecido mamário no final da gestação. Isto faz com que haja um aumento dos lípidos circulantes, ácidos gordos livres e triglicédeos, devido a deslocação do armazenamento dos triglicédeos dos adipócitos para o peito na preparação para a lactação (15). As concentrações de HbA_{1c} aumentaram linearmente nas últimas 10 semanas de gravidez e as mulheres com diabetes gestacional possuíam níveis mais elevados em comparação com os controlos.

Tabela 7. Concentrações de lípidos, lipoproteínas, hormonas e hemoglobina A_{1c} plasmáticos (média ± desvio padrão mg/dL) das 26 às 38 semanas de gravidez em mulheres com e sem diabetes gestacional. NA – Dados não analisados. (adaptado da referência 15)

Compostos analisados	Controlos			Diabetes Gestacional		
	26-30 semanas (mg/dL)	33-34 semanas (mg/dL)	37-38 semanas (mg/dL)	26-30 semanas (mg/dL)	33-34 semanas (mg/dL)	37-38 semanas (mg/dL)
Triglicerídeos	136,2±40,8	166,6±42,1	173,0±48,0	180,8±45,3	232,4±77,1	240,3±70,2
Colesterol	215,6±48,4	221,7±63,8	227,3±69,8	198,4±38,7	205,7±44,0	215,7±44,3
Ácidos gordos	47,3±11,0	NA	59,4±19,1	48,9±19,2	NA	64,4±24,7
Lipoproteína HDL	70,7±19,8	70,1±16,9	70,8±20,0	69,7±18,4	68,2±15,2	67,2±17,6
Lipoproteína HDL2	29,8±11,1	30,7±10,5	27,0±11,6	32,9±18,6	30,5±17,2	29,5±26,0
Lipoproteína HDL3	40,8±17,7	39,4±19,1	42,9±16,7	38,3±14,9	40,8±16,5	42,8±16,9
Lipoproteína LDL	90,9±27,8	90,1±34,7	98,9±45,1	82,1±15,4	77,4±20,4	92,6±42,4
Lipoproteína VLDL	56,2±33,1	64,3±59,8	64,6±42,6	45,5±34,9	55,4±26,2	52,1±32,1
Progesterona	132,2±46,6	174,±53,8	224,0±93,9	151,7±63,9	231,7±89,4	333,5±105,9
Estrogénio (β-estradiol)	10,0±3,4	15,2±5,9	17,9±5,6	10,2±2,7	15,8±4,7	19,7±4,2
Prolactina	114,1±38,5	134,9±45,0	156,2±45,9	124,8±38,9	155,8±48,5	184,1±41,0
Hemoglobina A_{1c}	4,56±0,34	4,63±0,28	4,77±0,37	4,98±0,48	4,97±0,52	5,05±0,49

Wijendran et al. (16) dedicaram-se ao estudo de ácidos gordos polinsaturados nomeadamente o ácido araquidónico e o ácido docosahexaenoico, presentes em fosfolípidos plasmáticos de mulheres grávidas recebendo terapia dietética. Para além da determinação dos ácidos gordos, foram também identificados os fatores maternos (dieta) envolvidos com concentrações do ácido araquidónico e docosahexaenoico presentes nos fosfolípidos plasmáticos, no 3º trimestre de gravidez. Fizeram parte deste estudo 15 mulheres (idade materna média =32,13±3,25) com DMG e 15 mulheres grávidas saudáveis (idade materna média =29,33±3,99). Foram agendadas três consultas pré-natais durante o 3º trimestre de gravidez (27-30 semanas, 33-35 semanas e 36-39 semanas). As recomendações dietéticas seguiram as da Associação Americana da Diabetes para uma gravidez normal: 45% de carboidratos diariamente, 22% de proteína e 33% de gordura divididas entre três refeições e três lanches ao longo do dia. Em cada consulta foram

determinadas as concentrações plasmáticas de ácidos gordos presentes em fosfolípidos, da insulina, da hemoglobina A_{1c}. Para a determinação da concentração dos ácidos gordos fez-se extração dos lípidos do plasma utilizando um método de Folch modificado seguida de separação por TLC e GC. As concentrações de insulina foram determinadas por radioimunoensaio e a hemoglobina A_{1c} foi determinada por HPLC. Os resultados mostraram que para todos os ácidos gordos o efeito do tempo de gestação não foi significativo entre os dois grupos. Para o grupo das mulheres saudáveis houve um efeito significativo do tempo de gestação para os ácidos gordos polinsaturados n-6 de cadeia longa (20:3, 24:4 e 22:4) que diminuíram significativamente das 27-30 para 36-39 semanas de gestação. Foram encontradas diferenças significativas nos ácidos gordos n-3 entre o grupo controlo e o grupo de diabetes gestacional. O ácido linolénico, apresentou valores significativamente baixos em mulheres com DMG, enquanto o ácido docosahexaenoico, 22:6n-3, apresentou valores significativamente elevados em mulheres com DMG, em comparação com controlos. Os ácidos gordos saturados 12:0, em todas as fases de gestação, e 16:0 nas 27-30 semanas e 33-35 semanas de gestação, apresentaram valores 33% e 5,1% mais elevados, respetivamente, nas mulheres com DMG. Os ácidos gordos monosaturados 16:1n-7 e 18:1n-9 apresentavam valores 21,1% e 11,3%, respetivamente, mais baixos nas mulheres com DMG, em relação aos controlos. Os fatores maternos relacionados com as concentrações do ácido araquidónico e do ácido docosahexaenoico presentes nos fosfolípidos plasmáticos foram avaliados de acordo com a dieta dos grupos em estudo (Tabela 8).

Tabela 8. Ingestão dietética média estimada em indivíduos do grupo controlo e em mulheres com DMG durante o terceiro trimestre (adaptado da referência 16)

Parâmetros determinados	Controlos (n=15)	DMG (n=15)
Energia (MJ)	8,23±1,23	7,55±1,54
Carboidratos (g/d)	257,26±41,82	191,47±52,15
Proteínas (g/d)	79,35±19,10	92,78±19,62
Gordura (g/d)	73,44±20,09	77,90±18,78
Ácidos gordos saturados totais (g/d)	28,98±29,72	29,72±8,56
Ácidos gordos monosaturados totais (g/d)	26,97±7,95	28,76±7,01

Analisando a Tabela 8 podemos verificar que a ingestão de macronutrientes diferiu significativamente entre mulheres com DMG e controlos. À semelhança do estudo realizado por Couch et al., mulheres com DMG ingeriram maior quantidade de proteínas

quando comparados com carboidratos. É também de notar que mulheres com DMG ingeriram maior quantidade de ácido araquidônico e docosahexaenoico do que os controles. Não foram observadas associações significativas entre a ingestão de ácidos gordos e os níveis de ácidos gordos dos fosfolípidos maternos em ambos os grupos durante o 3º trimestre de gravidez, embora associações positivas foram observadas nas 27-30 semanas de gestação em amostras controles. Foi também estabelecido uma relação entre Hb A_{1c} e a insulina com os fosfolípidos plasmáticos. Os valores médios de Hb A_{1c} e insulina maternos mostraram ser fatores significantes que encontram-se relacionados com o valor médio do ácido araquidônico plasmático, durante o 3º trimestre de gestação, apresentando uma relação positiva em mulheres com diabetes gestacional.

Enquobahrie et al. e Paradasi et al. desenvolveram estudos de previsão onde avaliaram a relação entre os níveis lipídicos do plasma e o risco de desenvolvimento de DMG. O estudo realizado por Enquobahrie et al. teve como objetivo perceber se os níveis de lípidos plasmáticos maternos, no início da gravidez e antes do diagnóstico de DMG, se encontram elevados em mulheres que posteriormente desenvolveram diabetes gestacional (17). Este estudo envolveu um elevado número de amostras (n=851; 47 mulheres que desenvolveram diabetes gestacional e 804 mulheres que não desenvolveram) de mulheres de raça branca que foram recrutadas antes da 16ª semana de gravidez e seguidas até o parto. As concentrações plasmáticas de colesterol e triglicéridos foram determinadas por ensaios enzimáticos. A determinação das lipoproteínas HDL e LDL foi realizada por precipitação com sulfato de dextrano. Os resultados mostraram que o risco de desenvolvimento de DMG não se encontra significativamente associado com o aumento das concentrações plasmáticas de colesterol total, lipoproteína LDL ou lipoproteína HDL. Porém, foram observadas evidências de que existe uma associação entre o risco de diabetes gestacional e a razão LDL/HDL. Mulheres com níveis elevados de triglicéridos (≥ 137 mg/dL) apresentaram um risco aumentado (6 vezes) de desenvolvimento de DMG, em comparação com mulheres com níveis baixos de triglicéridos (< 96 mg/dL). Foi também avaliado a relação entre as concentrações de triglicéridos plasmáticos com o risco de diabetes gestacional onde os resultados mostraram que, para cada aumento de 20 mg/dL na concentração de triglicéridos plasmáticos há um aumento de 10% do risco de desenvolvimento de diabetes gestacional. Paradasi, et al. avaliaram em mulheres grávidas com um risco elevado de desenvolverem DMG, as alterações longitudinais da adiponectina

(proteína secretada no tecido adiposo e que desempenha papéis importantes na regulação do metabolismo dos lípidos e carboidratos), do metabolismo lipídico e dos carboidratos (19). Deste estudo fizeram parte 50 mulheres de raça branca, das quais 12 desenvolveram DMG. Cada mulher foi avaliada no 1º (8-11 semanas), 2º (23-25 semanas) e 3º (33-36 semanas) trimestres da gravidez, onde foi registado a pressão sanguínea, o peso e os níveis plasmáticos de adiponectina e lípidos. Os métodos utilizados neste estudo encontram-se listados na Tabela 9. De acordo com os resultados, o IMC revelou ser mais baixo no grupo dos controlos do que no grupo de diabetes gestacional em todos os trimestres de gravidez. Os níveis de glucose foram significativamente mais baixos no 2º e 3º trimestres de gravidez para grupo dos controlos. Os níveis de insulina foram significativamente mais baixos no 1º e 2º trimestres quando comparados com o 3º trimestre, para ambos os grupos. Os níveis de triglicéridos, colesterol total, lipoproteína LDL e ácidos gordos livres aumentaram significativamente ao longo dos trimestres, apresentando valores mais elevados para o grupo de DMG. A lipoproteína HDL aumentou significativamente ao longo dos trimestres para o grupo controlo, enquanto no grupo de diabetes DMG houve aumento no 2º trimestre mas não no terceiro. Mulheres com DMG apresentavam menores níveis de lipoproteína HDL do que as mulheres com tolerância normal a glucose. Os níveis de adiponectina diminuíram no decorrer dos trimestres nos dois grupos, apresentando valores semelhantes em ambos. Em conclusão, estes resultados mostraram que os níveis de adiponectina em mulheres com um elevado risco de desenvolverem DMG são caracterizados por uma constante redução ao longo da gestação; mulheres que desenvolveram DMG possuem níveis de adiponectina semelhantes aos controlos; e os níveis de glucose triglicéridos e IMC podem funcionar como indicadores de previsão independentes, para a diabetes gestacional.

Tabela 9. Métodos utilizados na realização do estudo (19).

Parâmetros determinados	Métodos
Adiponectina	ELISA
Glucose	Glucose oxidase
Insulina	Radioimunoensaio
Colesterol total	Ensaio enzimático
Triglicéridos	
HDL	Precipitação com glicol polietileno
LDL	Ultracentrifugação
Ácidos gordos	Método colorimétrico baseado na acil-coenzima A oxidase

Uma vez que a oxidação da lipoproteína LDL é um processo que pode causar danos na placenta levando restrição do crescimento intrauterino e a morte do feto, encontrando-se aumentado em gravidezes complicadas por DMG devido a dislipidemia e a hiperglicemia, Sanchez-Vera et al. desenvolveram um estudo em que, para além de determinar se mulheres com diabetes gestacional possuem níveis de lípidos plasmáticos elevados, avaliou também a susceptibilidade de oxidação da lipoproteína LDL no decorrer da gravidez (18). Num grupo constituído por 62 mulheres com DMG e 45 mulheres saudáveis (controlos), acompanhadas durante os três trimestres de gravidez (15^a, 24^a e 32^a semanas de gravidez), foram determinadas as concentrações da lipoproteína LDL, colesterol e triglicéridos por ensaios enzimáticos, hormonas da gravidez, estradiol e progesterona utilizando o Vitros Auto Analyser e a vitamina E por HPLC. Este estudo foi dividido em duas etapas. A 1^a etapa foi feita com todas as mulheres incluídas no estudo e a 2^a etapa consistiu na divisão das mulheres em dois subgrupos de acordo com o IMC antes da gravidez, mulheres com $IMC \leq 25 \text{ kg/m}^2$ e mulheres com $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (mulheres obesas). Em ambos os grupos, os níveis plasmáticos de colesterol e triglicéridos aumentaram com o decorrer da gravidez, embora com menor extensão no grupo das mulheres obesas. Na 15^a semana de gravidez, os níveis plasmáticos de colesterol e triglicéridos apresentavam valores mais elevados em mulheres com diabetes gestacional do que nas mulheres saudáveis. Não foram observadas diferenças, no decorrer da gravidez, nos níveis plasmáticos de vitamina E, estradiol e progesterona entre os dois grupos, tanto na 1^a como na 2^a etapa do estudo. A lipoproteína LDL foi submetida a oxidação e a fase lag foi estimada como sendo o tempo de incubação correspondente à intersecção de duas linhas desenhadas a partir das alterações na densidade óptica: uma que corresponde à utilização de antioxidantes endógenos e a outra que corresponde para a fase de propagação da oxidação de LDL. A fase lag foi expressa como minutos após a adição de CuCl_2 e o declive foi determinado por regressão linear e expresso como micromoles de dienos conjugados gerados por minuto. Na Figura 3 encontram-se representados três gráficos (cada um correspondente a uma fase do estudo, antes e após divisão em grupos tendo em conta ao IMC), em que cada barra corresponde a fase lag da formação de dienos conjugados da oxidação da lipoproteína LDL.

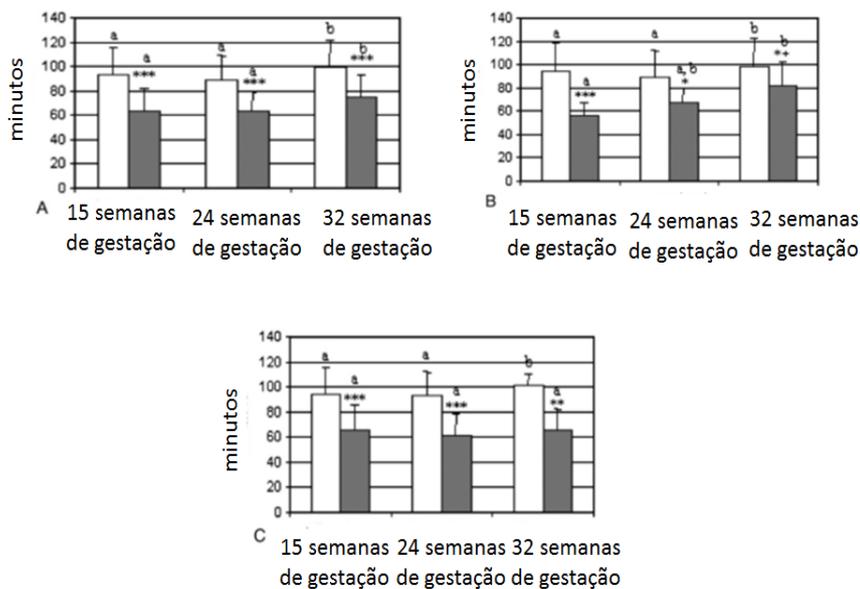


Figura 3. Fase lag na oxidação da lipoproteína LDL em mulheres saudáveis (colunas brancas) e mulheres com diabetes gestacional (colunas pretas). (A), todas as mulheres incluídas no estudo, independentemente do IMC (43-45 mulheres do grupo controlo e 26-31 mulheres do grupo diabetes gestacional). (B), inclui mulheres com um IMC $\leq 25 \text{ kg/m}^2$ (28-30 mulheres do grupo controlo e 8-14 mulheres do grupo diabetes gestacional). (C), inclui mulheres com um IMC $> 25 \text{ kg/m}^2$ (10 mulheres do grupo controlo e 14-20 mulheres do grupo diabetes gestacional). (adaptado da referência 18)

A fase lag na formação de dienos conjugados foi menor no grupo de mulheres com DMG do que nos controlos antes e após a divisão em grupos, apresentando um aumento na 32ª semana de gravidez. Porém, quando foi feita a divisão de acordo com o IMC, não foi observado um aumento da fase lag na 32ª semana para o grupo de mulheres obesas com DMG, sugerindo que em mulheres com DMG, a obesidade atenua a diminuição da susceptibilidade de oxidação da lipoproteína LDL que é observada no final da gestação em gravidezes normais. Uma vez que a susceptibilidade de oxidação pode ser afetada pelos níveis plasmáticos de colesterol, triglicéridos, vitamina E, progesterona, estradiol, obesidade e a idade gestacional, foi feita uma análise por regressão linear múltipla com estes parâmetros. Os resultados revelaram que a fase lag está negativamente relacionada com o colesterol e o IMC, e positivamente relacionada com a idade gestacional e vitamina E. Isto é, o colesterol e o IMC antes da gravidez aumentam a susceptibilidade de oxidação da lipoproteína LDL, o que já era de esperar, uma vez que a hipercolesterolemia e a

obesidade encontram-se associadas com a susceptibilidade aumentada da lipoproteína LDL e stress oxidativo, respetivamente. Por outro lado, a idade gestacional e vitamina E atuam prevenindo a oxidação da lipoproteína LDL, o que significa que a medida que a idade gestacional avança ocorre uma diminuição na susceptibilidade de oxidação da lipoproteína LDL

1.1.3.2 Trissomia 21

Na Tabela 10 encontram-se sumarizados os estudos de lípidos em pacientes com T21, utilizados para a construção deste capítulo.

Tabela 10. Estudos lipídicos realizados em indivíduos com T21

Estudos	Objetivos	Tipo de amostra	Métodos
1997 (21)	Estudo das concentrações do colesterol, triglicéridos, lipoproteínas HDL e LDL e apolipoproteínas A e B.	Sangue fetal T21 – n=18 T18 – n=7 Controlos - nº igual de controlos para cada caso	Ensaio enzimáticos
1998 (22)	Estudo das concentrações de enzimas antioxidantes superóxido dismutase 1 (SOD1), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT), a glutatona redutase (GR)) e também do α -tocoferol.	Eritrócitos T21 – n=72 Controlos – n=72	Ensaio enzimáticos, HPLC, TLC, GLC.
1998 (23)	Estudo das concentrações de 8 -hidroxi-2'-deoxiguanosina, malondialdeído e da creatinina.	Urina T21 – n=85 Controlos – n=81	HPLC
2000 (24)	Estudo de concentrações de fosfolípidos no cérebro.	Cérebro T21 – n=8 Controlos – n=9	Extração lipídica, TLC, HPLC
2007 (25)	Estudo dos níveis de malondialdeído e produtos finais da peroxidação lipídica.	Sangue T21 – n=100 Controlos – n=100	HPLC
2012 (26)	Estudo das concentrações do colesterol total, triglicéridos e lipoproteínas HDL e LDL.	Sangue T1 – n=27 Controlos - n=31	Métodos colorimétricos Espectrofotometria

Com o objetivo de estudar as alterações lipídicas no sangue de pacientes com T21 Boconni, et al. e Adelekan et al. desenvolveram estudos onde determinaram concentrações de lípidos e lipoproteínas. O estudo realizado por Boconni et al. incluiu 7 fetos com trissomia 18 e 18 fetos com trissomia 21, previamente diagnosticados por ultrassonografias (as 29 semanas de gravidez para casos de trissomia 21 e 24 semanas para casos de trissomia 18) e pela recolha do sangue fetal por amniocentese (21). Para construção do grupo controlo foi selecionado de uma base de dados contendo 157 fetos normais, um feto controlo para cada feto trissómico, com a mesma idade gestacional e tamanho. Neste estudo determinou-se concentrações do colesterol, triglicéridos, lipoproteínas HDL e LDL e apolipoproteínas A e B. A determinação do colesterol e dos triglicéridos foi feita, em todos os fetos, utilizando ensaios enzimáticos. As concentrações da lipoproteína HDL e das apolipoproteínas A e B foram determinadas utilizando ensaios enzimáticos e uma técnica nefelométrica (técnica analítica baseada na comparação da intensidade da luz dispersada pela amostra com a intensidade da luz dispersada por uma suspensão de referência) (10), respetivamente, em 8 fetos com trissomia 21 e 4 com trissomia 18 e um número equivalente de controlos. As concentrações da lipoproteína LDL foram calculadas pela seguinte expressão: $\text{Colesterol} - (\text{HDL} + \text{Triglicéridos} \times 0,16)$. Para além do sangue fetal, foi também feita a recolha do sangue materno em 15 mulheres com fetos com trissomia 21 para ensaios de colesterol e triglicéridos. Os resultados mostraram que em fetos com trissomia 21 as concentrações do colesterol e da apolipoproteína A eram significativamente mais elevadas do que nos controlos. Embora os resultados tenham apresentado uma tendência de aumento das concentrações da apolipoproteína A e do colesterol com o aumento da gestação, em controlos e fetos com trissomia 21, este aumento não foi significativo. Para mães de fetos com trissomia 21 os níveis de colesterol e triglicéridos apresentavam valores normais. Para avaliar a capacidade do colesterol identificar corretamente os pacientes com trissomia 21, a sensibilidade, assim como a capacidade de identificar corretamente os controlos, a especificidade, foi construída uma curva ROC (“receiver-operator curve”), utilizando um grupo de 175 fetos (157 controlos e 18 fetos com trissomia 21). A Figura 4 representa uma curva ROC que expressa a relação entre a sensibilidade e especificidade de vários níveis de colesterol na identificação dos fetos controlos e dos fetos com trissomia 21. A sensibilidade e especificidade foram de 72% e 95%, respetivamente, para níveis de colesterol ≥ 85 mg/dl.

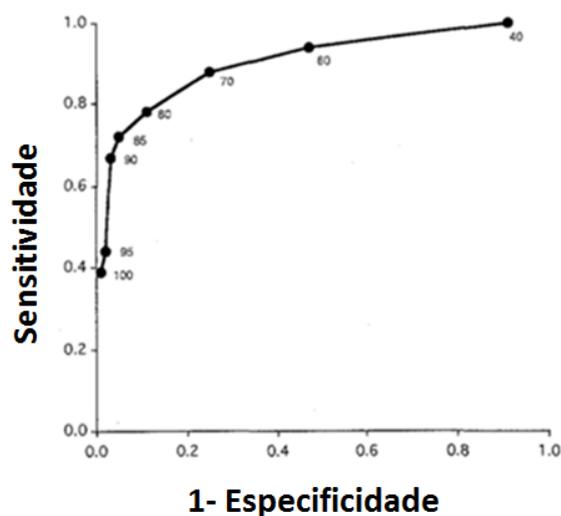


Figura 4. Relação entre a sensibilidade e especificidade de vários níveis de colesterol fetal (mg/dL) na identificação de fetos com trissomia 21. (adaptado da referência 21)

Adelekan et al. estudaram as alterações lipídicas em pacientes com T21 comparativamente aos seus respectivos irmãos saudáveis (26), utilizando grupos com idades mais avançadas em relação ao estudo realizado por Boconni et al.. Neste estudo foram recrutadas crianças entre os 7 e 10 anos de idade, em que 27 crianças faziam parte do grupo de trissomia 21 e 31 crianças pertenciam ao grupo controle. O IMC foi calculado e amostras de sangue foram recolhidas para determinar os níveis de colesterol total, triglicéridos, lipoproteína HDL e lipoproteína LDL. O colesterol total e triglicéridos foram determinados pelo método colorimétrico. A lipoproteína HDL foi determinada por espectrofotometria e a lipoproteína LDL pela equação de Friedewald ($LDL = \text{Colesterol Total} - HDL - \text{Triglicéridos}/5.0$ (mg/dL)). À semelhança dos resultados obtidos por Boconni et al., crianças com trissomia 21 possuem níveis elevados de colesterol total, triglicéridos e lipoproteína LDL e níveis baixos de lipoproteína HDL, em comparação com o grupo controle.

Uma vez que o aumento do stress oxidativo em pacientes com trissomia 21 pode levar a efeitos adversos nas membranas celulares através da oxidação dos ácidos gordos polinsaturados, Pastor et al., Jovanovic et al. e Casado et al., desenvolveram estudos onde avaliam o sistema antioxidante de pacientes com trissomia 21. O estudo realizado por Pastor et al. teve como objetivo avaliar a proteção dos glóbulos vermelhos contra o stress oxidativo, em 72 pacientes com trissomia 21 comparando-os com 72 controlos (22). Para

isso, determinou-se por ensaios enzimáticos as concentrações de enzimas antioxidantes que atuam como um sistema de defesa primário contra o stress oxidativo (superóxido dismutase 1 (SOD1) (enzima antioxidante codificada no cromossoma 21), a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a glutathione reductase (GR)) e por HPLC os níveis do α -tocoferol. Os pacientes foram divididos em três subgrupos de acordo com a idade: subgrupo 1, 1-9 anos de idade (n=29), subgrupo 2, 10-19 anos de idade (n=19) e subgrupo 3, 20-50 anos de idade (n=24). Os resultados mostraram um aumento significativo da atividade catalítica de 37% em SOD1, 8,4% em GPx, 37,4% em GR e 24,3% em CAT, no grupo de trissomia 21 quando comparados com controlos (22). Os níveis aumentados de SOD1, que devem-se ao excesso de informação genética, levam a produção excessiva de H_2O_2 , induzindo assim o aumento da atividade catalítica de CAT e GPx. Na análise dos dados de acordo com a idade dos pacientes, observou-se que a atividade catalítica de SOD1 e GR diminuiu com a idade, sendo significativamente mais elevada nos pacientes mais novos, em ambos os grupos, enquanto a atividade GPx aumentou com a idade. Este aumento pode dever-se ao aumento da formação de peróxidos durante o processo de envelhecimento (22). Não foram observadas diferenças na atividade catalítica de CAT entre os diferentes subgrupos. A diminuição da atividade de SOD1 com a idade pode ser devido a inativação da enzima causada pelo envelhecimento. Os resultados obtidos na análise do α -tocoferol não mostraram qualquer diferença entre os dois grupos mesmo quando a análise foi feita de acordo com a idade. Este resultado pode ser devido ao efeito compensatório do sistema das enzimas antioxidantes (CAT, GPx e GR), que evita o consumo de α -tocoferol (22). Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo mostram que o aumento da atividade de SOD1 nos glóbulos vermelhos de pacientes com trissomia 21 está associado a um aumento adaptativo das enzimas GPx e CT o que sugere que danos nos glóbulos vermelhos podem ser prevenidos e caso aconteça pode não afetar a composição dos ácidos gordos das membranas.

Jovanovic et al., dedicaram-se ao estudo do papel do stress oxidativo em pacientes com trissomia 21 comparando-os com os seus respetivos irmãos saudáveis (23). Assim sendo, amostras de urina de 166 indivíduos, em que 85 correspondiam a pacientes com trissomia 21 e 81 correspondiam aos irmãos saudáveis, foram analisadas para determinação dos níveis de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, um biomarcador de dano oxidativo ao DNA, e malondialdeído, um biomarcador de peroxidação lipídica. Para a determinação do 8-

hidroxi-2'-deoxiguanosina foi utilizado o HPLC, enquanto a determinação do malondialdeído foi feita utilizando um teste conhecido como teste do ácido tiobarbitúrico (teste TBA). Os níveis de creatinina foram também determinados de acordo com método espectrofotométrico de Jaffe, que consiste na formação de um produto vermelho, resultante da reação entre a creatinina e o ácido pícrico, que é determinado através da medição da absorvância a 500 nm. Os resultados mostraram que esses biomarcadores apresentavam níveis mais elevados nos pacientes com trissomia 21, com valores significativamente diferentes dos controlos. A Figura 5 representa os níveis urinários de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (A) e de malondialdeído (B). Os níveis elevados destes biomarcadores do stress oxidativo indicam que existe uma taxa aumentada de stress oxidativo nos pacientes de trissomia 21. Foi também observado uma forte correlação entre o 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina e o malondialdeído, levando a crer que o dano oxidativo teve a mesma origem. A influência da dieta na medição dos biomarcadores do stress oxidativo foi também avaliada, mostrando os resultados que não existem correlações significativas entre os biomarcadores e a dieta.

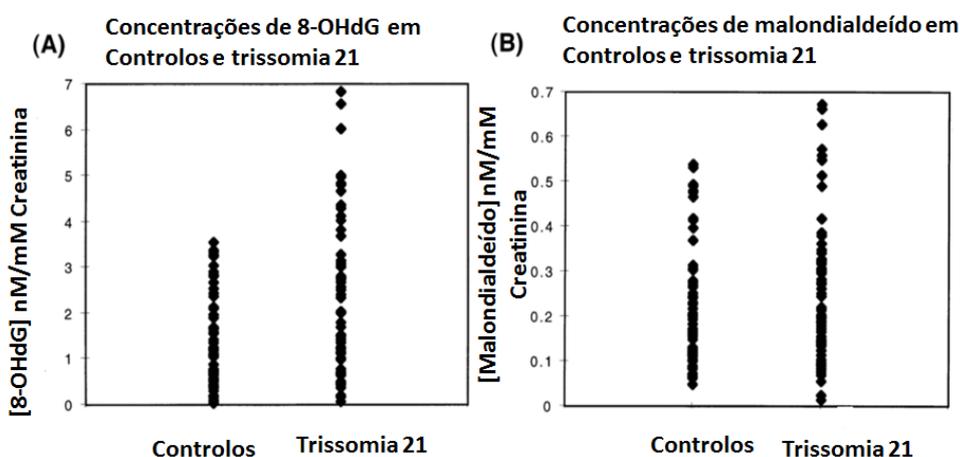


Figura 5. Comparação entre os valores de concentração de 8-OHdG (A) e malondialdeído (B) entre controlos e pacientes com trissomia 21 (adaptado de (23)).

Casado et al. desenvolveram um estudo onde investiga os níveis do malondialdeído em pacientes com diferentes tipos de trissomia 21: trissomia 21 regular, trissomia 21 causada por translocação e trissomia 21mosaico (25). Este estudo envolveu 100 indivíduos com trissomia 21 (34 indivíduos do sexo masculino e 66 do sexo feminino) com idades compreendidas entre 0 e 29 anos. Para confirmação do diagnóstico foi realizado testes

citogénicos que revelaram 90 indivíduos com trissomia 21 regular, 4 com trissomia 21 causada por translocação e 6 com trissomia 21 mosaico. O grupo controlo envolveu 100 indivíduos saudáveis (40 do sexo masculino e 60 do sexo feminino), com idades correspondentes ao grupo de trissomia 21. Os dois grupos foram divididos em 6 grupos de acordo com a idade: grupo 1, 0-1 ano (n=20), grupo 2, 2-4 anos (n=20), grupo 3, 5-9 anos (n=18), grupo 4, 10-14 anos (n=15), grupo 5, 15-19 anos (n=15), grupo 6, 20-29 anos (n=12). A determinação do malondialdeído foi feita em eritrócitos por HPLC e os resultados revelaram que os níveis de malondialdeído foram significativamente mais elevados no grupo com trissomia 21 regular em comparação com os controlos, em todas as idades, aumentando com a idade. Estes resultados mostram que a peroxidação lipídica aumenta com o processo de envelhecimento, estando também de acordo com os resultados do estudo realizado por Pastor et al.. Nos indivíduos com trissomia 21 mosaico os resultados mostram que os níveis de malondialdeído dependem da percentagem de distribuição entre as linhagens celulares diploides e trissómicas, isto é, quando maior a percentagem de células diploides menor serão os níveis de malondialdeído nos eritrócitos, o que pode contribuir para diminuição do stress oxidativo. Em indivíduos com trissomia 21 causado por translocação os níveis de malondialdeído dos eritrócitos são semelhantes os níveis dos indivíduos com trissomia 21 regular.

Um estudo fosfolipídico foi realizado por Murphy et al com o objetivo de perceber o metabolismo lipídico no cérebro de pacientes com trissomia 21 (24). Neste estudo foram determinadas concentrações de fosfolípidos presentes no córtex frontal e cerebelo de 17 indivíduos, 9 controlos e 8 pacientes com trissomia 21, com idades compreendidas entre os 22 e 87 anos. As medições de fosfolípidos foram feitas utilizando um método de extração de lípidos com clorofórmio e metanol, seguida da separação dos fosfolípidos por TLC. Os resultados mostraram que os níveis de fosfolípidos totais do córtex frontal foram de 495 ± 44 nmol/mg de proteína e 667 ± 67 nmol/mg de proteína para pacientes com trissomia 21 e controlos, respetivamente, com uma diminuição significativa de 27% em pacientes com trissomia 21 relativamente aos controlos. Os níveis totais de fosfolípidos do cerebelo apresentaram uma redução significativa de 20%, com valores de 452 ± 91 e 563 ± 26 nmol/mg de proteína para pacientes com trissomia 21 e controlos, respetivamente. Os níveis de fosfolípidos individuais foram também determinados e se encontram representados na Tabela 11.

Tabela 11. Concentrações dos fosfolípidos no córtex frontal e cerebelo de cérebros de controlos e pacientes com trissomia 21 (adaptado da referência 24)

Fosfolípidos	Concentrações de fosfolípidos (nmol/mg de proteína)			
	Córtex frontal		Cerebelo	
	Controlos (n=9)	Trissomia 21 (n=8)	Controlos (n=8)	Trissomia 21 (n=5)
Fosfatidiletanolamina	227,7±14,4	158,4±12,6	213,3±15,7	149,4±35,9
Fosfatidilinositol	26,8±3,6	17,0±2,9	20,4±2,1	13,4±3,2
Fosfatidilserina	82,7±12,1	58,8±4,0	66,4±6,0	56,7±8,2
Fosfolípidos com grupo colina	256,7±42,5	189,0±28,4	210,3±7,2	172,8±38,2
Esfingomielina	62,6±7,7	55,1±4,6	36,3±4,5	48,7±6,8
Outros	20,8±1,3	16,4±5,7	16,4±6,3	12,1±4,4

O córtex frontal de indivíduos com trissomia 21 apresentou níveis de fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina diminuídos cerca de 30% relativamente aos controlos, enquanto os fosfolípidos com grupo colina apresentaram níveis diminuídos cerca de 26% em comparação com os controlos. Os níveis do fosfatidilinositol diminuíram 37% em relação aos controlos, enquanto os níveis da esfingomielina diminuíram 12%. No cerebelo, assim como no córtex frontal, de pacientes com trissomia 21 os níveis de fosfatidilinositois diminuíram a uma maior extensão do que os restantes fosfolípidos, enquanto a magnitude da diminuição para a fosfatidilserina (15%) e fosfolípidos com o grupo colina (18%) foi menor do que no córtex frontal. Uma vez que a diminuição de fosfolípidos em pacientes com trissomia 21 sugere a ocorrência de alterações no metabolismo lipídico que podem se refletir nos níveis do colesterol, os níveis de colesterol foram também determinados utilizando o HPLC. Os níveis médios de colesterol não se encontravam significativamente alterados no cérebro dos pacientes com trissomia 21 relativamente aos controlos. A razão colesterol/fosfolípidos foi também determinada, não apresentando diferenças significativas entre os dois grupos. Esta grande alteração nos fosfolípidos no cérebro dos pacientes com trissomia 21 e a ausência de alterações significantes na razão colesterol/fosfolípidos sugerem que houve alterações nos níveis de colesterol que mantiveram esta razão a um valor semelhante ao valor obtido para os controlos.

1.2 Doenças da gravidez e diagnóstico clínico

Durante a gravidez, o organismo da mulher experimenta inúmeras alterações, não só anatómicas mas também metabólicas e fisiológicas, sendo estas necessárias para garantir o

bom desenvolvimento do feto durante o período de gestação. Porém, alterações que ocorrem na mãe podem afetar a saúde e o bem-estar da mãe e do feto, podendo resultar assim em situações patológicas ou desordens pré-natais. Destas desordens temos aquelas que afetam a grávida (ex: pré-eclampsia (5%-8% das mulheres a nível mundial) e diabetes gestacional (2%-5% das mulheres nos Estados Unidos da América)) e aquelas que afetam o feto (ex: malformações do feto (que afeta 10-15 por cada 1000 nascimentos a nível mundial) e doenças cromossômicas (que afeta 10 – 25 % das mulheres a nível mundial)) (27). Nas secções que se seguem irá ser explicada em maior detalhe a patofisiologia das doenças acima mencionadas, assim como os métodos atualmente utilizados no diagnóstico clínico das mesmas.

1.2.1 Doenças do feto

1.2.1.1 Anomalias cromossômicas

O cariotipo humano representa o conjunto de todos os cromossomas de um indivíduo, sendo este conjunto constituído por 46 cromossomas (22 pares homólogos de cromossomas e 1 par do cromossoma sexual XX (feminino) ou XY (masculino)) (28). Qualquer alteração, numérica ou estrutural, que altere a constituição do cariotipo normal é definida como sendo uma anomalia cromossômica. A Figura 6 representa a estrutura do cromossoma X com a nomenclatura dos braços, regiões, bandas e sub-bandas (a) e um cariotipo normal do sexo masculino (b).

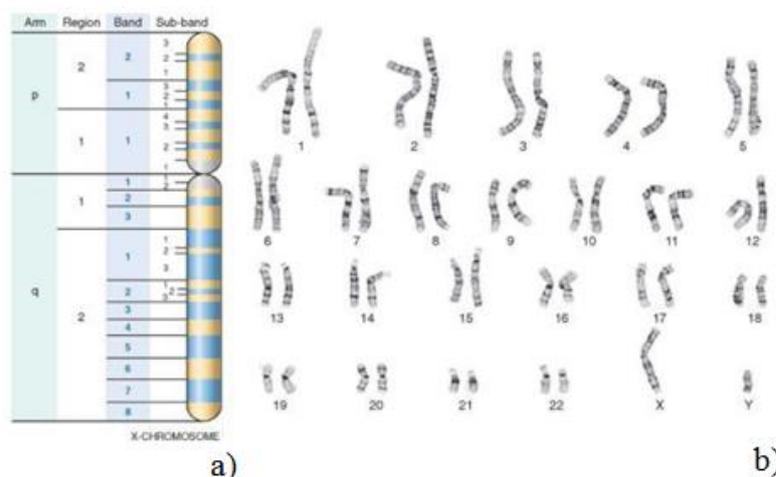


Figura 6. Cromossoma X; b) Cariotipo masculino normal (46,XY). Adaptado de Robins & Cotran 2009 (28).

As anomalias cromossômicas possuem uma elevada incidência, visto ocorrerem em cerca de 10 – 25 % de todas as gravidezes (população mundial), e são consideradas como sendo a principal causa de abortos, de defeitos congênitos e de atraso mental (29). As anomalias cromossômicas podem ser divididas em dois tipos: as alterações numéricas, onde há adição (trissomias) ou remoção (monossomia) de cromossomas, ou adição de um ou dois conjuntos de cromossomas (triploidia e tetraploidia), e as alterações estruturais que envolvem trocas de materiais entre cromossomas (translocações), ganho ou perda de material, ou rearranjos num mesmo cromossoma (deleções, inversões, anéis e isocromossomas) (29). As translocações possuem uma importância clínica particular, visto serem as mais frequentes, e compreendem dois tipos: translocações Robertsonianas (ex: síndrome de Down) e translocações recíprocas (troca mútua entre dois cromossomas).

A incidência das gravidezes trissômicas varia entre diferentes populações e encontra-se fortemente relacionada com a idade materna. Entre mulheres com idade inferior a 25 anos, aproximadamente 2% de todas as gravidezes reconhecidas clinicamente são trissômicas. A partir dos 36 anos de idade da mãe este número aumenta para 10% e aos 42 anos de idade aumenta para > 33% (29). A trissomia 21 (Síndrome de Down) (T21) caracteriza-se pela presença de uma cópia extra do cromossoma 21 (T21), em que alguns são mosaicos (com dois materiais genéticos distintos) com apenas uma porção do cromossoma 21 e os restantes (uma pequena parte) possuem a parte significativa deste cromossoma (30). A presença de mais um cromossoma é responsável pelas malformações múltiplas e deficiências a nível cognitivo apresentadas pelas crianças portadoras deste distúrbio. Para além da trissomia 21, fazem parte também das anomalias cromossômicas numéricas, as trissomias 13 e 18 que ocorrem com uma incidência de 1/40000 a 1/10000 e 1/8000 em nascimentos vivos, respetivamente (27). Ao contrário da T21, as trissomias 13 e 18 se encontram associadas com a morte na infância, geralmente durante o primeiro ano de vida (29). Outro tipo de trissomias, que se encontram ligadas aos cromossomas sexuais, são a síndrome de Klinefelter (47, XXX; 47, XXY; 47, XYY) e a síndrome de Turner (45,X) (29).

A grande incidência de casos de anomalias cromossômicas constitui o motivo pelo qual muitas mulheres optam por fazer um rastreio pré-natal (31). Normalmente recorre-se a metodologias não invasivas como ultrassonografias, realizadas no 1º e 2º trimestres de gravidez, e rastreio bioquímico do soro materno, também realizado no 1º e 2º trimestres de

gravidez. Porém, devido a baixa sensibilidade destes métodos é necessário recorrer a metodologias invasivas como a cariotipagem das células do feto que são obtidas através da amniocentese e amostragem das vilosidades coriônicas. Este tipo de procedimentos consistem na recolha do líquido amniótico (amniocentese) ou das vilosidades da placenta (amostragem das vilosidades coriônicas) e implicam um pequeno (1 %) mas significativo risco quer para o feto, como para a mãe (32). Outros métodos não invasivos de diagnóstico como a análise de marcadores (metabólitos como aminoácidos, açúcares, proteínas, etc) do sangue materno e ultrassonografias têm vindo a ser aplicados, embora tenham algumas limitações como uma janela gestacional estreita de aplicabilidade e a necessidade de combinar vários marcadores para alcançar boas sensibilidade e especificidade (31,32). Na tentativa de encontrar novos métodos de diagnóstico não invasivos, muitos autores têm apostado na aplicação de técnicas moleculares tais como técnicas de sequenciação do ácido desoxirribonucleico (ADN) (33), imunoprecipitação do ADN metilado (MeDiP) com “oligo-arrays” de alta resolução (34), “real time Polymerase Chain Reaction” (PCR) (35). Estes têm sido utilizados para analisar o ADN fetal presente no plasma materno. Embora sejam necessários mais estudos nesta área, os resultados destes estudos mostram que a aplicação das metodologias acima referidas (sequenciação do ADN, MeDiP, PCR) pode vir a representar uma mais-valia para o rastreio das anomalias cromossómicas, uma vez que possuem a vantagem de serem métodos não-invasivos e de poderem ser aplicados nas práticas de rotina dos laboratórios de diagnóstico e em todas as gravidezes. Para além dos métodos moleculares, outra linha de estudos tem sido aplicada com o objetivo de desenvolver métodos não-invasivos que possam ser uteis no rastreio das anomalias cromossómicas. Estes estudos baseiam-se na busca de marcadores metabólicos, que se encontram alterados, presentes em fluidos corporais (sangue e urina maternos, líquido amniótico) nas gravidezes diagnosticadas com anomalias cromossómicas em comparação com controlos (gravidezes com um desfecho normal) (36–39). Um exemplo de metabólitos que se encontram associados a anomalias cromossómicas, nomeadamente T21, são os lípidos. O objetivo deste trabalho será procurar biomarcadores lipídicos que permitam o diagnóstico precoce e com maior sensibilidade da T21.

1.2.1.2 Malformações do feto

As malformações fetais ou anomalias congénitas podem ser definidas como defeitos morfológicos que se encontram presentes no nascimento, capazes de afetar diferentes

órgãos e tecidos (ex: espinha bífida, afeta o sistema nervoso central (SNC)), embora possam não se manifestar clinicamente até anos mais tarde (28). As anomalias congénitas representam a causa mais comum de mortalidade (com uma taxa de 685,2 por 100000 da população mundial) no primeiro ano de vida e também contribuem para o aumento da taxa de mortalidade (uma taxa de 29,9 por 100000 da população mundial) nos anos que se seguem (28).

As anomalias congénitas podem ser de origem genética, ambiental e multifatorial (Tabela 12). As que provêm de fatores genéticos podem ser divididos em dois grupos: as aberrações cromossômicas e as doenças Mendelianas (mutações num único gene). As causas ambientais englobam agentes como infeções virais (HIV, rubéola, enterovirus, etc.), fármacos, radiações, as quais a mãe se expõe durante a gravidez e que podem causar malformações no feto. As causas multifatoriais das anomalias congénitas são o resultado da herança de vários polimorfismos genéticos que conferem um fenótipo de suscetibilidade, juntamente com a interação deste fenótipo com os fatores ambientais. Como por exemplo no caso da displasia congénita do quadril, existe uma interação entre a determinante genética, a perda do contacto da cabeça do fémur com o quadril, com um fator ambiental, a posição do feto no útero durante o período de gestação (28).

Tabela 12. Causas das anomalias congénitas (adaptado da referência 28).

Causa	Incidência (%) (população mundial)
Genética	
Aberrações cromossômicas	10 – 15
Herança mendeliana	2 – 10
Ambiental	
Infeções maternas/placentárias	2 – 3
Agentes virais	–
Estado da saúde materna	6 – 8
Drogas e químicos	1
Radiação	1
Multifatorial (associação entre polimorfismos genéticos e fatores ambientais)	20 – 25
Desconhecidos	40 – 60

Assim como no diagnóstico nas anomalias cromossômicas, o diagnóstico das malformações fetais baseia-se em metodologias não-invasivas (ultrassonografias) e invasivas (amniocentese e amostragem das vilosidades coriônicas). Na tentativa de

desenvolver novas metodologias não invasivas que permitam a identificação de malformações fetais, têm sido aplicadas novas abordagens utilizando o plasma materno, a urina, o fluido amniótico na busca de biomarcadores (aminoácidos, açúcares, proteínas, etc) que permitam o diagnóstico de patologias ligadas as anomalias congénitas (35–38)

1.2.1.3 Outras doenças que afetam o feto

Para além das anomalias cromossômicas e congénitas, existem também outros tipos de desordens da gravidez como a restrição do crescimento intrauterino, o parto prematuro e a macrossomia. A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) pode ser definida como uma taxa de crescimento fetal menor do que o normal. O rastreio consiste na examinação clinica e na identificação dos fatores de risco maternos e fetais (Tabela 13.). O exame clinico inclui palpação, ultrassonografia e medição da altura uterina (14).

Tabela 13. Fatores de risco da restrição do crescimento intrauterino (adaptado da referência 15).

Riscos maternos	Riscos do feto
Casos anteriores de RCIU	Aneuploidia
Pré-eclampsia	Gravidez múltipla
Baixo peso ou baixo ganho de peso durante a gestação	Anormalidade estrutural
Hábitos tabágicos	Infeção

Quando se deteta um feto com um tamanho anormal (menor do que o normal para a idade gestacional), deve-se em primeiro lugar procurar saber se se trata de um caso de RCIU ou de um caso do feto ser “pequeno para a idade gestacional”, isto é se o feto é pequeno com velocidade de crescimento reduzida ou se é pequeno mas com velocidade de crescimento normal (15). Essa distinção pode ser feita através da avaliação do volume do fluido amniótico e da monitorização do crescimento do feto e da simetria do crescimento através de ultrassonografias. Uma vez diagnosticado RCIU, deve-se tentar estabelecer a causa. Se o diagnóstico for feito no início da gravidez (1º trimestre), existe um risco aumentado de aneuploidias, como a trissomia 18, ou triploidias (15). Na maioria dos casos, o diagnóstico é feito tardiamente, isto é final do segundo trimestre ou início do terceiro, sendo em ambos os casos (no inicio ou no final da gravidez) o diagnóstico é importante no despiste de certas anomalias como as malformações fetais.

O parto prematuro é aquele que ocorre a menos de 37 semanas de gestação, resultando de uma serie de complicações que implicam ambos a mãe e o feto (16). Esta desordem

contribuiu para o aumento da taxa de morbidade (75%) e mortalidade perinatal (> 50%) (17). As causas do parto prematuro englobam o trabalho de parto prematuro espontâneo (entrada em trabalho de parto espontâneo, não subjacente a complicações maternas e/ou fetais), gravidez múltipla, RPM, pré-eclampsia, restrições do crescimento intrauterino, hemorragia anteparto e malformações uterinas (Tabela 14).

Tabela 14. Causas do parto prematuro (adaptado da referência 16)).

Causas	Incidência (%) (População dos Estados Unidos)
Trabalho de parto prematuro	31 – 50
Gravidez múltipla e complicações associadas	12 -28
Rutura prematura das membranas	6 – 40
Pré-eclampsia	12
Restrição do crescimento intrauterino	2 – 4
Hemorragia anteparto	6 – 9
Malformações uterinas	-

O rastreamento do parto prematuro consiste na medição de modificações do tamanho do colo que podem ser observadas através de ultrassonografia. Quanto menor o tamanho do colo, maior o risco (17). Após o diagnóstico, é iniciada uma intervenção terapêutica onde são normalmente utilizados fármacos como glucocorticóides e antibióticos em mulheres com idade gestacional inferior a 34 semanas e com risco de parto prematuro numa tentativa de atrasar ou inibir a entrada do trabalho de parto prematuro e reduzir a taxa de mortalidade (16). Na busca de um método de diagnóstico precoce para o parto prematuro, têm sido utilizados fluidos corporais (urina, sangue, fluido amniótico) na pesquisa de metabolitos que possam ser utilizados na previsão desta anomalia (10–13,18,19). Metabolitos como a colina, o citrato, alanina, entre outros, encontram-se alterados em casos de parto prematuro.

A macrossomia é definida como sendo um peso a nascença superior a 4 Kg ou, de uma forma mais correta um peso a nascença acima dos 90 percentis para a idade gestacional (46). Cerca de 70% das causas de macrossomia são atribuídas a fatores genéticos e multifatoriais (oxigénio, nutrientes e insulina como fator de crescimento), gravidezes prolongadas ou a síndromes como é o caso dos tumores. Os restantes 30% ocorrem em fetos de grávidas diabéticas, com maior frequência em grávidas obesas e com gravidezes

múltiplas. Os métodos pré-natais de diagnóstico para esta desordem englobam fatores de risco maternos, ultrassonografias e exame clínico (47). Porém, a única maneira de se fazer um diagnóstico com precisão é pesar o recém-nascido após o parto, uma vez que o uso das técnicas acima mencionadas não constitui um método preciso, sendo necessário combiná-las para que o diagnóstico seja mais concreto. O principal fator de risco materno associado a macrossomia é o risco aumentado de recorrer a cesarianas no momento do parto. Embora seja raro, complicando 1,4% dos partos normais, a distócia de ombro é a complicação mais grave que se encontra associada a macrossomia (47). Este risco encontra-se no entanto aumentado quando o peso à nascença é maior que 4,5 Kg, aumentando de 9,2 para 24% em gravidezes não complicadas pela diabetes e de 19,9 para 50% em casos de grávidas com diabetes. Os danos mais comuns que se encontram associados a macrossomia são a fratura da clavícula e dano nos nervos do plexo braquial, apresentando um risco de aproximadamente 10 vezes e 18 a 21 vezes, respetivamente, quando o peso à nascença é 4,5 Kg. Na Tabela 15 encontra-se representada os fatores de risco para a macrossomia fetal por ordem decrescente de importância.

Tabela 15. Fatores de risco associados a macrossomia fetal (47).

1- História de macrossomia
2- Peso materno durante a gravidez
3- Ganho de peso durante a gravidez
4- Gravidez múltipla
5- Feto do sexo masculino
6- Idade gestacional superior a 40 semanas
7- Etnia
8- Peso materno à nascença
9- Idade materna menor que 17 anos

1.2.2 Doenças da grávida

1.2.2.1 Pré-eclampsia

A pré-eclampsia representa uma das complicações mais comuns da gravidez afetando cerca de 5%-8% das mulheres grávidas (população mundial) (48). Constitui uma das maiores causas de morbilidade e mortalidade (49) visto apresentar consequências para ambos a mãe e o feto (50). Para a mãe, a pré-eclampsia pode levar ao choque hipovolémico (perda de sangue de forma severa fazendo com que o coração seja incapaz de bombear sangue para o resto do corpo), coagulação intravascular disseminada, falha renal, falha cardíaca, edema e síndrome de hemólise, enzimas hepáticas elevadas, baixa contagem de

plaquetas (HELLP). Para o feto existe um risco aumentado da restrição do crescimento intrauterino (51). Esta condição manifesta-se normalmente depois das 20 semanas de gestação, caracterizando por um quadro de hipertensão (pressão sanguínea sistólica ≥ 140 mmHg e/ou diastólica ≥ 90 mmHg) e proteinúria (≥ 300 mg/24 h) (52). Não se conhece a origem exata desta patologia, mas acredita-se que a combinação de vários fatores ambientais, genéticos, raciais e imunológicos possa aumentar a predisposição das mulheres grávidas à esta doença (53).

Na tentativa de encontrar biomarcadores (metabolitos, células) específicos para pré-eclampsia alguns estudos têm sido aplicados neste campo, utilizando como amostras o plasma/soro sanguíneo (54) e também a placenta (53).

1.2.2.2 Diabetes mellitus gestacional

A diabetes mellitus gestacional (DMG) é uma doença metabólica que tem origem durante a gravidez e se caracteriza pela intolerância à glucose devido a sua acumulação na corrente sanguínea. Esta doença encontra-se fortemente associada com o aumento da taxa de morbidade materna e fetal (pré-eclampsia, hipoglicémia, hipocalcémia, macrosomia fetal (feto obeso) e icterícia neonatal), resultando no aumento da recorrência a cesarianas e ao uso de fórceps, principalmente devido a macrosomia fetal (55). Esta patologia desenvolve-se como consequência de dois eventos característicos. O primeiro evento trata-se da resistência à insulina que se deve ao aumento dos níveis hormonais, característico da gravidez. O segundo evento trata-se do mau funcionamento das células β pancreáticas (56). A resistência à insulina progride durante a gravidez como resultado da diminuição da glucose em jejum, deposição de gordura, atraso no esvaziamento gástrico e aumento de apetite, causados pelas alterações hormonais (57). Por outro lado, as células β pancreáticas que controlam os níveis de glucose, aumentando os níveis de insulina para compensar a resistência à insulina, não são capazes de o fazer. O funcionamento anómalo das células β pancreáticas deve-se a processos autoimunes, no caso de mulheres que não apresentam qualquer evidência de risco da doença, ou a defeitos enzimáticos (ex: glucocinase que atua nas células β controlando a secreção da insulina em resposta ao aumento do nível de glucose na corrente sanguínea) (56).

O diagnóstico clínico de DMG baseia-se normalmente em testes de tolerância a glucose. Nestes testes, segundo World Health Organization (WHO) (1999), é administrado 75 g de glucose e depois de 2h faz-se a medição da concentração da glucose no sangue. Os

valores normais de glucose para este teste rondam os 130-140 mg/dL (7,2-7,8 mmol/L) (58). Para além dos testes de tolerância a glucose, também são realizados outros testes menos comuns como glicemia de jejum e glicemia casual, cuja sensibilidade não se encontra comprovada. Outros testes como o doseamento da hemoglobina glicada, glicosúria (medição dos níveis de glucose na urina) e frutossamina sanguínea podem, também, ser realizados, embora sejam testes com baixa sensibilidade (57). A hemoglobina glicada permite a monitorização do nível glicémico uma vez que depois de formada permanece na célula durante todo o tempo de vida desta, permitindo assim saber a concentração da glucose na corrente sanguínea num período de 6 – 8 semanas (59). O teste da frutossamina sanguínea permite-nos saber a concentração da glucose através da fração total de proteínas sanguíneas que tenham sido glicadas (59).

O controlo da DMG é extremamente importante para a saúde e bem-estar da grávida e do feto. Numa fase inicial, este controlo passa pela monitorização dos níveis de glucose no sangue e modificação do estilo de vida (dieta e exercício físico) (55). Caso a modificação do estilo de vida não seja suficiente para ajudar a manter a concentração de glucose nos níveis esperados, dar-se-á início a terapêutica insulínica ou com medicamentos anti-hiperglicémicos (57).

Uma vez que já existem evidências de que uma gravidez com DMG encontra-se fortemente relacionada com alterações no metabolismo dos lípidos (ex: aumento dos níveis dos triglicéridos), o objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia que permita identificar biomarcadores lipídicos no plasma materno, de grávidas que desenvolveram DMG, que possam ser utilizados para a previsão desta doença e permitir assim minimizar os riscos para mãe e para o feto.

1.3 Métodos de análise lipídica

1.3.1 Aspetos gerais sobre a análise dos lípidos

A análise de lípidos pode ser levada a cabo através de uma metodologia direcionada ou não direcionada. A análise direcionada de lípidos é a análise de uma classe específica de lípidos ou metabolitos presentes na amostra. Esta análise envolve passos de extração lipídica (ou não), separação por cromatografia, dependendo a escolha do tipo de coluna cromatográfica da classe que se quer separar, e identificação das classes lipídicas presentes na amostra (60). A análise não direcionada é definida como sendo uma abordagem não-

específica que procura todos os metabolitos detetáveis na amostra, recolhendo o máximo de informação possível e constituindo assim uma estratégia de estudo da metabolómica (61).

Os métodos tradicionais de análise lipídica envolvem normalmente passos de extração dos lípidos a partir da amostra. Estes métodos dependem do tipo de amostra que se está a utilizar (plasma/soro, tecidos, células, etc) e do tipo de lípidos que se quer extrair. Alguns autores relatam análise lipídica feita a partir diretamente da amostra (sangue, tecidos), e realçam como vantagens o facto de ser mais rápida, permitir menos perdas e menos tempo a temperatura ambiente, podendo assim garantir que a composição da amostra não se altera (3,5).

Caso se opte por fazer a extração lipídica, o primeiro passo é a escolha do método de extração a utilizar em função da natureza da amostra e da quantidade de informação que se quer obter (ex: a classe de lípidos que se quer obter) (62). Os solventes ou mistura de solventes utilizados para extração lipídica de amostras biológicas são na sua maioria, solventes orgânicos (ex: clorofórmio, hexano, éter), devido à natureza anfipática destes compostos. No caso de tecidos biológicos, o solvente deve ser capaz de ultrapassar as forças de associação entre os lípidos e os outros componentes celulares, como por exemplo as proteínas (62). Para a extração de lípidos neutros são utilizados solventes não polares como o clorofórmio ou o éter dietílico. Por outro lado, para extrair lípidos mais polares, como é o caso dos que se encontram associadas as membranas celulares, utiliza-se solventes polares como o metanol ou o etanol para romper as ligações de hidrogénio e as forças electroestáticas (63).

Posteriormente à etapa da extração faz-se a separação cromatográfica dos compostos utilizando técnicas como a cromatografia por TLC, a cromatografia por GC e a cromatografia por HPLC. A derivatização da amostra antes da análise cromatográfica pode em alguns casos ser feita com o objetivo de aumentar a seletividade da separação e a sensibilidade na deteção. A cromatografia por TLC consiste basicamente na separação dos compostos presentes numa amostra de acordo com a sua mobilidade numa camada fina revestida, como por exemplo com sílica (fase estacionaria) sobre a qual a fase móvel se desloca. A cromatografia por TLC é a técnica mais simples utilizada na análise lipídica e permite uma rápida separação da maioria das classes neutras e dos fosfolípidos (64). A cromatografia por GC pode ser utilizada na análise de praticamente todas as classes

lipídicas. A cromatografia por HPLC constitui mais uma técnica utilizada na separação dos lípidos e consiste na passagem dos compostos presentes na amostra por uma coluna, onde são separados de acordo com a afinidade com a coluna, sendo eluídos em primeiro lugar os com menor afinidade. Em comparação com a cromatografia de HPLC, ambas as técnicas, GC e TLC, apresentam vantagens e desvantagens (60). A técnica cromatográfica de TLC é mais barata, mas tem pouca eficiência e é difícil de quantificar. A cromatografia de GC é a mais fácil, mas as amostras tem que ter a capacidade de serem volatilizadas sem se decomporem. Um exemplo de um método capaz de derivatizar as amostras, aumentando assim a sua volatilização é a transesterificação direta. Este método é normalmente utilizado na análise dos lípidos, em estudos para a determinação de ácidos gordos presentes nos fosfolípidos (15,65) e consiste na conversão destes ácidos gordos que se encontram esterificados ao glicerol em esteres metilados (7). Estas técnicas cromatográficas normalmente são acopladas com técnicas analíticas como a espectrometria de massa (TLC-MS, GC-MS, HPLC-MS).

1.3.2 Métodos de extração de lípidos

O método de Folch e o método de Bligh e Dyer são os métodos mais utilizados para extração de lípidos a partir de amostras biológicas como tecidos, bactérias, plasma/soro, etc (66–68). Estes dois métodos consistem na extração líquido-líquido e utilizam como solventes de extração o clorofórmio (CHCl_3) e o metanol (CH_3OH), diferindo apenas na proporção destes solventes, sendo esta proporção de 2:1 para o método de Folch e de 1:2 para o Bligh e Dyer. O método de Folch método mais adequado para a extração de lípidos como os sulfatos de colesterol, os triglicéridos, os esteres de colesterol, os ácidos gordos, os fosfatidilinosítois e as fosfatidiletanolaminas em amostras de plasma (69). O método do Bligh e Dyer por sua vez mostra ser bastante eficiente na extração das fosfatidiletanolaminas. Estes dois métodos mostram ter eficiências extrativas bastante semelhantes, na extração de fosfatidilcolinas, esteres de colesterol e triglicéridos. Para além dos métodos de extração apresentados acima, existem também outros métodos que têm ganho algum uso nos últimos tempos. Dentre estes, podemos encontrar o método designado por “Bligh e Dyer acidificado”, éter metil-terc-butílico (MTBE) ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$), e o hexano-isopropanol que também se baseiam na extração líquido – líquido. O método de Bligh e Dyer acidificado consiste numa modificação do Bligh e Dyer que utiliza o ácido clorídrico, num segundo passo de extração, para aumentar a recuperação dos fosfolípidos

ácidos (fosfatidilglicerol, fosfatidilinositois, fosfatidilserina). O protocolo do método de MTBE utiliza como solvente orgânico de extração o MTBE que, devido ao facto de apresentar menor densidade, fica em cima da fase aquosa depois de se ter induzido a separação das fases, facilitando a sua recolha. Os métodos de MTBE e o de Bligh e Dyer acidificado apresentam uma boa capacidade extrativa para espécies lipídicas como os triglicéridos, fosfatidiletanolaminas, lactosilceramidas, etc (69). Um outro protocolo de extração envolve o uso de hexano e isopropanol na proporção de 3:2, v/v. Embora este método tenha algumas limitações na extração de algumas classes lipídicas (fosfatidilinositois, lipoaminoácidos, sulfatos de colesterol e lisofosfatidilcolinas), parece ser o método adequado para a extração de esteres de colesterol. Na Figura 7 encontram-se esquematizados os diferentes métodos de extração lipídica acima mencionados.

Outros métodos que podem ser utilizados para a extração lipídica são os métodos, como a extração com fluido supercrítico (SFE), extração assistida com ultrassons, de Soxhlet (63).

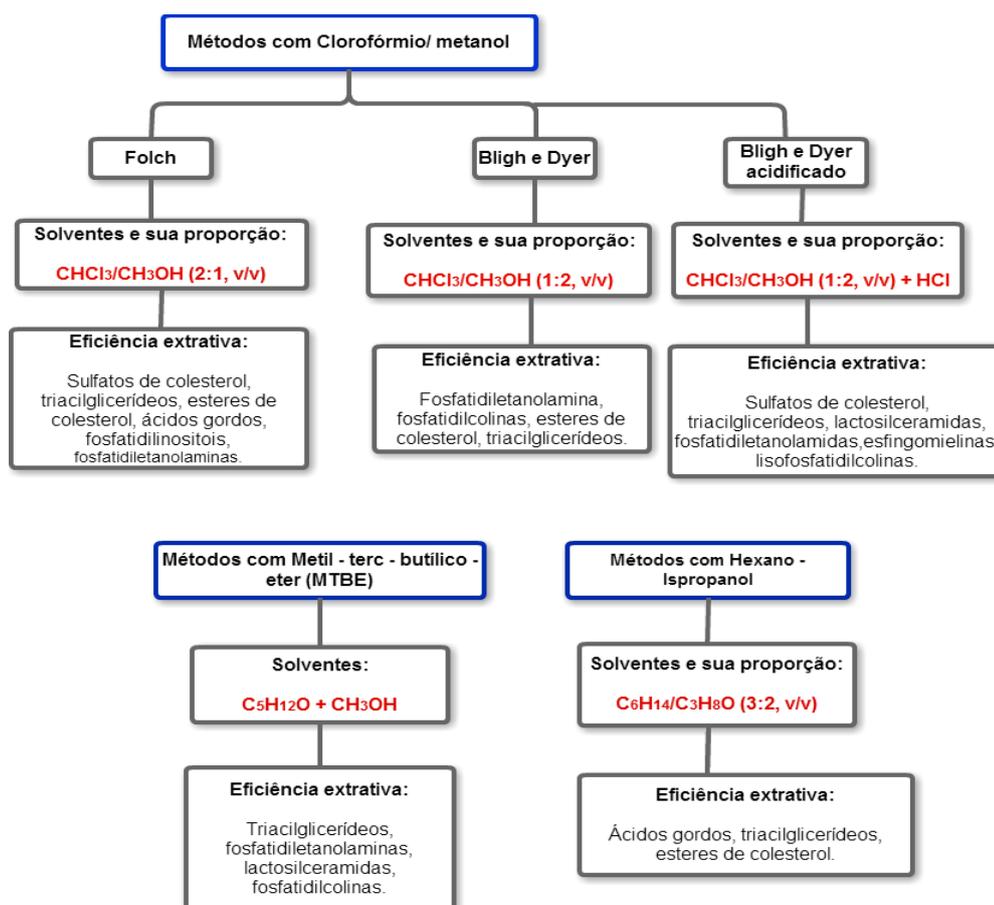


Figura 7. Métodos mais utilizados para a extração lipídica de amostras biológicas.

1.3.3 Outros métodos utilizados para a análise de lípidos

Para além da extração de lípidos e das técnicas cromatográficas, existem outros métodos que são utilizados para a análise de lípidos, sem recorrer a extração. Destes fazem parte ensaios imunológicos como a imunoprecipitação e a imunoturbidimetria, e ainda os ensaios enzimáticos (14,15,19). A imunoprecipitação consiste na precipitação de uma proteína (anticorpo) utilizando um antígeno que se liga especificamente a esta proteína, permitindo assim isolar a proteína de interesse a partir de uma amostra que contém diferentes tipos de proteínas (10). No método de imunoturbidimetria, as proteínas são precipitadas e a turbidez é medida espectralmente, para determinação da classe lipídica de interesse (10). A imunoturbidimetria é ideal para a deteção de proteínas, onde a concentração do metabolito é inversamente proporcional ao sinal de luz transmitida. Na análise dos lípidos, esta técnica é utilizada em alguns estudos para fazer o isolamento de lipoproteínas e apolipoproteínas (14,15). Os ensaios enzimáticos consistem na medição da atividade enzimática. No estudo dos lípidos os ensaios enzimáticos são utilizados para a determinação de lípidos como o colesterol e os triglicéridos (14,17,19,21,22). As enzimas adicionadas são específicas para o metabolito de interesse e permitem uma boa quantificação sem a necessidade de recorrer a extrações. Um exemplo de uma sequência de reações enzimáticas para a determinação do colesterol encontra-se representado na Figura 8.

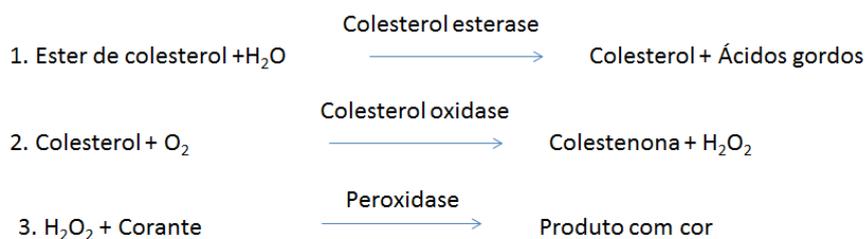


Figura 8. Sequência de reações enzimáticas utilizadas para a determinação do colesterol (adaptado da referência 10).

A enzima colesterol esterase cliva os resíduos de ácidos gordos presentes nos esteres de colesterol, convertendo os esteres de colesterol em colesterol livre. O colesterol livre reage com o O₂ na presença da enzima colesterol oxidase, produzindo o peróxido de hidrogénio que reage com um outro reagente sem cor na presença de enzima peroxidase, originando um composto com cor. A intensidade da cor resultante, que é proporcional a quantidade de

colesterol, é medida espectrofotometricamente a 500 nm (10). Para a determinação dos triglicerídeos existem varias reações enzimáticas em que todas envolvem lipases para clivar os ácidos gordos do esqueleto do glicerol (10). A Figura 9 representa um exemplo de sequência de reações enzimáticas utilizada na determinação dos triglicerídeos. Esta reação envolve enzimas como glicerol cinase, glicerofosfato oxidase e peroxidase que, à semelhança do que acontece com o colesterol, originam um composto com cor que é quantificada espectrofotometricamente. Neste caso absorvância do produto final é medida na zona ultravioleta.

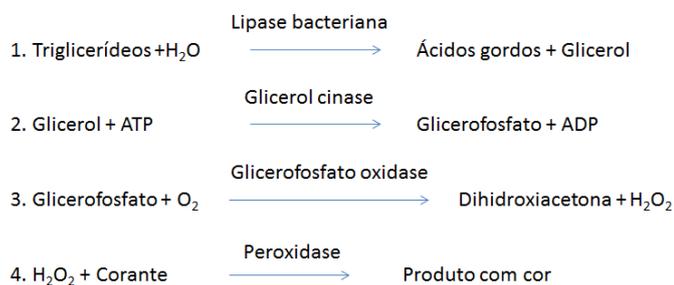


Figura 9. Sequência de reações enzimáticas utilizadas para a determinação dos triglicerídeos (adaptado da referência 10).

1.3.4 A abordagem lipidómica

1.3.4.1 Conceitos gerais de metabolómica

A metabolómica pode ser definida como sendo o estudo de todos os metabolitos, da sua dinâmica, composição, interação e sua resposta a intervenções ou alterações no ambiente em que encontram (nas células, tecidos e biofluidos) (61), com o objetivo de detetar, identificar e quantificar essas alterações. Associada a metabolómica, a lipidómica dedica-se ao estudo, identificação e quantificação de todas as espécies lipídicas presentes num sistema biológico. Para alcançar estes objetivos a metabolómica, recorre a metodologias analíticas para a deteção, identificação e quantificação de um grande número de metabolitos e metodologias bioinformáticas para a interpretação das alterações que ocorrem nestes metabolitos. Das técnicas analíticas utilizadas na metabolómica, as mais utilizadas são a espetrometria de MS acoplada a cromatografia de GC ou LC (GC-MS ou LC-MS) e a espectroscopia de RMN (70). Para além das técnicas analíticas, as técnicas bioinformáticas são de extrema importância para a metabolómica. Destas fazem parte a análise multivariada, que envolve técnicas de análise não supervisionadas e

supervisionadas. As técnicas não supervisionadas envolvem a análise das componentes principais, do inglês “principal component analysis” (PCA) e a análise hierárquica de “clusters” do inglês “hierarchical cluster analysis” (HCA). As metodologias supervisionadas envolvem o método de mínimos quadrados parciais, do inglês “partial least-squares” (PLS), e o método de projeção ortogonal de estruturas latentes, do inglês “orthogonal partial least-squares” (OPLS).

A metabolómica tem vindo a ser aplicada em várias áreas de estudo, incluindo estudos clínicos de doenças humanas como diabetes mellitus, cancro, doenças neurológicas, anomalias cromossómicas (trissomia 21), anomalias congénitas e também doenças neonatais e pediátricas (12, 54, 55). Nestes estudos são utilizados amostras biológicas (tecidos, sangue, urina, etc), modelos animais/humanos, para aquisição de dados que possam caracterizar e permitir que seja possível fazer um diagnóstico precoce da doença em estudo.

1.3.4.2 Espetrometria de massa (MS): princípios

A espetrometria de massa consiste basicamente na medição da massa de átomos e moléculas, permitindo-nos assim a identificação das espécies presentes numa determinada amostra. A Figura 10 ilustra um esquema de um espectrómetro de massa, sendo este constituído por um sistema de introdução da amostra, um sistema de vácuo, uma fonte de iões, um analisador, um detetor e um sistema de dados. Após a introdução da amostra, esta é ionizada e acelerada num campo elétrico sob vácuo, permitindo assim a sua separação de acordo com a sua razão massa – carga (m/z) (71).

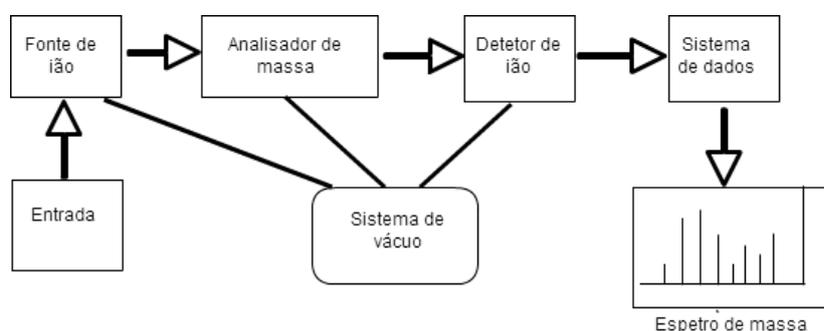


Figura 10. Representação esquemática de um espectrómetro de massa. (adaptado da referência 71)

Uma análise feita por MS consiste primeiramente na conversão do analito numa espécie iónica, pelo facto de ser mais fácil experimentalmente de manipular e detetar iões do que espécies neutras (71). Durante o processo de ionização ocorre transferência de energia para a molécula, que resulta na sua fragmentação. O analisador de massa separa os iões de acordo com m/z . O espectro de massa consiste num gráfico que nos mostra a relação existente entre m/z dos iões e as suas respectivas abundância relativas. Para evitar que espécies diferentes colidam ou interajam entre si, cada um desses passos é realizado sob vácuo.

Embora a espectrometria de massa seja mais sensível do que a espectroscopia de RMN, apresentando limite de deteção na ordem dos picomolar (72), normalmente é necessária a utilização prévia de técnicas cromatográficas, como o GC, o HPLC e o LC para diferentes classes de substâncias (72). Atualmente a técnica de MS tem sido aplicada em vários estudos e em várias áreas distintas (química, biologia medicina, estudos ambientais, etc). No ramo da metabolómica e lipidómica esta técnica tem sido muito utilizada na deteção de metabolitos que possam estar envolvidos na fisiopatologia de diferentes doenças humanas (36,40).

1.3.4.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN): princípios

A espectroscopia de RMN é uma técnica analítica que estuda as transições energéticas dos spins nucleares de alguns núcleos atómicos, quando estes núcleos são submetidos à ação de um campo magnético, permitindo obter informação detalhada sobre a estrutura do composto puro ou numa mistura de compostos (72). Sob a ação deste campo magnético externo (B_0), alguns núcleos atómicos diferentes orientam-se de forma diferente. Esta particularidade deve-se ao facto dos núcleos apresentarem um número quântico de spin (I) diferente de zero que tem associado um momento angular (P) e um momento magnético (μ). Estes podem ser relacionados pela expressão $\mu = \gamma P$, onde γ é a constante giromagnética do núcleo em questão. Em RMN, só os núcleos com o número de spin (I) diferente de zero (ex: ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{14}N , ^{15}N , ^{31}P) podem ser estudados, pois só estes são capazes de gerar o momento magnético. Como se encontra esquematizado na Figura 11, quando um núcleo com $I = 1/2$ (^1H , ^{13}C , ^{19}F) absorve energia eletromagnética este núcleo passa de um estado de menor energia, $m = + 1/2$, para um estado de maior energia, $m = - 1/2$,

que são normalmente designadas por α e β , respetivamente (73). A diferença de energia entre estes dois níveis pode ser expressa por: $\Delta E = E\alpha - E\beta = \frac{\gamma h B_0}{2\pi}$

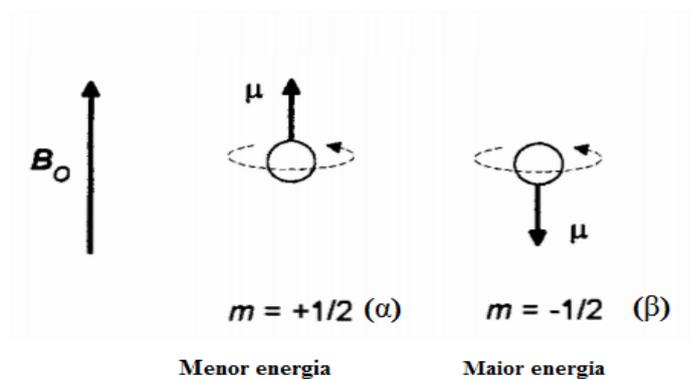


Figura 11. As duas possíveis orientações do momento magnético (μ) para núcleos com $I = 1/2$, de prótons sujeitos a um campo magnético B_0 (adaptado da referência 73).

No estado de equilíbrio, todos os núcleos com $I = 1/2$ se encontram alinhados com o eixo $+z$. A soma de todos os momentos magnéticos nucleares é dada pela magnetização global (M_0), que se encontra alinhado paralelamente com o campo magnético B_0 . Numa experiência de RMN, o sinal é obtido quando temos a presença de um segundo campo magnético associado a radiação eletromagnética, B_1 , de menor intensidade do que B_0 e perpendicular a este. Quando o campo B_1 começa a emitir radiação magnética, M_0 afasta-se do plano z e começa a movimentar-se em torno do plano xy . Quando a emissão de radiação cessa, o campo B_1 desaparece e todos os núcleos voltam ao seu estado de energia inicial. Este processo de absorção e emissão de radiação é registrado como um sinal a que se dá o nome de “free induction decay” (FID) (74). O FID, função dependente do tempo, é registrado durante um período de tempo (alguns segundos) conhecido como tempo de aquisição (t_{acq}), sendo posteriormente convertido num espectro de RMN (gráfico da intensidade em função da frequência) utilizando a operação matemática designada por transformada de Fourier.

Num espectro de RMN de 1H podemos observar diferentes zonas de absorção de prótons a desvios químicos diferentes dependendo do ambiente químico do núcleo (73). O desvio químico dos prótons é medido em relação a um composto de referência (ex: TMS) que aparece a 0 ppm. Prótons que absorvem a um campo mais alto, desvios químicos mais baixos, denominam-se por escudados ou protegidos, enquanto que prótons que absorvem a

campos mais baixos, desvio químico mais elevado, denominam-se por descudados ou desprotegidos. A Figura 12 representa graficamente as diferentes regiões de absorção de prótons com diferentes ambientes químicos

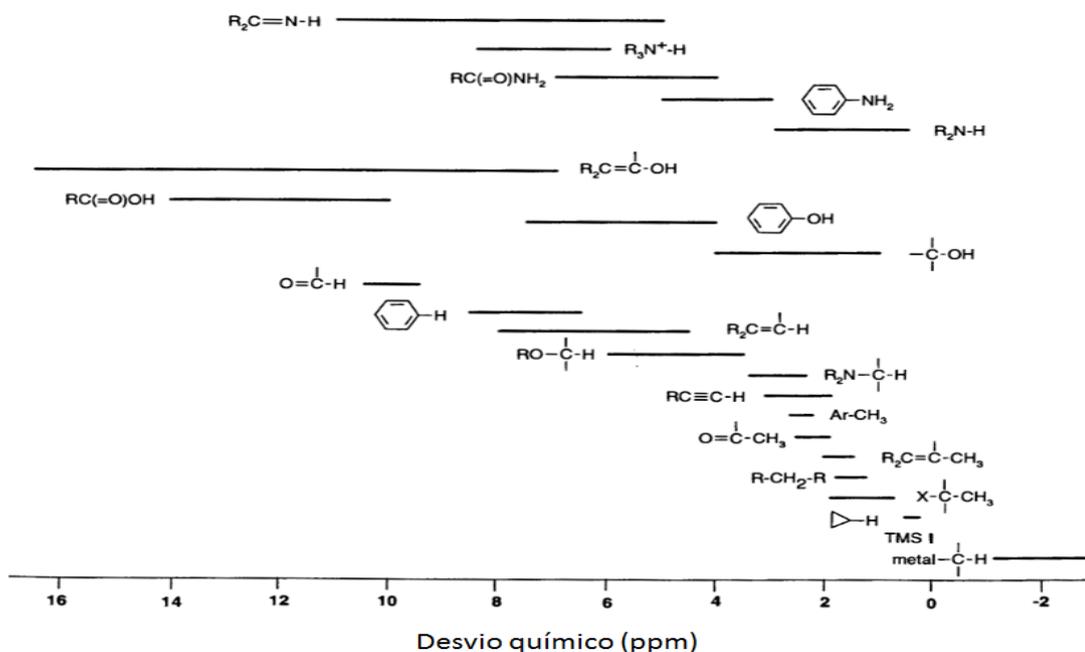


Figura 12. Espectro representativo de RMN de ^1H com diferentes zonas de absorção correspondentes a diferentes grupos funcionais (adaptado da referência 73).

A espectroscopia de RMN tem como vantagens o facto de não precisar de pré-tratamento da amostra, de ser reprodutível e não-destrutiva, permitindo assim a sua utilização em outras análises. Esta técnica tem como maior desvantagem o facto de possuir baixa sensibilidade (limite de deteção na ordem dos micromolar), porém pode ser melhorada utilizando compostos marcados com ^{13}C , ^{15}N (75). Para além da vasta aplicação na química estrutural de compostos, por ser uma técnica rápida e não invasiva a espectroscopia de RMN de ^1H tem vindo a ser muito utilizada recentemente no campo da metabolómica, inclusive em estudos de doenças humanas, com o objetivo de identificar e quantificar vários tipos de metabolitos que possam estar envolvidos na fisiopatologia dessas doenças (3–5,11).

1.3.4.4 Análise multivariada: princípios e aplicações

Para que se possa obter uma melhor caracterização da amostra e uma eficiente deteção de biomarcadores, os dados obtidos tanto pela espectroscopia de RMN como pela

espectrometria de massa necessitam de serem analisados utilizando métodos de análise multivariada de dados. Na metabolómica para além dos métodos de análise univariada, os dados devem ser analisados utilizando métodos estatísticos multivariados, análise de mais do que uma variável de forma simultânea (76). Esta metodologia envolve dois tipos de abordagens: a abordagem não-supervisionada e a abordagem supervisionada, onde a não-supervisionada se refere ao facto do modelo ser feito com ou sem a intervenção do utilizador e somente nas variáveis explicativas, não envolvendo o estabelecimento de uma hipótese *a priori*.

Antes da análise multivariada, os espectros obtidos quer por RMN quer por MS passam por um processo de pré-processamento. O pré-processamento corresponde a todo o tratamento de dados realizados até ao início da análise estatística e compreende técnicas como “binning”, normalização e “scaling” e a seleção de variáveis (77). O processo de “binning” consiste na divisão dos espectros no número desejado de regiões, seguida da soma de cada área dentro de cada região com o objetivo de formar novos espectros com um menor número de variáveis. De seguida faz-se a normalização que ajusta as intensidades dos espectros, permitindo que amostras com diferentes concentrações sejam comparáveis entre si. Vários tipos de normalização podem ser aplicados (normalização da média, da mediana e da área total), dependendo a escolha do tipo de normalização do tipo de variações existente nas amostras. O último passo do pré-processamento dos dados é o “scaling”. Este passo tem como objetivo reduzir o ruído dos dados aumentando assim a qualidade da informação contida nos mesmos (78). Existem vários tipos de “scaling” em que os mais utilizados são: o UV, o pareto e ainda o centrado, que embora não seja propriamente um tipo de “scaling” alguns autores o consideram com tal.

A seleção de variáveis consiste na remoção de variáveis irrelevantes ou que não contribuem positivamente para o modelo com o objetivo de aumentar o poder preditivo do modelo, reduzir a complexidade do modelo, melhorar as propriedades estatísticas do modelo e obter um modelo que seja mais fácil de compreender (79). Existem diferentes métodos de seleção de variáveis que são utilizados em estudos metabolómicos que se baseiam nos valores de importância das variáveis na projeção (VIP) (80,81), coeficientes de regressão (80), intervalos de regressão por mínimos quadrados parciais (iPLS) (82) e algoritmos genéticos (GA) (82–84). Uma estratégia que tem sido aplicada na seleção de variáveis, consiste em considerar um conjunto de variáveis selecionadas por diferentes

métodos de seleção. Esta estratégia foi aplicada num estudo de doença hepática não alcoólica (80), onde foi possível, através da interceção dos métodos de seleção de variáveis por coeficiente de regressão e valores de VIP, identificar potenciais biomarcadores. Outro estudo (36) utilizou a interceção de métodos de seleção de variáveis que se baseiam nos valores de importância das variáveis na projeção ($VIP > 1$), variáveis associados a valores baixos de erro padrão em relação com VIP ($VIP_{cvSE} > 1$) e coeficientes de regressão ($|b/b_{cvSE}| > 1$). Aplicando esta estratégia foi possível confirmar o conhecimento metabólico já existente, assim como fornecer novas informações metabólicas. Neste trabalho será aplicada a seleção de variáveis baseando na interceção dos três métodos de seleção de variáveis acima mencionados.

O VIP consiste numa medida que descreve como é que as variáveis contribuem para descrever os conjuntos de dados: as variáveis dependentes (Y) e as variáveis independentes (X) (79). O valor de VIP pode se dado pela seguinte expressão:

$$VIP_j = \sqrt{\frac{\sum_{f=1}^F w_{jf}^2 \cdot SSY_f \cdot J}{SSY_{total} \cdot F}}$$

Onde temos no numerador: w_{jf} que é o valor do peso da variável j componente f , SSY_f é a soma dos quadrados da variância explicativa para o componente f e J é o número de variáveis (79). No denominador temos SSY_{total} e F que consistem na soma total dos quadrados representativa da variável dependente e no número total de componentes, respetivamente. Um valor de VIP menor do que 1, indica que a presença de uma variável não importante, podendo por isso ser removida do modelo.

O método de coeficiente de regressão seleciona as variáveis de acordo com a magnitude do coeficiente de variação (85). Variáveis com valores de coeficiente de variação inferiores a 1 são removidas do modelo.

A abordagem não-supervisionada tem como função diminuir a dimensionalidade dos dados obtidos para um nível adequado de informação. Esse tipo de abordagem utiliza a análise de componentes principais, do inglês principal component analysis (PCA) como análise exploratória, ou seja, para verificar a relação entre amostras e as principais fontes de variações (designados por componentes principais (PC)) que constituem um conjunto de dados (78). Todos os componentes do PCA são ortogonais uns em relação aos outros, como se encontra esquematizado na Figura 14, que representa um modelo PCA de uma

matriz \mathbf{X} que contém as variáveis x_1 , x_2 e x_3 . Num modelo com duas componentes (Figura 13), a decomposição dessa matriz dá origem a dois PCs (t_1 e t_2), que constituem um plano, de acordo com a equação: $\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}$ (77). \mathbf{T} representa a matriz das observações (coordenada fatoriais) que define um plano de baixa densidade que se aproxima do plano \mathbf{X} , isto é a posição de cada objeto no plano é utilizada para relacionar as amostras entre si. \mathbf{P} representa a matriz das variáveis (contribuições fatoriais) e indicam quais as variáveis que contribuem para a separação dos diferentes grupos (77). \mathbf{E} , que não se encontra representado no modelo da Figura 13, revela a distância entre os diferentes pontos e a sua projeção no plano (77).

Para além do método de PCA existem outros métodos não supervisionados como a análise hierárquica de agrupamentos (*clusters*) (HCA) que permite a interpretação de características em espaço de visualização bidimensional em função de uma dada métrica e agrupamento.

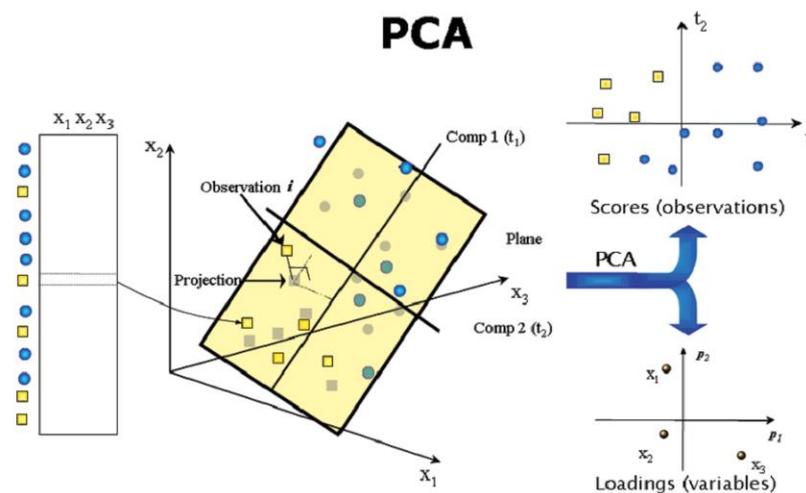


Figura 13. Representação do modelo PCA. (adaptado da referência 78).

A abordagem supervisionada utiliza um conjunto de dados de amostras rotuladas para construir um modelo estatístico que possa inferir corretamente o rótulo de uma amostra a partir das variáveis (“feature vector”). Os métodos que constituem esta abordagem podem ser divididos em dois tipos, aqueles que determinam uma classe (classificação) e aqueles que um valor numérico corresponde a um parâmetro desejado (regressão) (76). Deste tipo de abordagem fazem parte a regressão em mínimos quadrados parciais, do inglês “partial least-squares” (PLS), e a projeção ortogonal de estruturas latentes, do inglês “orthogonal partial least-squares” (OPLS). O método de PLS estabelece uma relação quantitativa entre

uma matriz \mathbf{X} , que normalmente compreende dados espectrais ou cromatográficos de um conjunto de amostras de calibração, e uma matriz \mathbf{Y} , que contem valores quantitativos (ex.: concentrações de metabolitos). Este método maximiza a covariação entre as variáveis explicativas (\mathbf{X}) e a resposta (\mathbf{Y}). O modelo de PLS pode ser expresso pelas seguintes expressões: $X = TP^T + E$ e $Y = TC^T + F$ (78).

O método de OPLS corresponde a uma modificação do PLS. Este método separa a variação sistêmica existente nas variáveis explicativas em duas partes, uma que é linearmente relacionada com a resposta e outra que não esta relacionada (ortogonal) com a resposta (78). Esta separação permite uma fácil interpretação do modelo por parte do utilizador e uma melhor separação dos dados. Este método remove os dados da matriz \mathbf{X} que não estão associados com a matriz \mathbf{Y} e compreende duas componentes: o \mathbf{Y} preditivo e o \mathbf{Y} ortogonal.

A Figura 14 ilustra os modelos PLS e OPLS e as respetivas diferenças. O modelo de PLS não consegue separar perfeitamente a variação existente entre as classes da variação existente intra-classes, enquanto o modelo de OPLS consegue separar essas duas variações.

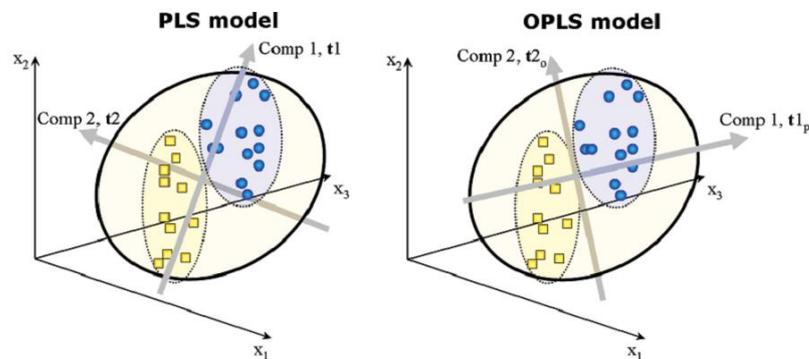


Figura 14. Representação esquemática do modelo PLS (esquerda) e do modelo OPLS (direita). A componente 1 (t_{1p}) é a componente preditiva e representa a variação entre as classes ([círculos azuis], [círculos amarelos]). A componente 2 (t_{2o}) é a componente \mathbf{Y} ortogonal (adaptado da referência 76).

Tanto o método de PLS como o método de OPLS podem ser utilizados em análise discriminante sobre a forma de PLS-DA e OPLS-DA. A análise discriminante utiliza vetores binários (0 e 1) para representar variáveis (75).

1.4 Objetivos

Esta tese de mestrado compreende os seguintes objetivos:

1. Comparar e avaliar a eficiência e reprodutibilidade de diferentes métodos de extração lipídica do plasma materno por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H ;
2. Uma vez escolhido o melhor método de extração, analisar amostras de plasma recolhidas no 2º trimestre de gravidez de senhoras a) que terminaram a gravidez sem problemas (controlos), b) com fetos afetados por trissomia 21 e c) que desenvolveram diabetes gestacional, assim como amostras de plasma do 1º trimestre de gravidez de senhoras com fetos afetados por trissomia 21, para identificar possíveis marcadores sanguíneos lipídicos de trissomia 21 e diabetes gestacional para o uso no diagnóstico pré-natal precoce utilizando como técnica analítica a espectroscopia de RMN.

2. Materiais e métodos

2.1 Colheita e armazenamento de amostras

As amostras de sangue foram colhidas em mulheres grávidas no 1º e 2º trimestres de gravidez durante as respetivas consultas de médicas de rotina na Maternidade Bissaya Barreto, na cidade de Coimbra, sob a aprovação da comissão de ética do Centro Hospitalar de Coimbra (Refs. 18/04 e 29/09) e com o consentimento de cada participante. Devido a limitações médicas em controlar a dieta das mulheres grávidas, todas as amostras de plasma foram colhidas a meio da manhã. Todas as gravidezes foram seguidas até ao termo, onde as várias amostras foram definidas de acordo com as suas características clínicas: a) controlos (gravidezes que terminaram sem qualquer complicação), b) diagnosticadas com trissomia 21 (T21) (duas semanas depois da amniocentese) e c) diagnosticadas com diabetes mellitus gestacional (pós-DMG) (diagnóstico realizado por um teste de tolerância de 75g de glucose, realizado depois de um jejum noturno). O número de amostras, idade materna, idade gestacional e o índice de massa corporal (IMC) antes da gravidez encontram-se listados na Tabela 16.

Tabela 16. Amostras dos grupos controlo, DMG e T21 utilizadas neste estudo com as respetivas idades maternas, idade gestacional e o IMC antes da gravidez

Característica Clínica	Nº de amostras	Idade Materna (anos) (idade média)	Idade gestacional (semanas) (média)	IMC (média)
Controlos (1º trimestre)	15	24-37 (30,9)	12-13 (12,5)	21,6 – 34,9 (25,5)
Controlos (2º trimestre)	15	28-42 (37,2)	16-22 (17,2)	20-26 (22,3)
Pós-DMG (2º trimestre)	12	18-41 (32,9)	17-27 (25,1)	18-36 (25,7)
T21 (1º trimestre)	7	32-44 (37,3)	12-13 (12,6)	20,9-31,1 (24,5)
T21 (2º trimestre)	13	26-43 (36,8)	16-18 (18,8)	22-33 (26,5)

O sangue total (9 mL) foi colhido para tubos de heparina de sódio e centrifugado (1500 x g, 4°C, 10 min) no espaço de 30 minutos após a colheita. Os sobrenadantes foram congelados a -20 °C durante cerca de 2 horas, sendo de seguida armazenados a -80 °C.

2.2 Métodos de extração lipídica

2.2.1 Seleção do melhor método de extração de lípidos do plasma

A extração de lípidos do plasma foi realizada utilizando uma mistura contendo 10 amostras controlos, 660 µL cada amostra, divididas em alíquotas de 220 µL. Para cada método foram feitas 5 extrações.

Método 1 (66,69): Folch – Num tubo de vidro, foram adicionados 200 µL de plasma e 1,5 mL de metanol (MeOH) (-20 °C), seguida de agitação no vórtex durante 60 segundos. De seguida foram adicionados 3 mL de clorofórmio (CHCl₃) (-20 °C) e a mistura foi agitada no vórtex durante 60 segundos e incubada em gelo durante 1 hora. Após incubação, foram adicionados 1,25 mL de H₂O ultrapura para induzir a separação das fases, seguida de incubação em gelo durante 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos e a fase orgânica inferior foi extraída e recolhida para um novo tubo. A fase aquosa superior foi ré-extraída com adição de 2 mL de uma mistura clorofórmio: metanol (CHCl₃:MeOH; 2:1, v/v). As diferentes fases orgânicas foram combinadas e secas sob fluxo de azoto. De seguida foram adicionados 100 µL de CHCl₃:MeOH (2:1, v/v) (x3). Os extratos lipídicos foram transferidos para “vials” de 2 mL, secos sob fluxo de azoto e armazenados a -80 °C, até o momento da análise por RMN.

Método 2 (69,86): Bligh e Dyer – Num tubo de vidro, foram adicionados 200 µL de plasma e 1,0 mL de H₂O ultrapura, seguida de agitação no vórtex. De seguida foram adicionados 1,5 mL de clorofórmio (CHCl₃) (-20 °C) e a mistura foi agitada vórtex durante 60 segundos. Após agitação foram adicionados 3 mL de metanol (MeOH) (-20 °C) a mistura, seguida de agitação no vórtex durante 60 segundos. A mistura foi incubada em gelo durante 1 hora. Após incubação, foram adicionados 1,5 mL de CHCl₃ seguida de 1,5 mL de H₂O ultrapura para induzir a separação das fases, seguida de incubação em gelo durante 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos e a fase orgânica inferior foi extraída e recolhida para um novo tubo. A fase aquosa superior foi ré-extraída com adição de 1,5 mL CHCl₃. As diferentes fases orgânicas foram combinadas e secas sob fluxo de azoto. De seguida foram adicionados 100 µL de CHCl₃:MeOH (2:1, v/v) (x3). Os extratos lipídicos foram transferidos para “vials” de 2 mL, secos sob fluxo de azoto e armazenados a -80 °C, até o momento da análise por RMN.

Método 3 (69,87): Bligh e Dyer acidificado – Num tubo de vidro, foram adicionados 200 µL de plasma e 1,0 mL de H₂O ultrapura, seguida de agitação no vórtex. De seguida, foram adicionados 1,5 mL de clorofórmio (CHCl₃) (-20 °C) e a mistura foi agitada no vórtex durante 60 segundos. Após agitação, foram adicionados 3 mL de metanol (MeOH) (-20 °C) a mistura, seguida de agitação no vórtex durante 60 segundos. A mistura foi incubada em gelo durante 1 hora. Após incubação, foram adicionados 1,5 mL de CHCl₃ seguida de 1,5 mL de H₂O ultrapura para induzir a separação das fases, seguida de incubação em gelo durante 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos e a fase orgânica inferior foi extraída e recolhida para um novo tubo. A fase aquosa superior foi ré-extraída com adição de 1,5 mL de CHCl₃, seguida da adição de 7,5 µL de uma solução de HCl 6M. As diferentes fases orgânicas foram combinadas e secas sob fluxo de azoto. De seguida foram adicionados 100 µL de CHCl₃:MeOH (2:1, v/v) (x3). Os extratos lipídicos foram transferidos para “vials” de 2 mL, secos sob fluxo de azoto e armazenados a -80 °C, até o momento da análise por RMN.

Método 4 (66,69): Éter metil-tert-butílico (MTBE) - Num tubo de vidro, foram adicionados 200 µL de plasma e 1,5 mL de metanol (MeOH) (-20 °C), seguida de agitação no vórtex durante 60 segundos. De seguida foram adicionados 5 mL de MTBE (-20 °C) e a mistura foi agitada no vórtex durante 60 segundos. A mistura foi incubada em gelo durante

1 hora. Após incubação, foram adicionados 1,25 mL de H₂O ultrapura para induzir a separação das fases, seguida de incubação em gelo durante 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos e a fase orgânica superior foi extraída e recolhida para um novo tubo. A fase aquosa inferior foi ré-extraída com adição de 2 mL de uma mistura de MTBE:MeOH:H₂O (10:3:2.5, v/v/v). As diferentes fases orgânicas foram combinadas e secas sob fluxo de azoto. De seguida foram adicionados 100 µL de CHCl₃:MeOH (2:1, v/v) (x3). Os extratos lipídicos foram transferidos para “vials” de 2 mL, secos sob fluxo de azoto e armazenados a -80 °C, até o momento da análise por RMN.

Método 5 (69,88): Hexano-isopropanol - Num tubo de vidro, foram adicionados a 200 µL de plasma e 1,8 mL da mistura de hexano: isopropanol (3:2, v/v) (-20 °C), seguida de agitação no vórtex durante 60 segundos. A mistura foi incubada em gelo durante 1 hora e centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos. Após centrifugação houve formação de um “pelet”. A fase orgânica superior foi extraída e recolhida para um novo tubo. O “pelet” foi ré-extraído com adição de 800 µL de uma mistura de hexano:isopropanol (3:2, v/v). As diferentes fases orgânicas foram combinadas e secas sob fluxo de azoto, e são adicionados 100 µL de CHCl₃:MeOH (2:1, v/v) (x3). Os extratos lipídicos foram transferidos para “vials” de 2 mL, secos sob fluxo de azoto e armazenados a -80 °C, até o momento da análise por RMN.

2.2.2 Estudo de doenças

Para o estudo das doenças foi utilizado o método de MTBE acima descrito e cada amostra foi dividida em duas alíquotas e extraída duas vezes.

2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H: aquisição de dados e processamento

Os espectros de RMN foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance DRX500 equipado com uma sonda inversa de ressonância tripla (TXI). Os espectros de RMN 1D foram adquiridos a 298 K utilizando uma sequência de pulsos de próton (zg) padrão com um pulso de 90°. O número de varrimentos foi 128, o número de varrimentos teste foi 4, a largura espectral (SW) foi 7002,801 HZ e o número de pontos foi 32 K. Para extratos lipídicos com diferentes métodos de extração, o tempo de aquisição foi 2,34 segundos com um tempo de relaxação (d1) de 16 segundos (5x o tempo de relação longitudinal (T1) máximo (3,2 s) obtido para TMS). Para os extratos lipídicos dos controlos e doenças, o

tempo de aquisição foi 2,34 segundos com um tempo de relaxação de 5 segundos. Cada FID foi preenchido com zeros até 64 K pontos, multiplicado por uma função exponencial de ampliação linear de 0,3 Hz antes da transformada de Fourier. A fase e a linha de base dos espectros foram manualmente ajustados e corrigidos e os desvios químicos foram referenciados internamente ao TMS à $\delta = 0.0$ ppm utilizando o programa Topspin 3.2 (Bruker Biospin, Reinstetten, Alemanha). Os espectros de RMN 2D adquiridos para o assignment foram “Total Correlation Spectroscopy” (TOCSY), “Heteronuclear Single Quantum Coherence” (HSQC) e “J-resolved” (J-res). O espectro TOCSY foi adquirido em modo fase-sensitivo utilizando a detecção States-TPPI (incremento da fase proporcional ao tempo) com uma sequência DIPSII 2. Foram registrados 256 FIDs com 4096 pontos complexos por incremento, com uma largura espectral de 7002,801 Hz em ambas as direções, tempo de mistura de 70 ms e um tempo de relaxação de 2 s. Espectros de ^1H - ^{13}C HSQC foram adquiridos com detecção inversa e desacoplamento ^{13}C durante a aquisição. Foram registrados 128 FIDs com 2048 pontos complexos por incremento, largura espectral com dimensões de 7002,801 e 20831,980 Hz para ^1H e ^{13}C , respectivamente, e um tempo de relaxação de 2 s. Os espectros JRES foram adquiridos num modo de magnitude utilizando um total de 40 FIDs com 8192 pontos complexos, largura espectral com dimensões de 7002,801 e 43,411 Hz em ^1H (F2) e acoplamento J (F1), respectivamente, e um tempo de relaxação de 2 s.

2.4 Pré-processamento e análise dos dados de RMN

Depois da aquisição e processamento dos espectros, os dados foram organizados em matrizes, no programa AMIX, e deu-se início ao pré-processamento (Figura 15). Para a construção das matrizes o desvio químico utilizado foi 0,45 – 6,5 ppm e foram removidos os sinais de contaminantes (solventes de extração) como o MTBE (1,17 – 1,20 ppm e 3,19 – 3,23 ppm), metanol (3,48 – 3,50 ppm) e a água residual (1,61 -1,97 ppm). De seguida os dados foram alinhados, utilizando o algoritmo “recursive segment-wise peak alignment” (RSPA), e normalizados, utilizando o “probabilistic quotient normalization” (PQN) e normalização área total, no programa MATLAB versão 7.10.0. O alinhamento consiste em corrigir a posição das ressonâncias pertencentes aos mesmos grupos químicos para que estes assumam a mesma posição (desvio químico) ao longo do espectro. A normalização permite corrigir diferenças de diluição entre amostras tornando os dados de todas as amostras diretamente comparáveis entre si (89). A normalização PQN utiliza o espectro

mediano de um conjunto de espectros (por exemplo: controlos) como referência e calcula o quociente mais provável entre os restantes espectros e o espectro mediano, posteriormente é calculada a mediana dos quocientes e todos os espectros são divididos por esta mediana. A normalização por área total divide cada sinal do espectro pela área do espectro inteiro, assim cada sinal é normalizado pela área total do espectro (89). A normalização PQN é considerada como sendo o melhor método de normalização visto que mantem a originalidade dos dados, podendo a normalização por área total afetar negativamente a análise multivariada e isto acontece porque por exemplo, se um sinal possui uma área muito pequena e é dividida por uma área muito grande, iremos obter um valor muito pequeno podendo levar ao desaparecimento do sinal e assim afetar a análise multivariada (89,90).

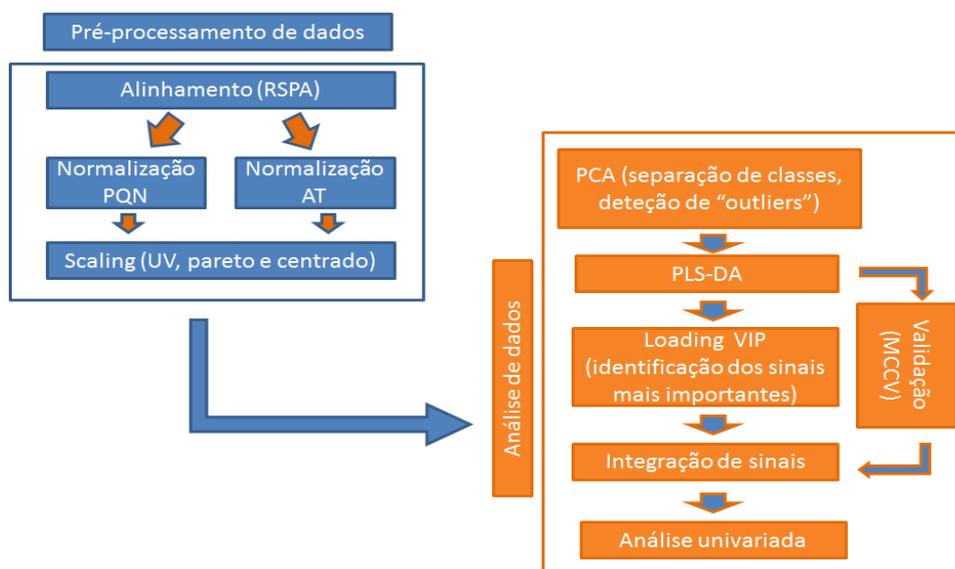


Figura 15. Representação esquemática do pré-processamento e da análise dos dados obtidos por RMN de ^1H . RSPA: recursive segment-wise peak alignment; PQN: Probabilistic quotient normalization; AT: área total; UV: unit variance; VIP: variable importance to the projection; MCCV: Monte-Carlo cross validation.

Uma vez feito o pré-processamento, passou-se à análise multivariada, que foi realizada usando o programa SIMCA 11.5. As matrizes alinhadas e normalizadas pela normalização PQN e área total foram submetidas a três tipos de “scaling”: UV, Pareto e centrado. O “scaling” UV divide cada variável centrada pela média, pelo seu desvio padrão. No centrado, cada variável é subtraída pela média de todas os valores. O “scaling” Pareto corresponde a um tratamento de dados de magnitude intermédia ente o scaling UV e o

centrado e divide cada variável centrada pela média pela raiz quadrada do desvio padrão (91). Para cada tipo de “scaling”, foi construído um modelo de PCA, seguido de um modelo de PLS-DA. A avaliação dos modelos foi feita tendo em conta os valores da variância explicada de X (variáveis) (R^2X), da variância explicada de Y (classes) (R^2Y) e do “cross validated R^2 ” ou poder preditivo do modelo (Q^2). A razão entre o R^2X e R^2Y deve ser pequena porque um valor pequeno de R^2X indica que, para a construção do modelo as classes tiveram uma maior relevância do que os espectros. Quanto maior o valor de Q^2 , melhor é a discriminação entre as duas classes. O melhor modelo escolhido foi aquele que apresentava um maior valor de Q^2 .

Depois da escolha do melhor modelo de PLS-DA para os dois tipos de normalização, prosseguiu-se a validação dos modelos pelo método de validação cruzada de Monte-Carlo (MCCV). O método de MCCV consiste em separar os dados em dois conjuntos: treino e previsão, em que o último é utilizado na previsão das classes. Este método realiza 500 interações e calcula para cada interação o valor de Q^2 e matrizes de confusão (sensitividade e especificidade). O método de MCCV pode ser repetido para as classes permutadas, ou seja, a matriz Y é permutada aleatoriamente e se o modelo for robusto uma separação completa de classes de verdadeiras e permutadas pode ser observada no gráfico de ROC (92,93). As taxas de classificação, especificidade e sensitividade foram calculadas e o poder preditivo de cada modelo foi avaliado usando um gráfico “receiver operating characteristic” (ROC), em função da taxa dos verdadeiros positivos (TPR ou sensitividade), e taxa dos falsos positivos (FPR ou 1 especificidade). Os modelos de PLS-DA foram considerados robustos quando a existência de sobreposição entre as classes verdadeiras e permutadas na distribuição de Q^2 fosse mínima (94).

Com o objetivo de remover as variáveis irrelevantes para o modelo, aumentar o poder preditivo e melhorar as propriedades estatísticas fez-se a seleção de variáveis, baseando na interseção dos três métodos: importância das variáveis na projeção ($VIP > 1$), variáveis associados a valores baixos de erro padrão em relação com VIP ($VIP_{cvSE} > 1$) e coeficientes de regressão ($|b/b_{cvSE}| > 1$).

A análise univariada foi realizada no programa R 3.0.3. Para comparar os dois grupos de estudo (controles e doenças) foi aplicado o teste de hipótese Wilcoxon que pode ser utilizado tanto para os dados que seguem distribuição normal como para os dados com distribuição não normal. Foi definida uma hipótese nula (diferenças médias iguais a 0) e

uma hipótese alternativa (diferenças médias diferentes de 0). Para valores de p obtidos inferiores a 0,05, a hipótese alternativa é confirmada para um intervalo de confiança de 95%. Ou seja, as diferenças entre os dois grupos em estudo são estatisticamente significativas. Para verificar a magnitude das diferenças entre os dois grupos, foram calculados o “effect size” para diferenças das médias padronizadas (ES_{smd}) e a percentagem de variação. Para valores de ES_{smd} iguais ou superiores a 0,20 a magnitude da diferença não é significativa; ES_{smd} iguais ou superiores a 0,50 são considerados médios e ES_{smd} iguais ou superiores a 0,80 são considerados significativos (95). A % de variação e o erro associado foram calculados dos seguintes modos: $\% \text{ variação} = ((x_D - x_C)/x_C) \times 100\%$ e $\text{erro} (\%) = \left(\sqrt{\left(\frac{\sigma_C^2}{n_C} + \frac{\sigma_D^2}{n_D} \right) / (n_C \times x_C + n_D \times x_D) / (n_C + n_D)} \right) \times 100\%$, respetivamente, onde x_D corresponde a média dos integrais normalizados para cada metabolito no grupo doença, x_C a média dos integrais normalizados do grupo dos controlos, σ_C e σ_D os desvios padrão das amostras controlos e doenças e n_C e n_D o número de amostras controlo e doença.

3. Resultados e discussão

3.1 Extração de lípidos do plasma: escolha do melhor método de extração

Para a escolha do melhor método de extração foram considerados dois critérios: a reprodutibilidade do método e a qualidade dos espetros de RMN de 1H . Numa primeira fase da análise de dados fez-se, por inspeção visual, uma análise detalhada dos espetros lipídicos de cada um dos métodos, com o objetivo de identificar semelhanças/diferenças entre eles. A Figura 16 representa um espetro de cada método.

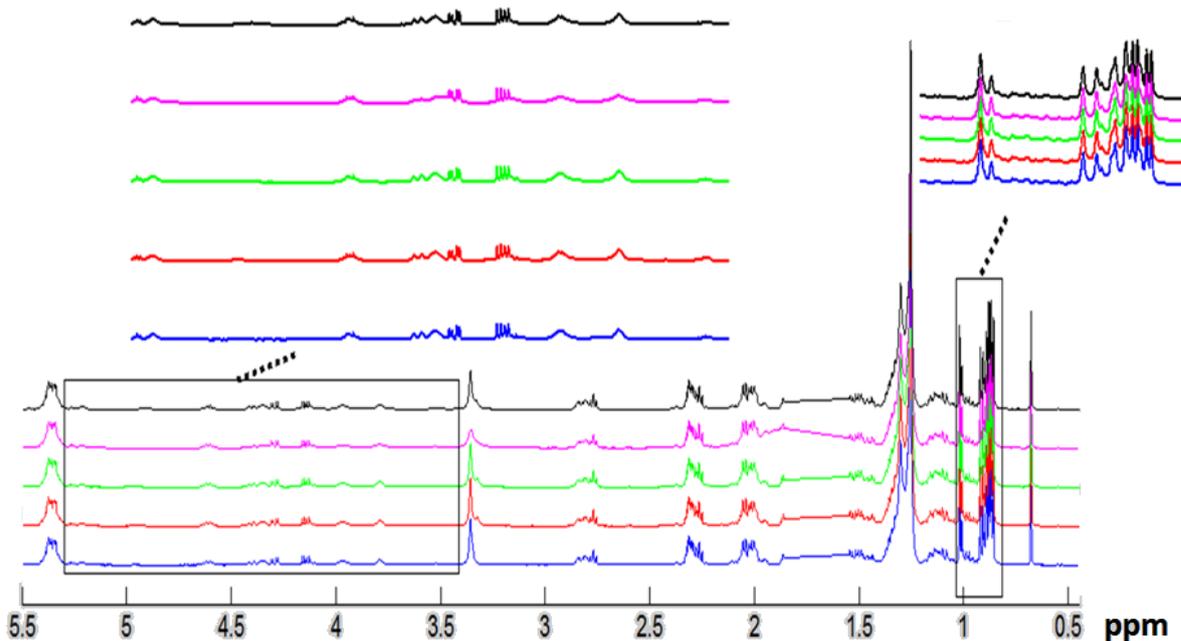


Figura 16. Espectros de RMN correspondente aos cinco métodos avaliados neste estudo. Preto – Método de MTBE; Roxo – Método de hexano-isopropanol; Verde – Método de Folch; Vermelho – Método de Bligh e Dyer; Azul – Método de Bligh e Dyer acidificado.

De seguida, passou-se a análise multivariada dos espectros de RMN de ^1H , previamente alinhados e normalizados (por normalização PQN e área total) para comparação. O resultado desta análise resultou em modelos de PCA com três tipos de “scaling”: UV, Pareto e centrado. Na figura 17 encontram-se representados os “score plot” dos modelos de PCA obtidos com normalização PQN.

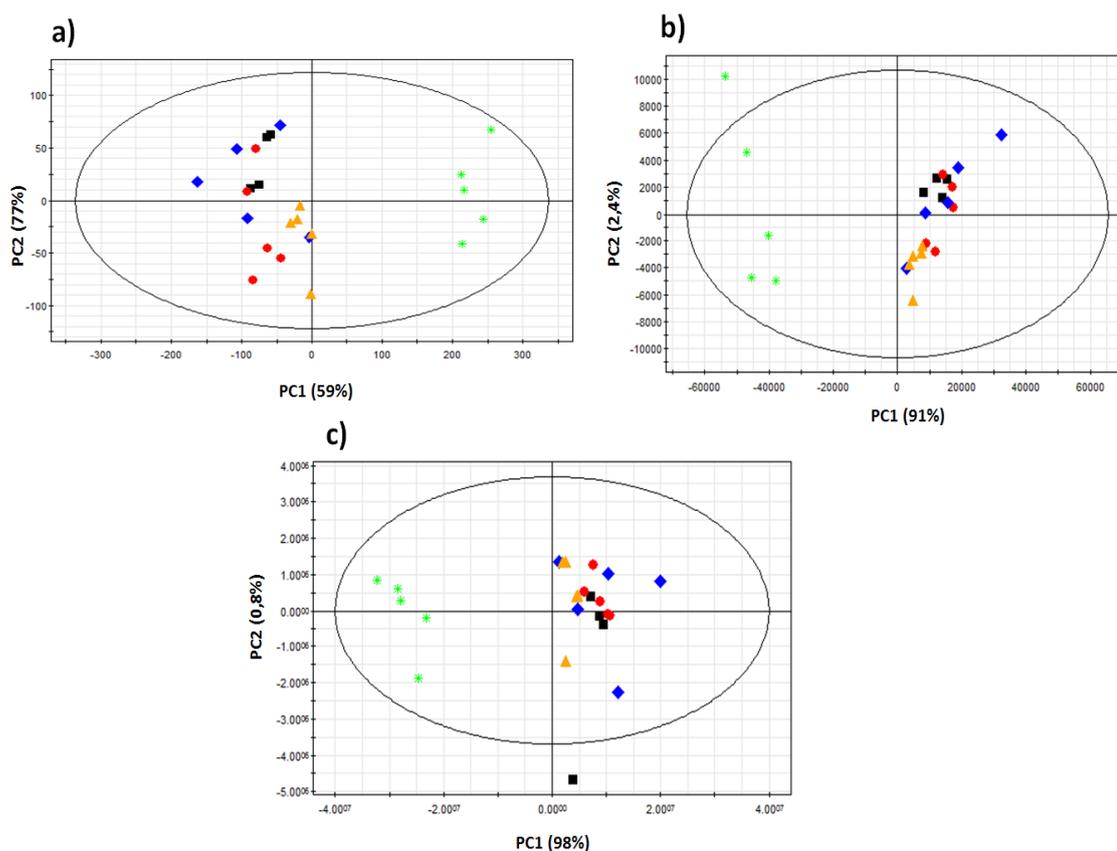


Figura 17. Análise multivariada métodos de extração de lípidos do plasma. a) PCA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV ($R^2X = 0,821$, $Q^2 = 0,597$); b) PCA de coordenadas de fatoriais com “scaling” Pareto ($R^2X = 0,965$, $Q^2 = 0,905$); c) PCA de coordenadas fatoriais centrado ($R^2X = 0,995$, $Q^2 = 0,985$). Preto – método de Bligh e Dyer acidificado, Vermelho – Método de Bligh e Dyer, Azul – Método de Folch, Verde – Método de Hexano-isopropanol, Laranja – Método de MTBE.

A reprodutibilidade dos métodos foi avaliada pela distância entre os pontos correspondentes ao mesmo método, isto é, o método com maior reprodutibilidade é aquele que apresenta maior proximidade entre as amostras no modelo de PCA. Observando os gráficos score do modelo PCA pode-se concluir que os métodos Bligh e Dyer e MTBE são os mais reprodutíveis, uma vez que as amostras correspondentes a estes métodos encontram-se mais próximos nos modelos de PCA. Para avaliar melhor as diferenças entre os métodos foram elaborados gráficos das contribuições fatoriais que encontram-se representados na Figura 18. A análise das contribuições fatoriais permite-nos ver principalmente as diferenças entre o método hexano-isopropanol (em PC1 negativo)

relativamente aos outros métodos (em PC1 positivo), de onde pode-se concluir que o método hexano-isopropanol extrai menor quantidade de lípidos do que os restantes métodos, daí o facto de este método aparecer mais afastado dos outros no modelo score do PCA. Os restantes métodos correspondem as amostras que se situam mais próximos umas das outras devido ao facto destes métodos extraírem as mesmas classes lipídicas variando apenas na eficiência da extração e na reprodutibilidade. Segundo Reis et al. (69) o método de Folch é o método mais adequado para extração de sulfatos de colesterol, triglicéridos, esterres de colesterol, ácidos gordos saturados, fosfatidilinositois e fosfatidiletanolaminas. O método de Bligh e Dyer extrai com maior eficiência as fosfatidiletanolaminas e possui eficiência extrativa semelhante ao método de Folch para fosfatidilcolinas esterres de colesterol, e triglicéridos. O método de Bligh e Dyer acidificado extrai com maior eficiência as classe lipídicas mais polares como os sulfatos de colesterol, lactosilceramidas, fosfatidiletanolaminas, esfingomiélinas, fosfatidilcolinas e lisofosfatidilcolinas. E por último temos o MTBE que é um dos métodos mais adequados para a extração de triglicéridos, lactosilceramidas, fosfatidiletanolaminas e fosfatidilcolina. Extrai com maior eficiência do que o método de Folch e Bligh e Dyer as esfingomiélinas e lactosilceramidas (69) e extrai fosfatidilcolinas, lisofosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, lisofosfatidiletanolaminas, ceramidas, esfingomiélinas, esterres de colesterol, diacilglicéris e triglicéridos como mesma recuperação que os métodos com clorofórmio (66).

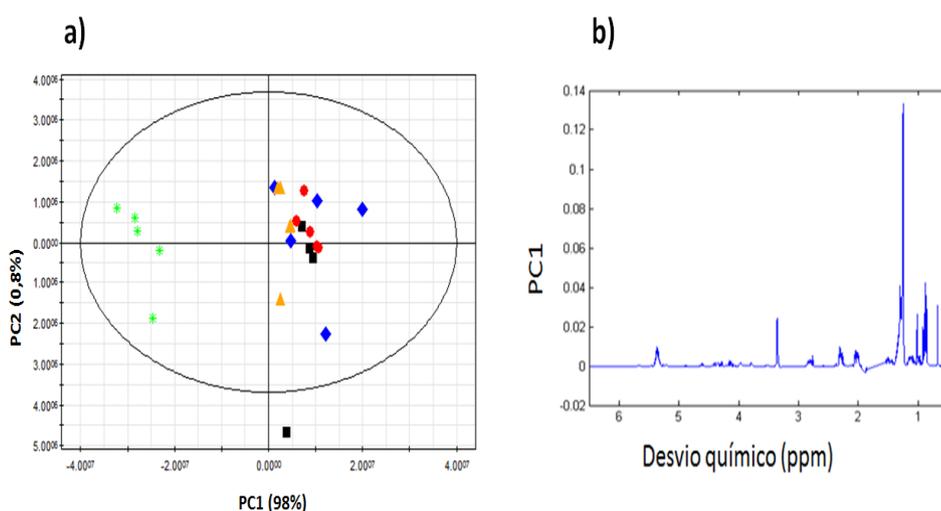


Figura 18. Análise multivariada dos métodos de extração de lípidos do plasma. Modelos de PCA “score” (a) e “loading” (b) centrado ($R^2X = 0,995$, $Q^2 = 0,985$). Preto –

método de Bligh e Dyer acidificado, Vermelho – Método de Bligh e Dyer, Azul – Método de Folch, Verde – Método de Hexano-isopropanol, Laranja – Método de MTBE.

O resultado obtido pelos modelos de PCA pode ser confirmado por inspeção visual dos espectros de RMN, onde é possível ver que os métodos de Bligh e Dyer, de Bligh e Dyer acidificado e de MTBE possuem espectros sobreponíveis, com intensidades semelhantes (Figura 19). O método de Folch é o método que apresenta espectros mais intensos, embora não seja reprodutível. O método de hexano-isopropanol é o método que difere mais dos restantes possuindo espectros pouco intensos. Isto acontece devido ao facto deste método extrair menores quantidades de lípidos em relação aos outros métodos.

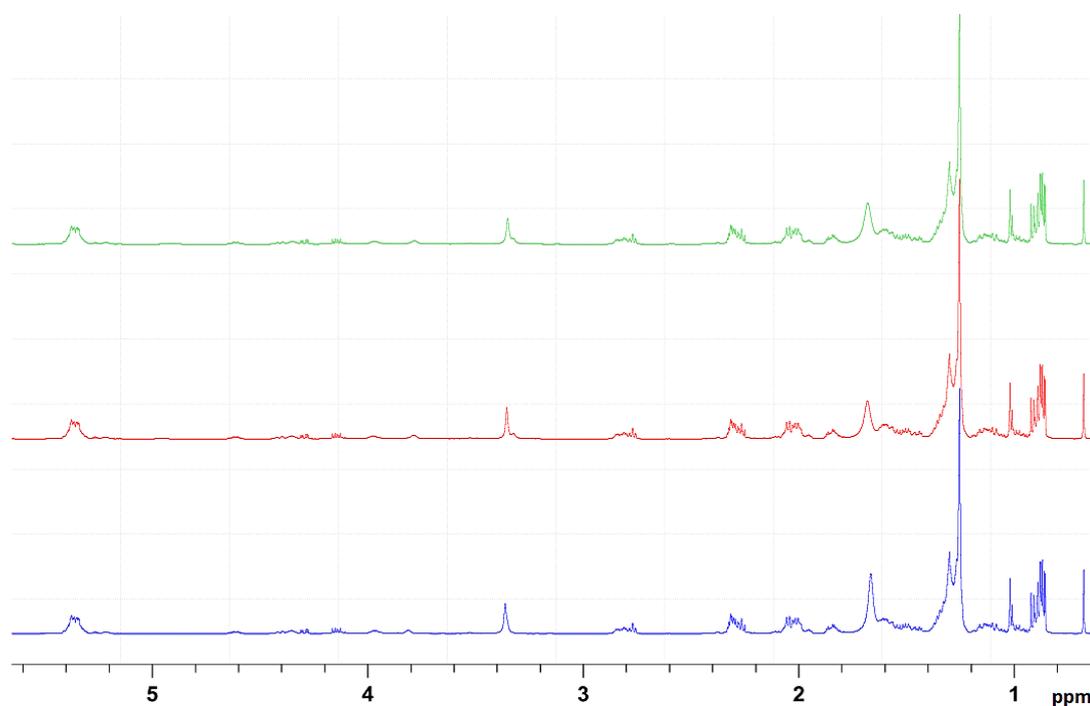


Figura 19. Representação da semelhança extrativa dos métodos de extração de MTBE (verde), de Bligh e Dyer (vermelho) e de Bligh e Dyer acidificado (azul).

Para confirmar estes resultados calculou-se o valor de coeficiente de variação para as famílias de lípidos (fosfolípidos, colesterol e triglicéridos) em cada método. Os resultados encontram-se representados na Tabela 17.

Tabela 17. Comparação valores de coeficiente de variação dos cinco métodos na extração das diferentes famílias lipídicas

Método	Metabolitos	Coefficiente de variação (%)
MTBE	Fosfolípidos	0,9
	Colesterol	1,6
	Triglicéridos	2,3
Bligh & Dyer	Fosfolípidos	3,2
	Colesterol	2,5
	Triglicéridos	5,5
Folch	Fosfolípidos	9,6
	Colesterol	7,5
	Triglicéridos	5,5
Hexano-isopropanol	Fosfolípidos	8,4
	Colesterol	4,7
	Triglicéridos	3,6
Bligh & Dyer acidificado	Fosfolípidos	16,2
	Colesterol	6,2
	Triglicéridos	9,8

Com esta análise pode-se concluir que o método de MTBE é o melhor método para extração de lípidos do plasma, uma vez que possui maior reprodutibilidade, eficiência extrativa semelhante aos outros métodos e valores de coeficiente de variação menores do que os restantes métodos para os fosfolípidos, colesterol e triglicérides. O método de Folch embora possua maior eficiência extrativa em relação aos outros métodos, tem baixa reprodutibilidade. Assim sendo, para o estudo das doenças da gravidez, diabetes mellitus gestacional e trissomia 21, utilizou-se o método de MTBE.

3.1.1 Avaliação da reprodutibilidade do método

A medida que se ia avançando neste estudo notou-se, com a análise multivariada dos controlos e das doenças, que alguns extratos pertencentes à mesma amostra encontravam-se afastados um do outro no modelo de PCA (Figura 20), fazendo com que a reprodutibilidade do método, anteriormente avaliada, fosse questionada. Com o objetivo de perceber o motivo desse afastamento em cada modelo foram selecionadas amostras cujos extratos afastavam-se no modelo e seguiu-se uma análise visual dos respetivos extratos. Com esta análise foi possível verificar que havia sinais que variam entre os extratos. Estes sinais que encontram-se representados na Tabela 18.

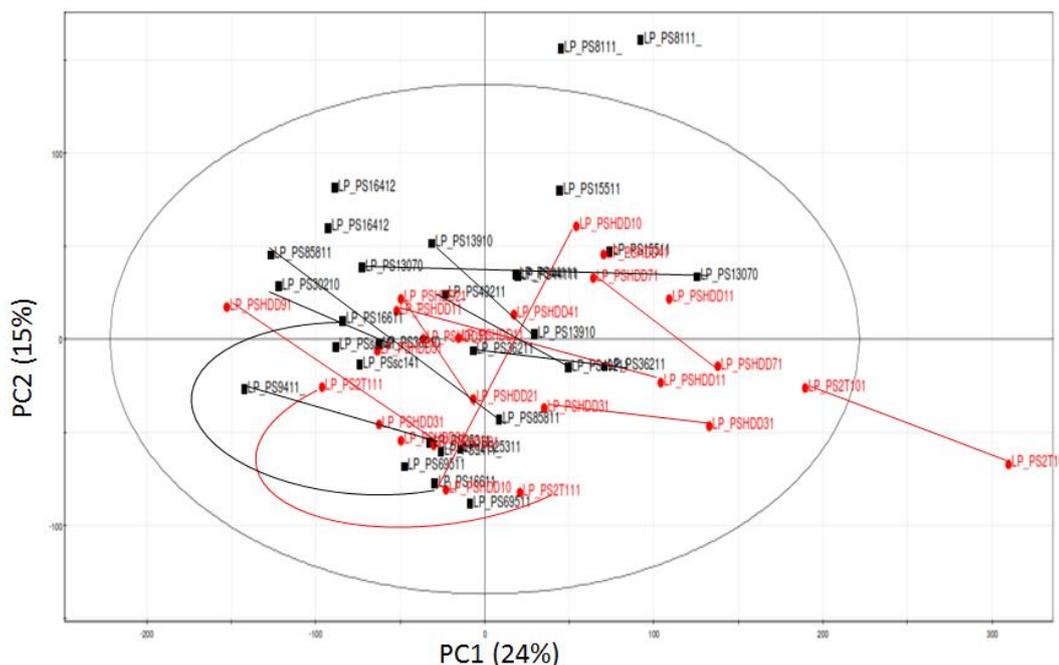


Figura 20. Modelo de PCA “score” com “scaling” UV e normalização PQN. Símbolos vermelhos – pós-DMG (n=12) e símbolos pretos – controles (n=15).

Após identificação das regiões que variam entre os extratos foi calculada a contribuição (coeficiente de variação) das amostras controles e do método MTBE na variação destas regiões (Tabela 18).

Tabela 18. Contribuição das amostras controles e do método MTBE na variação dos metabolitos que variam entre extratos da mesma amostra.

Desvio químico (ppm)	Metabolitos	Amostras controles (2 extratos para 15 amostras)	Método MTBE (5 extratos para 1 amostra)
		Coeficiente de variação (%)	
0,88-0,89	Ácidos gordos (CH ₃)	7,2	1,5
2,24-2,29	Ácidos gordos (CH ₂ CO)	6,5	1,5
5,29-5,44	Ácidos gordos (-CH=CH-)	5,4	1,3
0,84-0,87	Colesterol (C ₂₆ H ₃)/(C ₂₇ H ₃)	5,1	1,6
3,47-3,57	Colesterol (C3H)	4,8	4,5
3,22-3,41	Fosfolípidos ((⁺ NCH ₃) ₃ de fosfatidilcolina e esfingomielina))	7,5	0,9
4,31-4,42	Fosfolípidos (PO-CH ₂)	5,2	2,3
3,88-4,03	Glicerolfosfolípido (C ₃ H ₂)	6,1	1,1
4,12-4,17	Glicerol backbone (C1-H ₂ e C3-H ₂) triglicéridos	13,1	2,3

Com o cálculo do coeficiente de variação das amostras notou-se que, para cada um dos metabolitos, este valor era maior para as amostras controlos do que no método MTBE, o que era de se esperar visto que o valor de coeficiente de variação para os controlos corresponde a 15 amostras diferentes, enquanto que para o método MTBE corresponde a 5 extratos da mesma amostra.

3.2 Estudo de doenças da gravidez

3.2.1 Atribuição de sinais e interpretação dos espectros de RMN de extratos lipídicos do plasma

Com o intuito de se fazer a interpretação e a atribuição de sinais dos lípidos presentes no plasma, recorreu-se a espectros de RMN de ^1H de 1D e 2D. Nesta etapa da análise dos resultados recorreu-se a alguns trabalhos já publicados, Oostendorp et al. (68), Kriat et al. (67), entre outros (96–98), que foram de grande utilidade na identificação dos sinais.

As ressonâncias apresentadas nos espectros que se seguem encontram-se compreendidas entre 0,5 e 5,5 ppm, tendo sido removidos os sinais da referência (TMS – 0 ppm) e do solvente (clorofórmio deuterado – 7,5 ppm). Na Figura 21 encontra-se representado um espectro de extrato lipídico correspondente a uma amostra de uma mulher grávida no 2º trimestre de gravidez. Os espectros 1D de extratos lipídicos de plasma permitiram-nos a identificação de algumas classes lipídicas como colesterol e ésteres de colesterol, fosfolípidos, e ainda os ácidos gordos e triglicéridos.

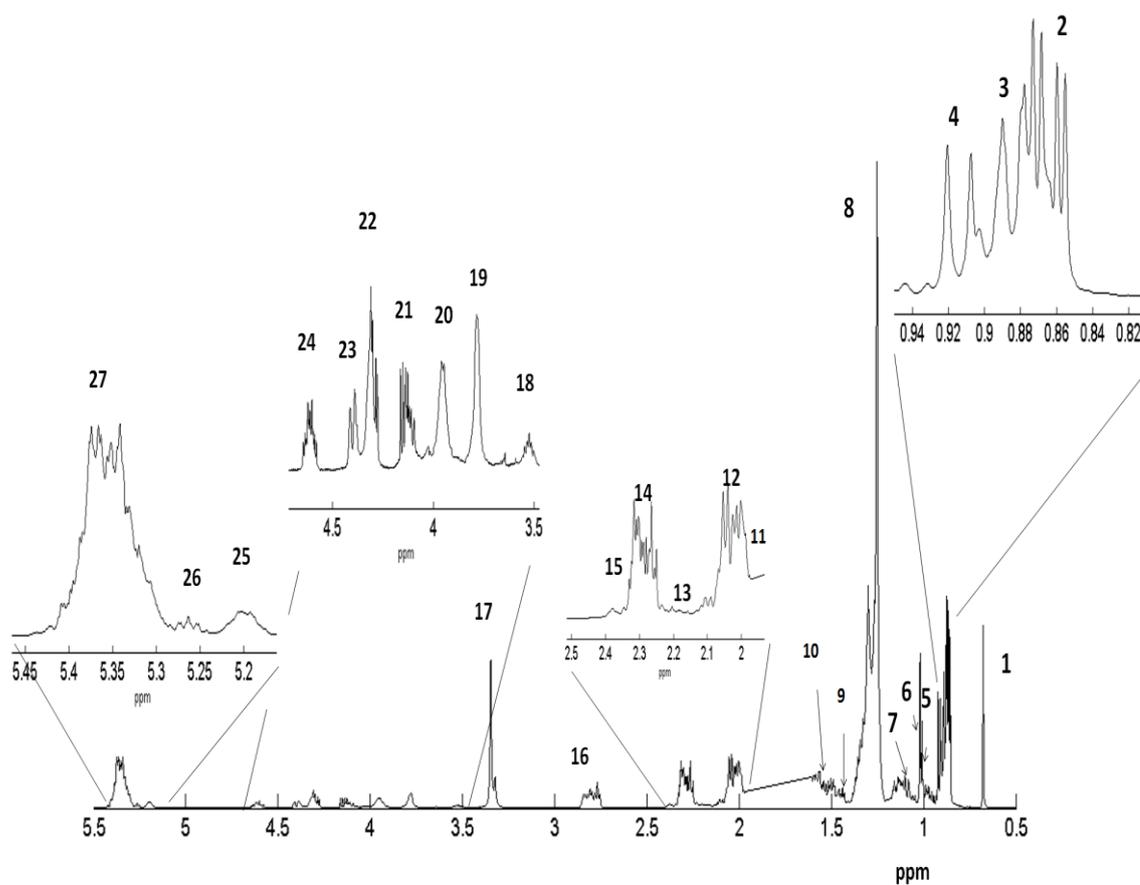


Figura 21. Espectros de RMN de ^1H de extratos lipídicos de plasma de uma mulher grávida saudável no 2º trimestre de gravidez.

Para melhorar/confirmar o “assignment” dos espectros de RMN de ^1H recorreu-se a experiências 2D. A Figura 22 representa um espectro TOCSY ^1H - ^1H de extratos lipídicos do plasma da mesma mulher grávida saudável. Neste espectro foi possível identificar prótons de ácidos gordos como os CH_2 de cadeias longas, prótons $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$, $=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $\text{CH}=\text{}$ e CH_2CO , prótons $^+\text{NCH}_3$ do grupo colina presente nos fosfolípidos e $-\text{CH}=\text{CH}-$.

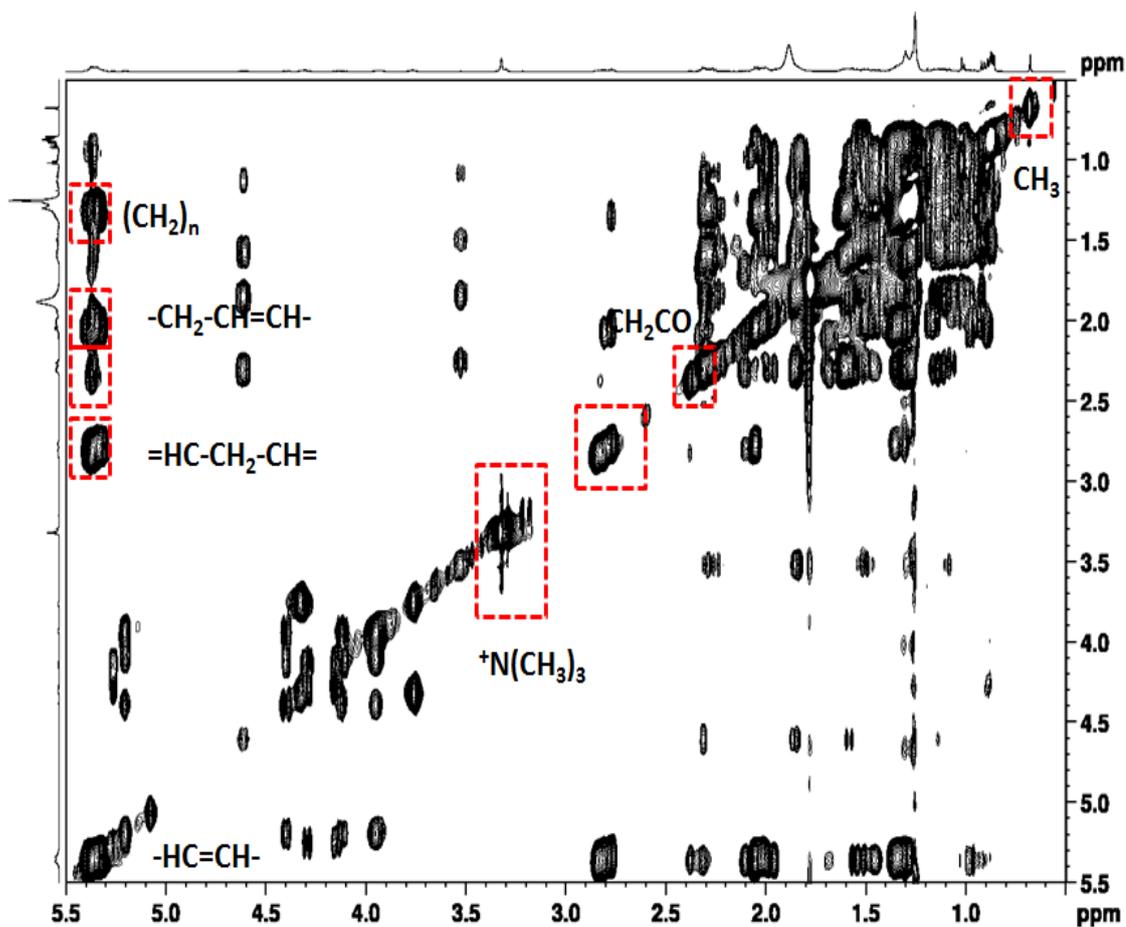


Figura 22. Espectro de TOCSY ^1H - ^1H de um extrato lipídico do plasma de uma mulher grávida saudável no 2º trimestre de gravidez.

Na Figura 23 encontra-se representado um espectro de HSQC ^1H - ^{13}C de extrato lipídico de plasma. Este espectro permite confirmar o “assignment”, de uma forma mais detalhada, dos prótons CH_3 do colesterol, os prótons CH_2 dos ácidos gordos de cadeia longa, e dos grupos $-\text{CH}_2\text{N}^+$, $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$ da colina presente nos fosfolípidos como a esfingomiélnina e a fosfatidilcolina.

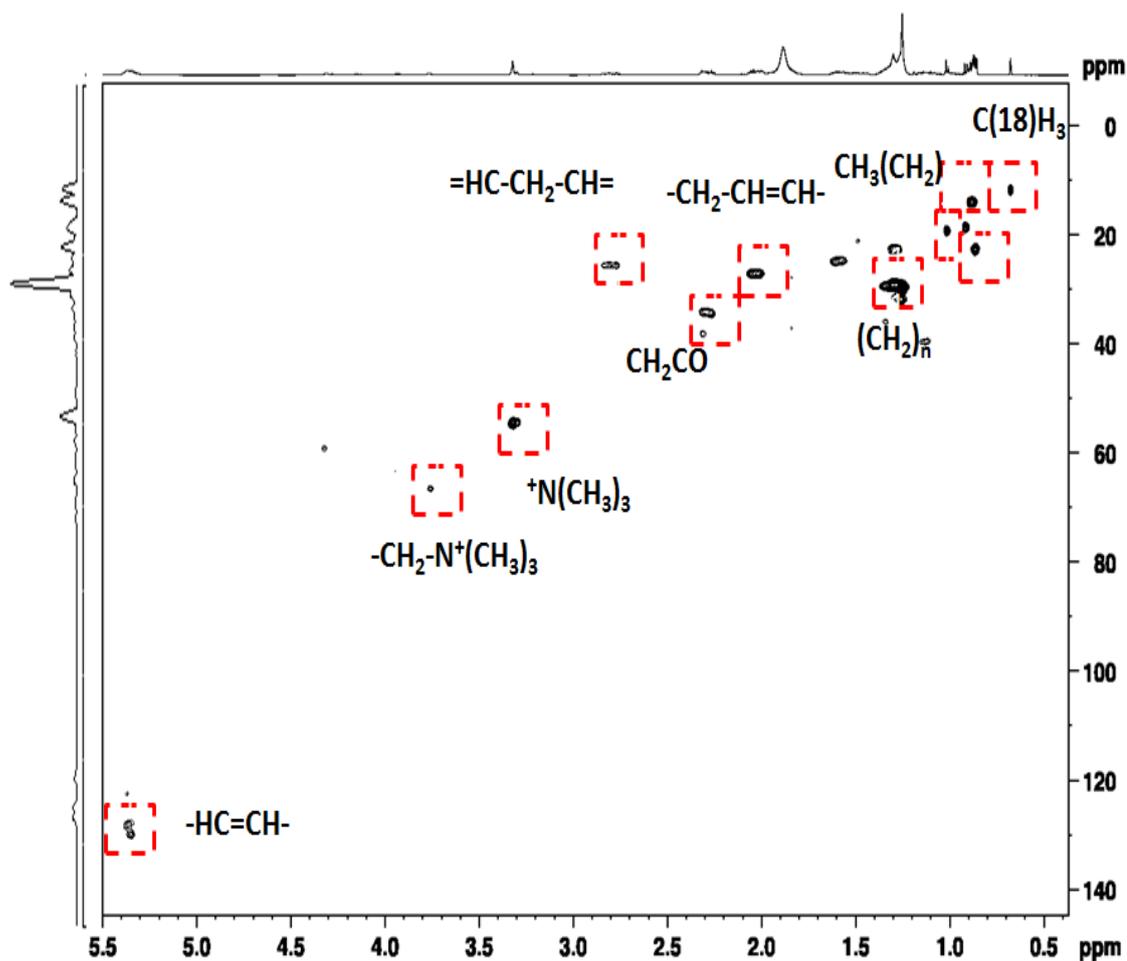


Figura 23. Espectro de HSQC ^1H - ^{13}C de um extrato lipídico do plasma de uma mulher grávida saudável no 2º trimestre de gravidez.

Para complementar os resultados obtidos por TOCSY e por HSQC, foi analisado o espectro JRES da mesma amostra. Os espectros de J-res (“J-resolved”) permitem verificar a multiplicidade dos sinais, permitindo assim confirmar os sinais previamente identificados nas experiências anteriores. Na Figura 24 encontra-se representado um espectro de JRES com a respetiva atribuição do sinal.

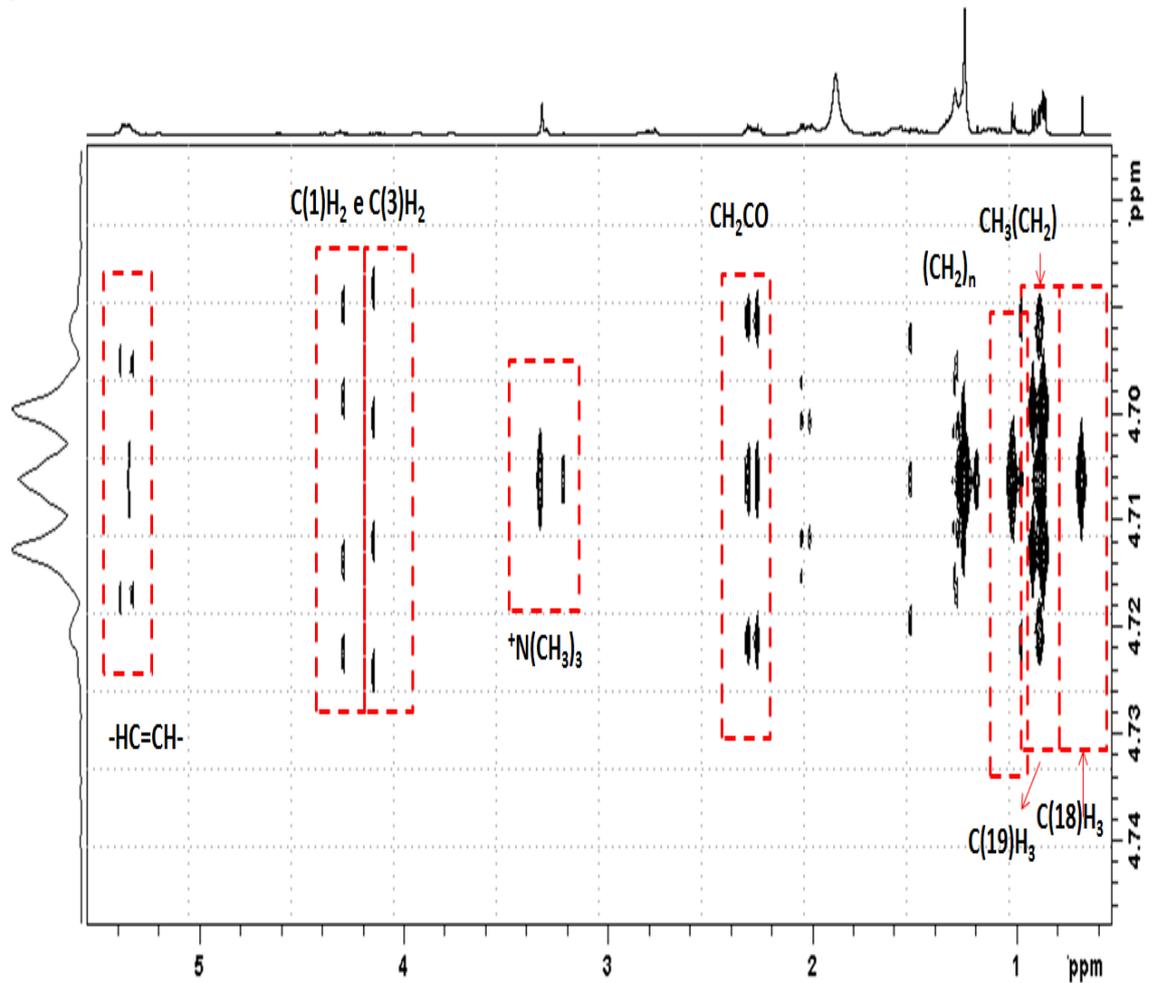


Figura 24. Espectro de RMN de J-res de ^1H de um extrato lipídico do plasma de uma mulher grávida saudável no 2º trimestre de gravidez.

Na Tabela 19 encontra-se representada a lista de todos os sinais identificados, com os respectivos desvios químicos de ^1H e de ^{13}C e a experiência onde foi possível fazer a identificação.

Tabela 19. Atribuição de sinais de extratos lipídicos do plasma de uma mulher saudável no 2º trimestre de gravidez. s – singlete; d – duplete; t – tripleto; m – multiplete.

Desvio químico de $^1\text{H/ppm}$ (multiplicidade)	Desvio químico de ^{13}C (ppm)	Atribuição de sinais	Experiência
0,67-0,70 (s)	11,84	Ésteres de colesterol e colesterol livre (C(18) H ₃)	1D; TOCSY; JRES; HSQC
0,83-0,86 (d)	22,19	Ésteres de colesterol e colesterol livre (C(26) H ₃)	1D; TOCSY; JRES; HSQC
0,86-0,88 (d)	13,62	Ésteres de colesterol e colesterol livre 1 (C(27) H ₃)	1D; TOCSY; JRES; HSQC
0,88-0,90 (t)	-	Ácidos gordos $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$	1D; TOCSY; JRES
0,90-0,93 (d)	18,33	Ésteres de colesterol e colesterol livre (C(21) H ₃)	1D; TOCSY; JRES; HSQC
1,00-1,01 (s)	18,98	Colesterol livre (C(19) H ₃)	1D; TOCSY; JRES; HSQC
1,01-1,03 (s)	19,27	Ésteres de Colesterol livre (C(19) H ₃)	1D; TOCSY; JRES; HSQC
1,03-1,20 (m)	39,62	Múltiplos prótons de colesterol (esterificado e livre)	1D; TOCSY; HSQC
1,20-1,40 (s)	22,56	Ácidos gordos $(\text{CH}_2)_n$	1D; TOCSY; HSQC; JRES
1,40-1,55 (m)	-	Múltiplos prótons de colesterol (esterificado e livre)	1D; TOCSY; HSQC
1,55-1,63 (m)	24,43	Ácidos gordos $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO})$	1D; TOCSY; HSQC
1,76-1,88 (m)	27,52	Múltiplos prótons de colesterol (esterificado e livre)	1D; TOCSY; HSQC
1,97-2,08 (m)	26,90	Ácidos gordos $(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})$	1D; TOCSY; JRES; HSQC
2,23-2,35 (m)	33,99	Ácidos gordos (CH_2CO)	1D; TOCSY; JRES; HSQC
2,35-2,42 (m)	-	Ácidos gordos 22:6 $(-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO})$	1D
2,74-2,79 (m)	25,55	Ácidos gordos 18:2 $(=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})$	1D; TOCSY; HSQC
2,79-2,88 (m)	-	Ácidos gordos 20:4 $(=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})$	1D; TOCSY; HSQC
3,22-3,41 (s)	54,47	Grupo Colina ($^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$ da fosfatidilcolina e esfingomielina)	1D; TOCSY; HSQC; JRES
3,47-3,57 (m)	-	Colesterol (C(3) H)	1D; TOCSY
3,67-3,88 (s)	66,20	Fosfolípidos $((\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3)$	1D; TOCSY; HSQC
3,88-4,03 (s)	63,27	Glicerofosfolípidos (C(3) H ₂)	1D; TOCSY; HSQC
4,08-4,18 (m)	62,36	Esqueleto de glicerol dos triglicéridos (C(1)- H ₂)	1D; TOCSY; JRES; HSQC
4,25-4,32 (m)	61,48	Esqueleto de glicerol dos triglicéridos (C(3)- H ₂)	1D; TOCSY; JRES; HSQC
4,32-4,45 (s)	58,82	Fosfolípidos (PO- CH ₂)	1D; TOCSY; HSQC
4,54-4,68 (m)	73,59	Ésteres de colesterol (C(3) H)	1D; TOCSY; HSQC
5,16-5,23 (m)	70,05	Glicerofosfolípidos (C(2)- H)	1D; TOCSY; HSQC
5,23-5,28 (m)	68,57	Esqueleto de glicerol dos triglicéridos (C(2)- H)	1D; TOCSY; HSQC; JRES
5,29-5,46 (m)	129,15	Ácido gordo $(-\text{HC}=\text{CH}-)$	1D; TOCSY; JRES; HSQC

3.2.2 Estudo do grupo de diabetes mellitus gestacional do 2º trimestre de gravidez

Com o objetivo de procurar biomarcadores para diabetes mellitus gestacional, foi feita análise multivariada (PCA e PLS-DA) aos dados obtidos por RMN de ^1H de extratos lipídicos do plasma de mulheres grávidas diagnosticadas (pós-diagnóstico) com diabetes mellitus gestacional (pós-DMG – $n=12$) e controlos ($n=15$), que foram anteriormente alinhados e normalizados (PQN e área total). Numa primeira etapa foram feitos modelos de PCA com diferentes tipos de “scaling” para cada tipo de normalização com o objetivo de comparar os diferentes tipos de “scaling”. Na Figura 25 encontram-se representados modelos de PCA com “scaling” UV (Figura 25a)), Pareto (Figura 25b)) e centrado (Figura 25c)) para a normalização PQN. Analisando a figura pode-se concluir que não há separação entre os grupos controlo e pós-DMG e não há diferenças entre os diferentes tipos de “scaling” que foram aplicados.

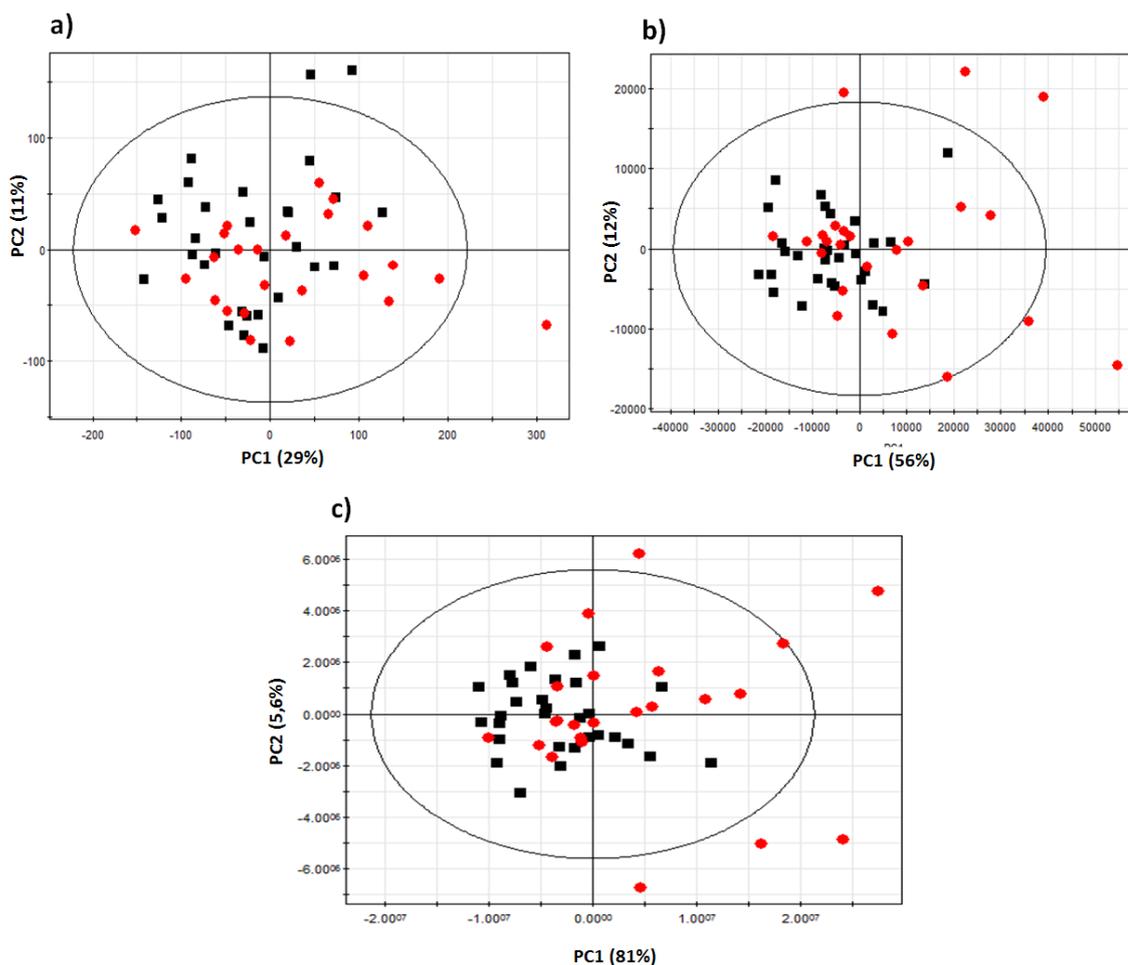


Figura 25. Análise multivariada de controlos (símbolos pretos ($n=15$)) e pós – DMG (símbolos vermelhos ($n=12$)). a) PCA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV ($R^2\text{X}=\text{$

0,722, $Q^2= 0,527$); b) PCA de coordenadas fatoriais com “scaling” Pareto ($R^2X= 0,952$, $Q^2= 0,875$); c) PCA de coordenadas fatoriais com “scaling” centrado ($R^2X= 0,995$, $Q^2=0,987$), com normalização PQN.

Com o objetivo de comparar os dois tipos de normalização, PQN e área total, foram também construídos modelos de PCA para a normalização área total, que se encontram representados na Figura 26.

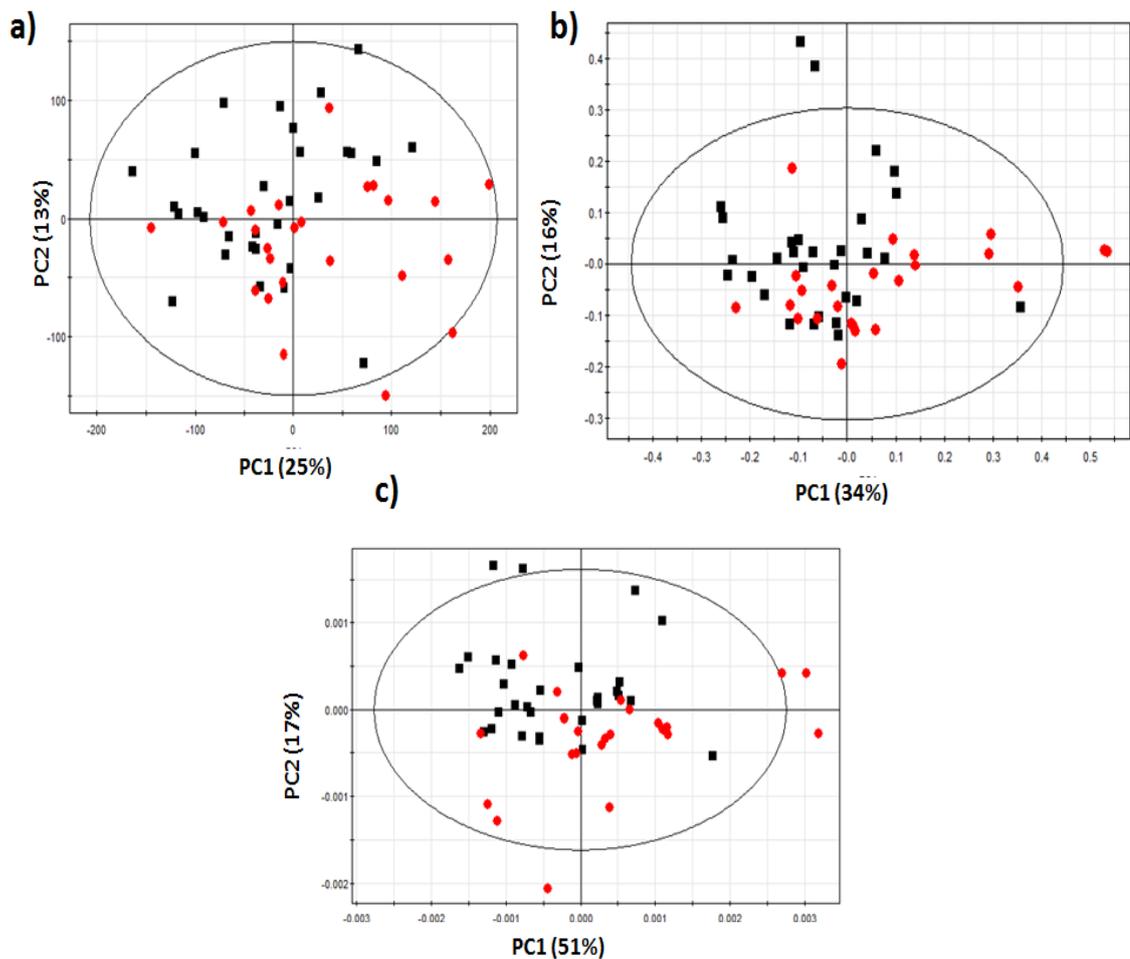


Figura 26. Análise multivariada de controlos (símbolos pretos (n=15)) e pós – DMG (símbolos vermelhos (n=12)). a) PCA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV ($R^2X= 0,738$, $Q^2= 0,577$); b) PCA de coordenadas fatoriais com “scaling” Pareto ($R^2X= 0,942$, $Q^2= 0,823$); c) PCA de coordenadas fatoriais com “scaling” centrado ($R^2X= 0,992$, $Q^2=0,972$), com normalização área total.

Comparando a normalização área total (Figura 26) com a normalização PQN (Figura 25) podemos concluir que os dois tipos de normalização são semelhantes uma vez que continua a não haver separação entre os grupos em estudo.

Na tentativa obter alguma classificação das amostras e de fazer a discriminação dos metabolitos mais importantes, foram construídos modelos de PLS-DA com duas componentes (LV=2) para os dados com normalização PQN e área total, com “scaling” UV, Pareto e centrado. Na Figura 27 encontram-se representados os modelos de PLS-DA com normalização PQN que diferem no tipo de “scaling”.

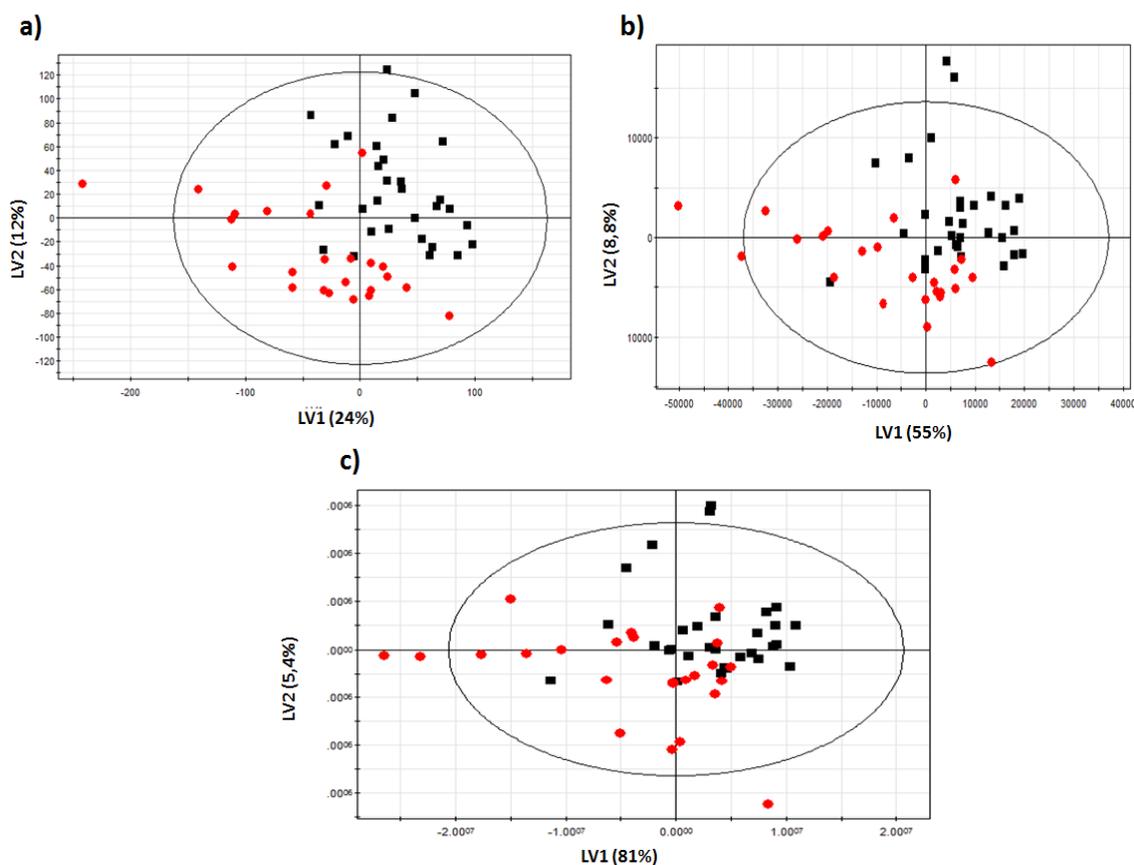


Figura 27. Análise multivariada de controlos (símbolos pretos (n=15) e pós – DMG (símbolos vermelhos (n=12)). a) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV ($R^2X= 0,362$, $R^2Y= 0,591$, $Q^2= 0,354$, LV=2); b) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling” Pareto ($R^2X= 0,64$, $R^2Y= 0,465$, $Q^2= 0,328$, LV=2); c) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling” centrado ($R^2X= 0,863$, $R^2Y= 0,392$, $Q^2=0,326$, LV=2), com normalização PQN.

Observando os modelos de PLS-DA podemos ver uma melhor separação entre os grupos controlos e pós-DMG nos modelos com “scaling” UV (Figura 27a)) e Pareto (Figura 27b)). Porém, é de notar a presença de um forte “outlier”, correspondente ao extrato 1 da amostra PS2T10_11, em ambos os modelos. O modelo de PLS-DA escolhido para posterior análise das contribuições fatoriais e discriminação dos metabolitos foi o modelo com “scaling” UV por apresentar um maior valor de Q^2 quando comparado com os valores de Q^2 dos modelos de PLS-DA com “scaling” Pareto e centrado.

A Figura 28 representa modelos de PLS-DA construídos para a normalização área total, com diferentes tipos de “scaling”. Neste caso o modelo escolhido para dar o prosseguimento a análise foi o modelo de PLS-DA com “scaling” Pareto, uma vez que este apresenta melhores valores de Q^2 do que os modelos com “scaling” UV e centrado.

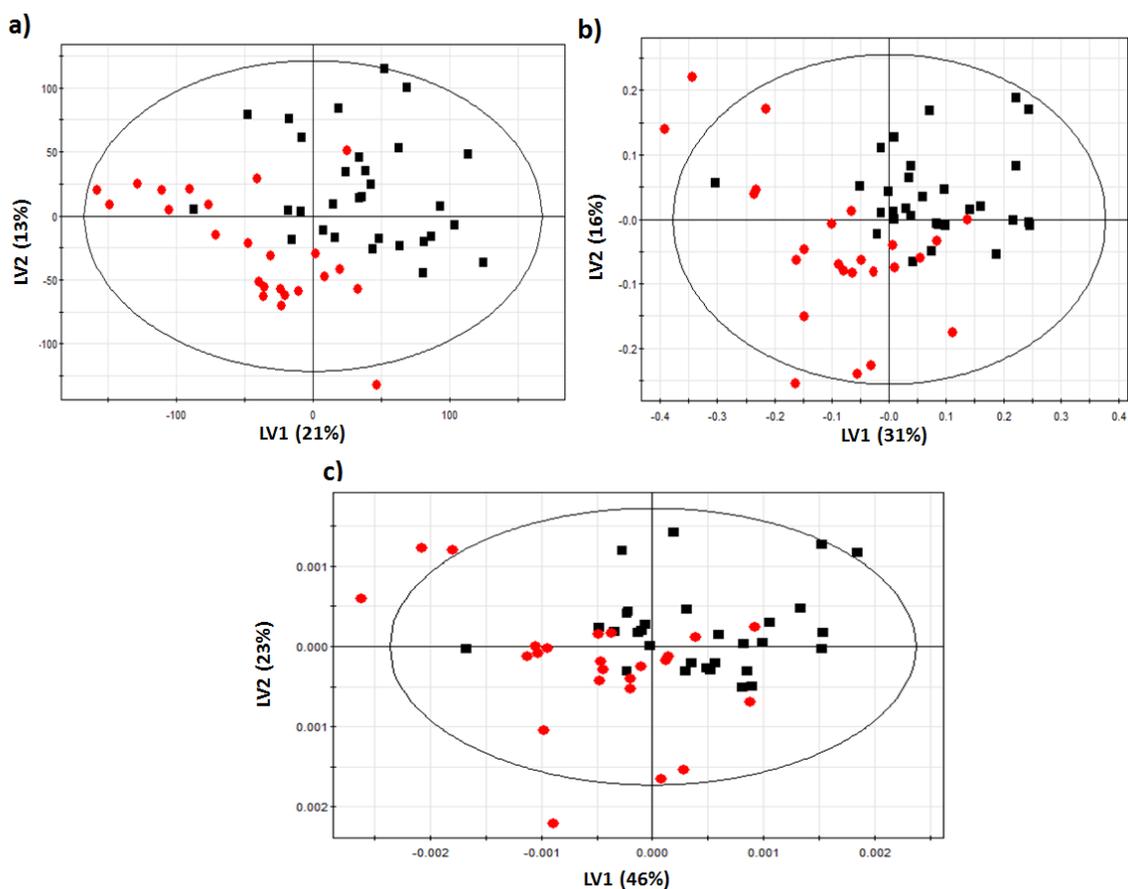


Figura 28. Análise multivariada de controlos (símbolos pretos (n=15) e pós-DGM (símbolos vermelhos (n=12)). a) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV ($R^2X= 0,344$, $R^2Y= 0,594$, $Q^2= 0,366$); b) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling”

Pareto ($R^2X= 0,64$, $R^2Y= 0,766$, $Q^2= 0,472$); c) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling” centrado ($R^2X= 0,689$, $R^2Y= 0,366$, $Q^2=0,295$), com normalização área total.

Após a escolha dos melhores modelos de PLS-DA com normalização PQN e Área Total prosseguiu-se a tentativa de validação destes modelos pelo método de MCCV com objetivo de escolher o melhor método de normalização. Como resultado, obtiveram-se matrizes de confusão, cujos valores foram utilizados para a construção de gráficos de ROC e gráficos de distribuição de valores de Q^2 que se encontram representados na Figura 29.

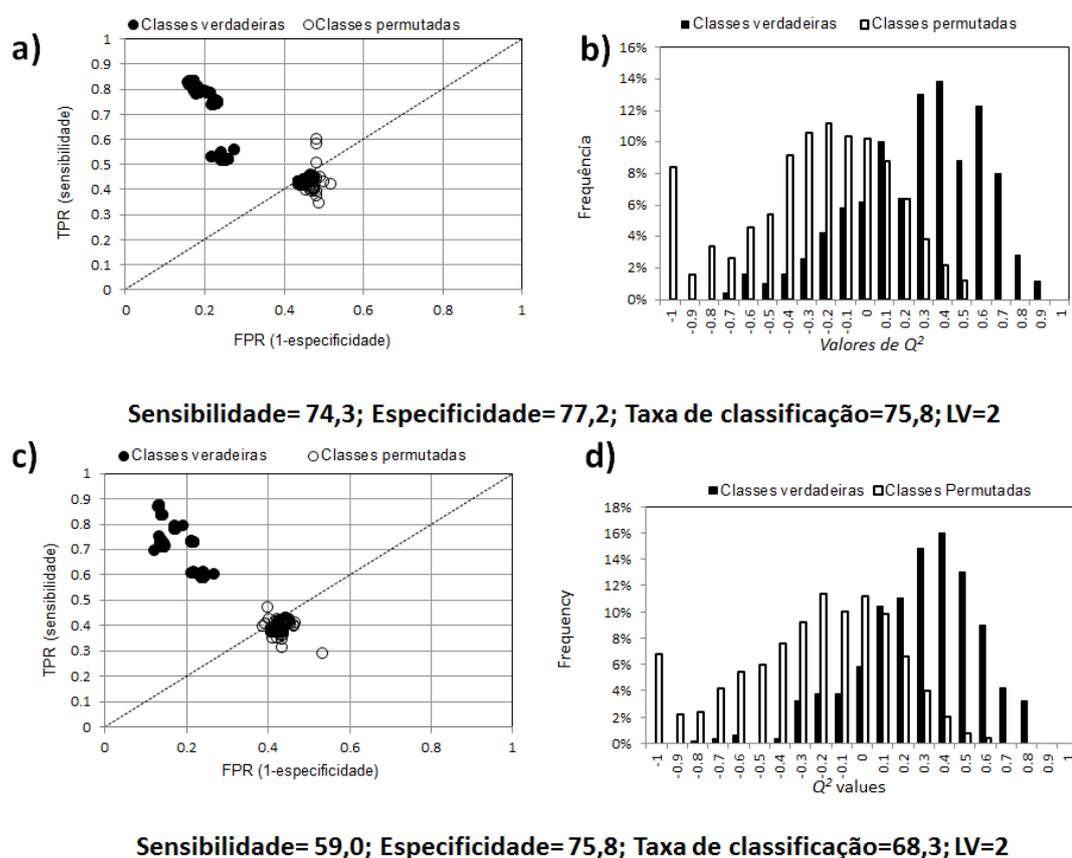


Figura 29. Gráficos de ROC e da distribuição de valores de Q^2 correspondentes aos modelos PLS-DA com normalização PQN e “scaling” UV (a e b), e do modelo com normalização área total e “scaling” Pareto (c e d).

Observando os gráficos da distribuição de Q^2 (Figuras 29b e 29d) podemos ver que para ambos os modelos existe sobreposição entre as classes verdadeiras (■) e permutadas (□) mostrando que estes modelos não permitem uma boa classificação das amostras. Os gráficos de ROC permitem visualizar que o modelo não faz uma boa separação entre as

classes verdadeiras (●) e as classes permutadas (○), visto existir dispersão intra-classes. Embora nenhum modelo seja ideal para a classificação dos controlos e doença, o que significa que as diferenças entre os grupos são poucas (implicando uma análise muito cuidada nos passos que se seguem), o modelo com normalização PQN constitui o melhor modelo para a classificação dos controlos e pós-DMG, visto apresentar valores de sensibilidade (74,3%), especificidade (77,2%) e taxa de classificação (75,8%) maiores que o modelo com normalização área total.

Após ter sido feita a escolha do melhor modelo para a classificação das classes, foi feita a seleção das variáveis para o modelo com normalização PQN e “scaling” UV. Na Figura 30 encontram-se representados dois modelos de PLS-DA antes (a) e depois (b) da seleção de variáveis. Observando os dois modelos podemos concluir que não há diferenças significativas na separação dos grupos controlo e pós-DMG. Os valores de R^2X , R^2Y e de Q^2 sofreram um ligeiro aumento com a seleção de variáveis, assumindo valores iguais a 0,472, 0,6 e 0,429, respetivamente.

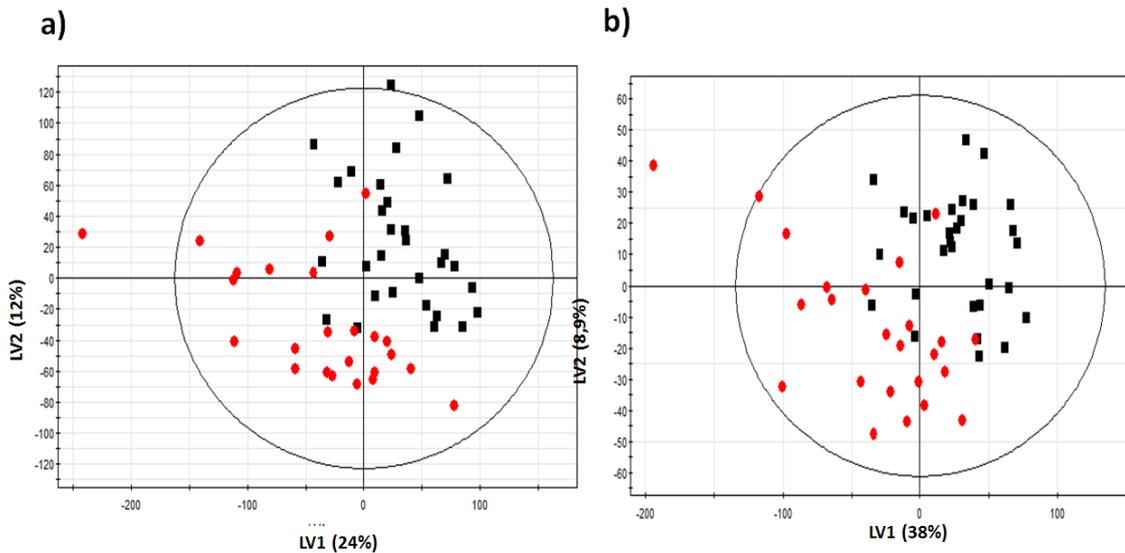


Figura 30. Análise multivariada de controlos (símbolos pretos (n=15) e pós – DMG (símbolos vermelhos (n=12)). a) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV antes da seleção de variáveis ($R^2X= 0,362$, $R^2Y= 0,591$, $Q^2= 0,354$, $LV=2$); b) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV após a seleção de variáveis ($R^2X= 0,472$, $R^2Y= 0,6$, $Q^2= 0,429$, $LV=2$), com normalização PQN.

Após esta análise foi feita a tentativa de validação destes modelos pelo método de MCCV. Os resultados encontram-se representados na Figura 31. Com a seleção de variáveis, os valores de sensibilidade, especificidade e taxa de classificação sofrem um aumento de quase 10%, assumindo valores de 82,7%, 85,8% e 84,4%, respetivamente. No que diz respeito aos gráficos ROC e distribuição do Q^2 podemos notar uma melhoria dos gráficos, uma vez que há uma diminuição na sobreposição entre as classes permutadas e verdadeiras, melhorando assim a separação entre essas classes.

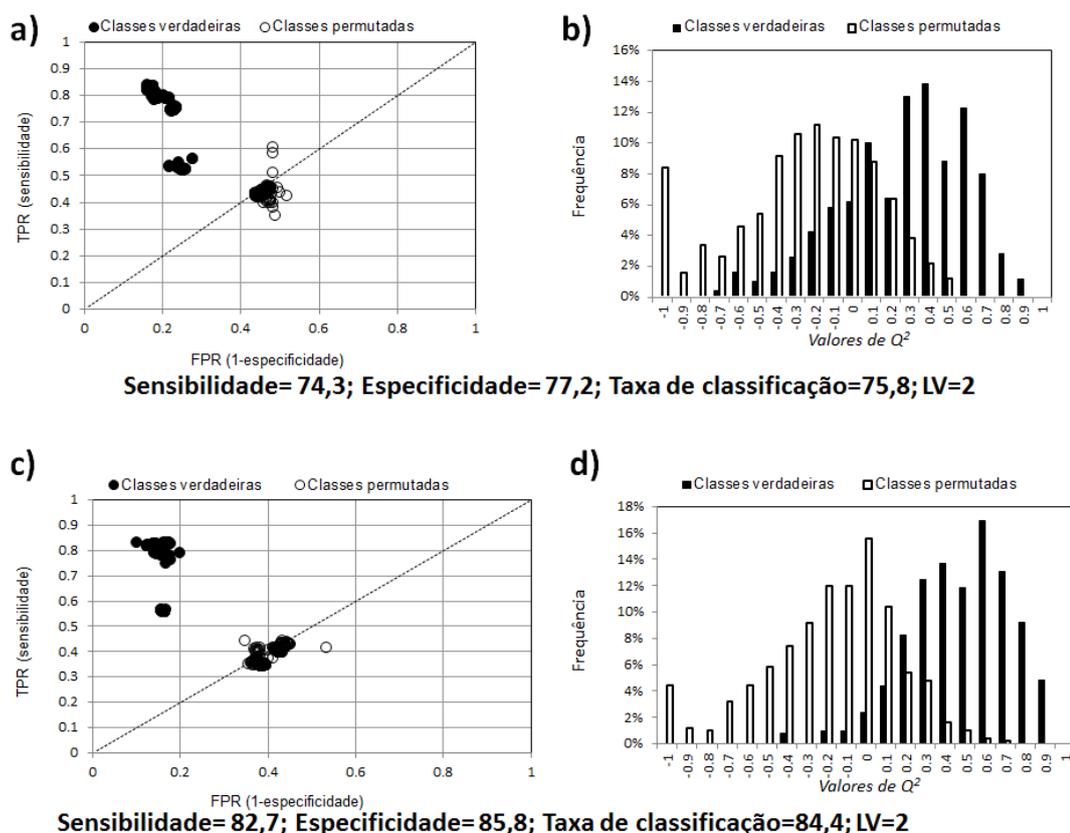


Figura 31. Gráficos de ROC e da distribuição dos valores de Q^2 correspondentes aos modelos PLS-DA com normalização PQN e “scaling” UV antes (a e b) e após (c e d) a seleção de variáveis.

De seguida foi construído um gráfico de contribuições fatoriais, colorido de acordo com a importância da variável na projeção (VIP). A Figura 32 representa o gráfico de contribuições fatoriais da componente 1 (LV1), visto ser esta a componente que explica maior variação no modelo de PLS-DA. Os picos coloridos a vermelho e laranja representam ressonâncias com maior importância na discriminação entre os grupos pós-

DMG e controlos do modelo de PLS-DA com scaling UV, após a seleção de variáveis. O “assignment” realizado anteriormente possibilitou a identificação destas ressonâncias como sendo: colesterol (C(18)H₃) /ésteres de colesterol (C(18)H₃), colesterol (C(26)H₃)/colesterol (C(27)H₃), ácidos gordos (CH₃(CH₂)_n), colesterol (C(21)H₃), colesterol (C(19)H₃), ésteres de Colesterol (C(19)H₃), ácidos gordos ((CH₂)_n), ácidos gordos (CH₂-CH=), ácidos gordos (CH₂CO), ácidos gordos 18:2 (=CH-CH₂-CH=), ácidos gordos 20:4 (=CH-CH₂-CH=), esqueleto de glicerol dos triglicéridos (C(1)H₂), esqueleto de glicerol dos triglicéridos (C(3)H₂), esqueleto de glicerol dos triglicéridos (C(2)H) e ácidos gordos (-HC=CH-), todos em LV1 negativo. Isto significa que amostras de pós-DMG em LV1 negativo possuem níveis mais elevados deste metabolito quando comparados com as amostras controlos.

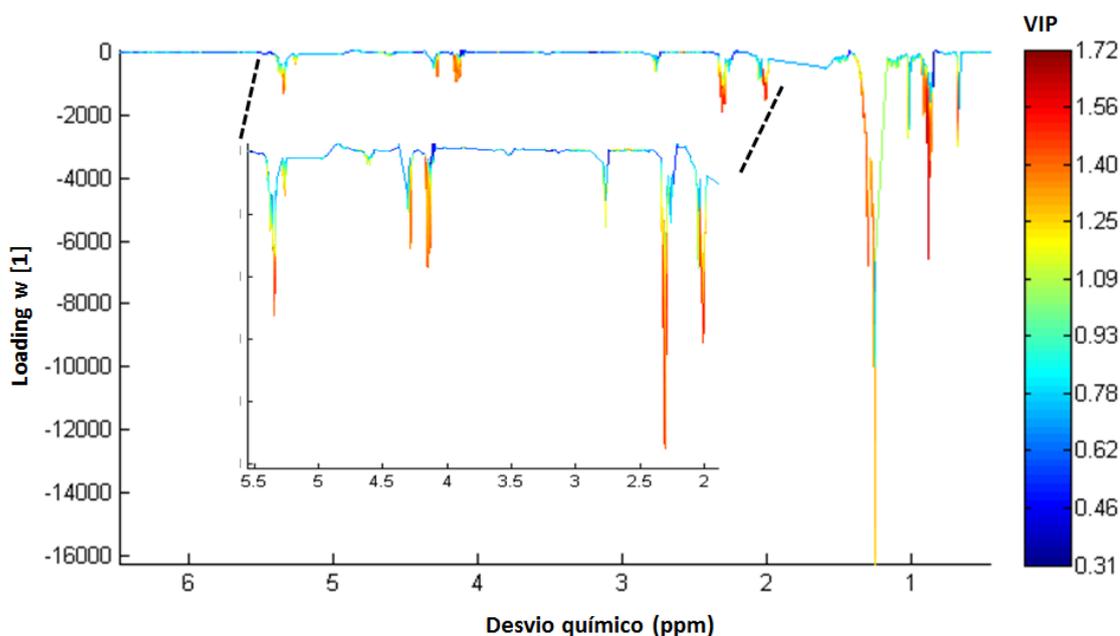


Figura 32. Análise multivariada controlos e pós-DMG, normalização PQN e “scaling” UV após seleção de variáveis. Gráfico de contribuições fatoriais, colorido de acordo com os valores de VIP, do modelo de PLS-DA.

De seguida, fez-se a integração destas ressonâncias, e os resultados obtidos foram utilizados para validar a análise multivariada, recorrendo a análise univariada. Os resultados encontram-se representados na Tabela 20 onde as ressonâncias encontram-se organizadas em famílias. Para os metabolitos que apresentam diferenças significativas entre o grupo pós-DMG e grupo dos controlos foram calculados o “effect size” para diferenças das

médias padronizadas (ES_{smd}) e a percentagem de variação (% de variação), que mostram a magnitude das diferenças entre os dois grupos, e os respetivos erros associados.

Tabela 20. Resultados da análise univariada pós-DMG vs. controlos (^a nível de significância 95% ($p < 0.05$); s=singleteo, d= dupleteo e m=multipleteo).

Desvio químico /ppm (multiplicidade)	Composto	Pós-DMG (n=12) vs. Controlos (n=15)		
		Valor de p ^a	% Variação	Effect size
0,88-0,90 (s)	Ácidos gordos CH_3	2,9E-03	10,2±2,9	1,0±0,6
1,20-1,40 (s)	Ácidos gordos $(CH_2)_n$	4,8E-03	10,1±3,0	0,9±0,6
1,97-2,08 (m)	Ácidos gordos $CH_2-CH=$	9,7E-03	8,5±2,7	0,8±0,6
2,23-2,35 (m)	Ácidos gordos CH_2CO	7,7E-04	10,8±2,9	1,1±0,6
2,74-2,79 (m)	Ácidos gordos 18:2 =CH- CH_2- CH=	-	-	-
2,79-2,88 (m)	Ácidos gordos 20:4 =CH- CH_2- CH=	-	-	-
5,29-5,46 (m)	Ácidos gordos -HC=CH-	7,3E-03	6,6±2,2	0,8±0,6
4,08-4,18 (m)	Esqueleto de glicerol dos triglicéridos C(1) H_2	5,8E-04	22,2±5,8	1,0±0,6
4,25-4,32(m)	Esqueleto de glicerol dos triglicéridos C(3) H_2	1,6E-02	20,2±7,1	0,7±0,6
5,23-5,28 (m)	Esqueleto de glicerol dos triglicéridos C(2) H	1,7E-02	20,3±7,5	0,7±0,6
0,67-0,70 (s)	Colesterol/Éster de colesterol C(18) H_3	1,4E-02	6,6±2,7	0,7± 0,6
0,83-0,88 (d)	Colesterol C(26) H_3 ,C(27) H_3	6,6E-03	6,9±2,3	0,8±0,6
0,90-0,93(d)	Colesterol C(21) H_3	8.3E-03	6,7±2,6	0,7±0,6
1,00-1,01 (s)	Colesterol C(19) H_3	4,9E-02	5,5±2,2	0,7±0,6
1,01-1,03 (s)	Ésteres de Colesterol C(19) H_3	1,2E-02	7,0±2,9	0,7±0,6

Analisando os resultados listados na Tabela 20 podemos concluir que esta análise permitiu confirmar as variações que observamos anteriormente na análise das contribuições fatoriais. As diferenças das ressonâncias dos ácidos gordos 18:2 e 20:4 entre o grupo pós-DMG e controlos não são significativas, uma vez que apresentam valores de p superiores a 0,05. A ressonância do colesterol C(19) H_3 apresenta um valor de p muito próximo de 0,05 (4,9E-02), sugerindo que as diferenças entre os grupos, controlos e pós-DMG não sejam muito significativas. Os valores de percentagem de variação variam no sentido positivo indicando que as ressonâncias listadas encontram-se em maior quantidade no grupo pós – DMG do que no grupo controlo. As ressonâncias referentes ao esqueleto de

glicerol dos triglicéridos $C(1)H_2$ apresentam percentagens de variação maiores que as restantes ressonâncias o que significa que variam mais entre os dois grupos. Os valores de “effect size” apresentam um erro muito elevado, para todas as ressonâncias, assumindo valores iguais ou superiores ao próprio valor de “effect size”, o que sugere que as variações entre o grupo controlo e pós-DMG são pequenas relativamente as variações que existem entre as amostras pertencentes ao mesmo grupo.

A análise univariada foi utilizada também para a construção de caixas de bigodes, para os metabolitos que apresentam alterações estatisticamente significativas (valor de $p < 0,05$). As caixas de bigodes permitem ver a distribuição dos dados nos diferentes grupos em estudo. A figura 33 representa um exemplo de uma caixa de bigode e a sua constituição.

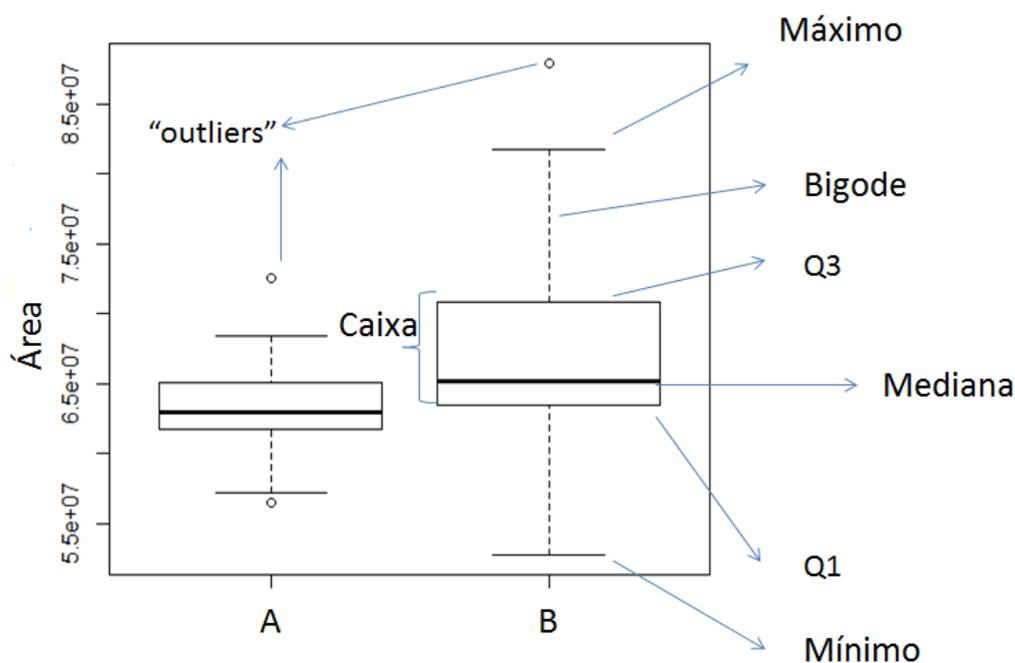


Figura 33. Exemplo de uma caixa de bigodes que representa dois grupos, A e B. Q1 = 1º quartil (25%) e Q3= 3º quartil (75%).

Na Figura 34 encontram-se exemplos de caixas de bigodes representativos das famílias das ressonâncias listadas na Tabela 20. De cada família foi selecionada a ressonância com sinal mais intenso no espectro de RMN de 1H . Assim sendo, selecionou-se as seguintes ressonâncias: colesterol (Colesterol $C(19)H_3$ (1,00-1,01 ppm), ésteres de colesterol (Ésteres de colesterol $C(19)H_3$ (1,01-1,03 ppm) e triglicéridos (Esqueleto de glicerol dos triglicéridos $C(1)H_2$ (4,08-4,18 ppm)).

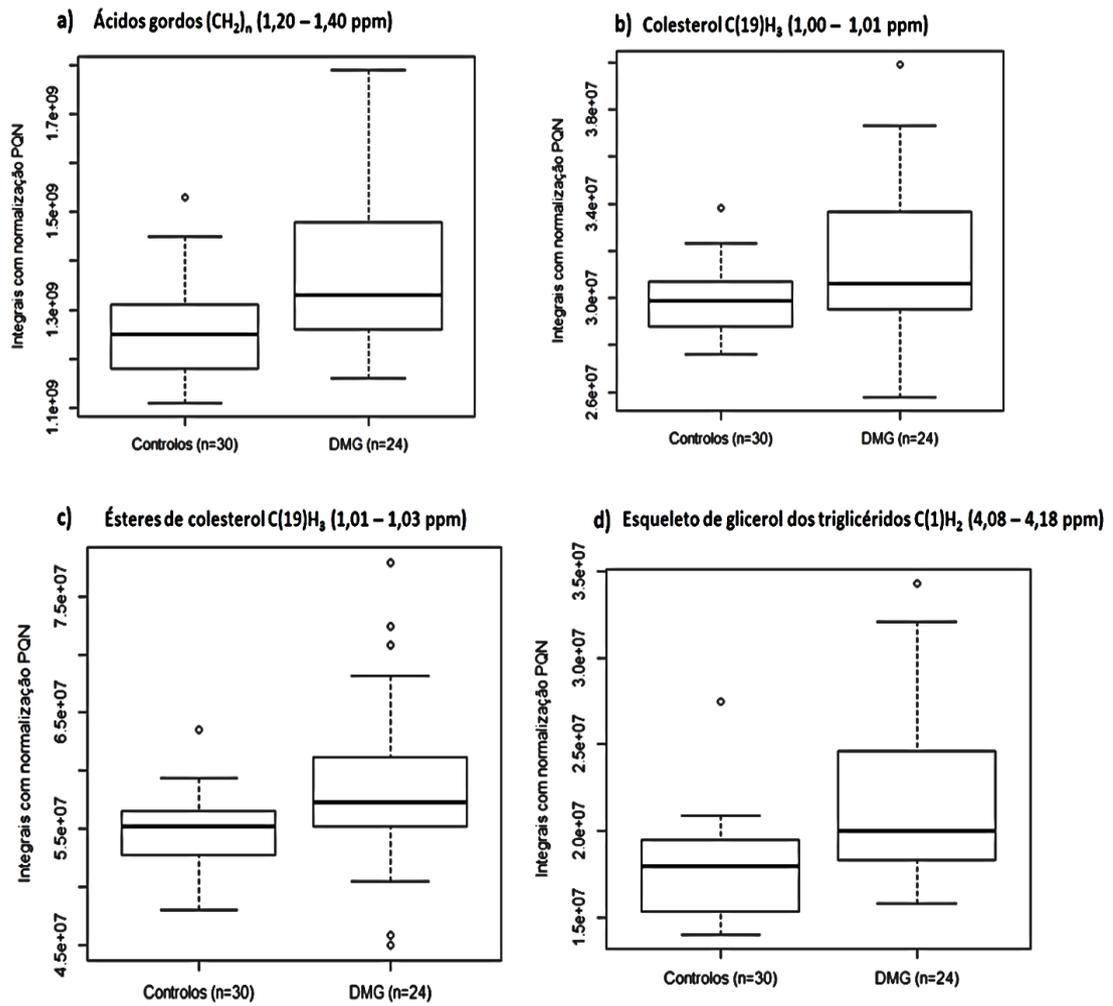


Figura 34. Caixas de bigodes representativas dos valores dos integrais de metabolitos com diferenças significativas entre controlos e pós DMG, com normalização PQN.

Observando a Figura 34a), é possível notar que grupo pós-DMG que apresenta maior variabilidade de dados do que o grupo dos controlos, o que visto pela altura das caixas que é maior no grupo GDM. Nas restantes figuras, 34 b) e 34 c), nota-se a presença de alguns outliers nos dois grupos em estudo, apresentando o grupo pós-DMG sempre uma maior variação que o grupo controlo o que vem suportar os resultados apresentados na Tabela 20.

3.2.3 Estudo do grupo de trissomia 21 do 1º e 2º trimestres de gravidez

3.2.3.1 Trissomia 21 vs. Controlos no 1º trimestre de gravidez

Para a análise da trissomia 21 do 1º trimestre, amostras de plasma de mulheres grávidas saudáveis (controlos, n=15) e de grávidas que tiveram fetos com T21 (n=7) no 1º trimestre de gravidez foram extraídas e os extratos lipídicos foram analisados por RMN de ^1H . A mesma estratégia aplicada para a análise das amostras de DMG foi aplicada na análise de T21, isto é, os espetros de RMN de ^1H foram alinhados e normalizados utilizando os métodos de normalização PQN e área total e submetidos análise multivariada com diferentes tipos de “scaling”, UV, Pareto e centrado. No final desta análise foi escolhido como o melhor modelo aquele com normalização PQN e “scaling” UV.

Na Figura 35 encontra-se representada a análise multivariada do 1º trimestre dos espetros de extratos lipídicos obtidos por RMN de ^1H . A Figura 35 a) representa o modelo de PCA com normalização PQN e “scaling” UV de controlos e T21, onde podemos concluir que não há separação entre os dois grupos. A Figura 35 b) representa o modelo de PLS-DA, onde conseguimos obter uma boa separação entre o grupo controlos e T21, com um valor de Q^2 igual a 0,433. As Figuras 35 c) e 35 d) revelam os resultados obtidos pelo método de validação de MCCV, que demonstram a pobreza do modelo na classificação das classes, com valores de sensibilidade, especificidade e taxa de classificação iguais a 38,1%, 86,3% e 69,5%, respetivamente. No gráfico de ROC (Figura 35 c)) podemos observar que as classes não estão bem separadas uma vez que existe dispersão intra-classes e as classes verdadeiras (●) e permutadas (○) encontram-se muito próximas umas das outras. No gráfico de distribuição dos valores de Q^2 existe muita sobreposição entre as classes verdadeiras (■) e as classes permutadas (□).

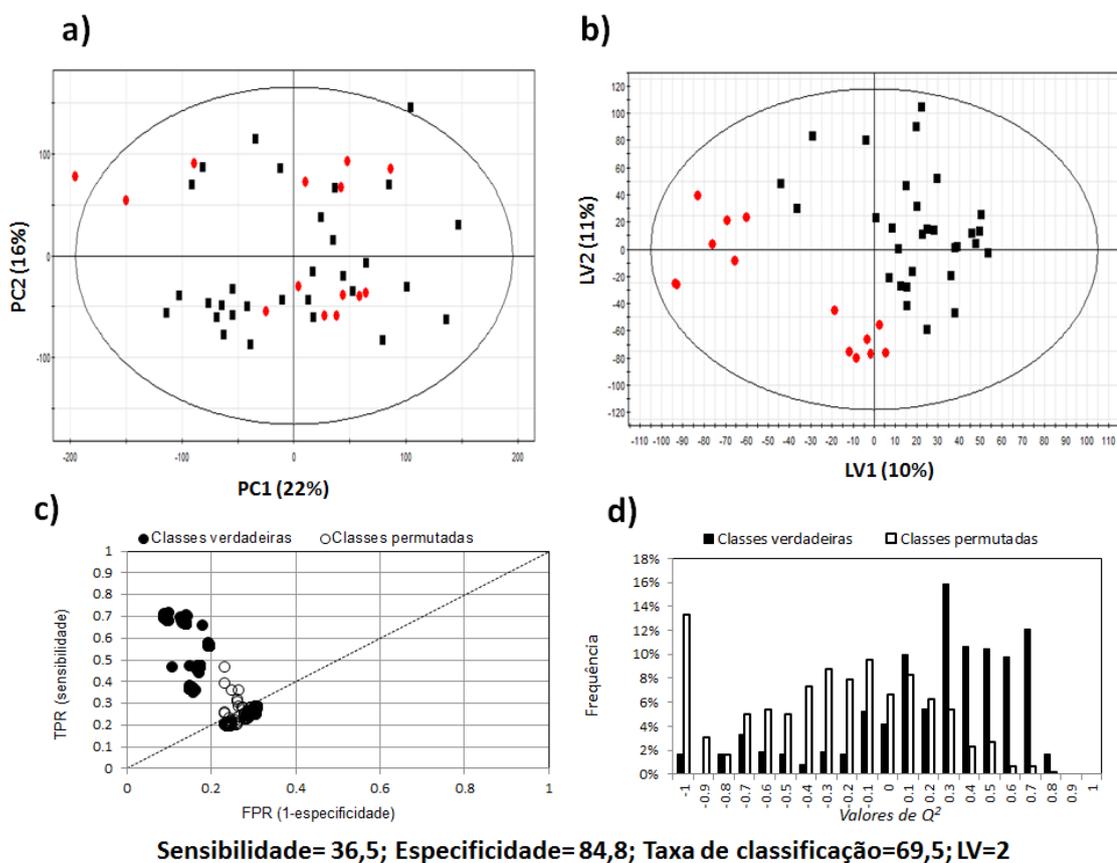


Figura 35. Análise multivariada de controlos (símbolos pretos (n=15)) e T21 (símbolos vermelhos (n=7)) com normalização PQN. a) PCA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV ($R^2X=0,62$, $Q^2=0,433$); b) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV ($R^2X=0,214$, $R^2Y=0,716$, $Q^2=0,401$); c) Gráfico de ROC; d) Gráfico de distribuição dos valores de Q^2 .

De seguida fez-se seleção de variáveis do modelo com normalização PQN acima representado. As Figuras 36 a) e b) representam os modelos de PLS-DA antes e após a seleção de variáveis. Analisando os modelos podemos observar que estes são muito semelhantes. Ao comparar os valores de Q^2 dos modelos concluímos que a seleção de variáveis melhorou o modelo uma vez que aumentou o valor de Q^2 . As Figuras 36 c) e d) representam os gráficos ROC e distribuição de Q^2 obtidos pelo método de validação de MCCV. Com a seleção de variáveis, os valores de sensibilidade, especificidade e taxa de classificação sofreram um ligeiro aumento, assumindo valores de 49,9%, 90,0% e 77,3%, respetivamente. Comparando os gráficos de ROC e de distribuição dos valores de Q^2 com os gráficos obtidos antes da seleção de variáveis (Figura 35 c) e d)) podemos concluir que

a seleção de variáveis melhorou a classificação das classes. No gráfico de ROC (Figura 36 c)) as classes verdadeiras encontram-se agora mais afastadas das classes permutadas e mais próximas do 1. No gráfico de distribuição dos valores de Q^2 (Figura 36 d)) a seleção de variáveis diminuiu a sobreposição entre as classes verdadeiras e permutadas.

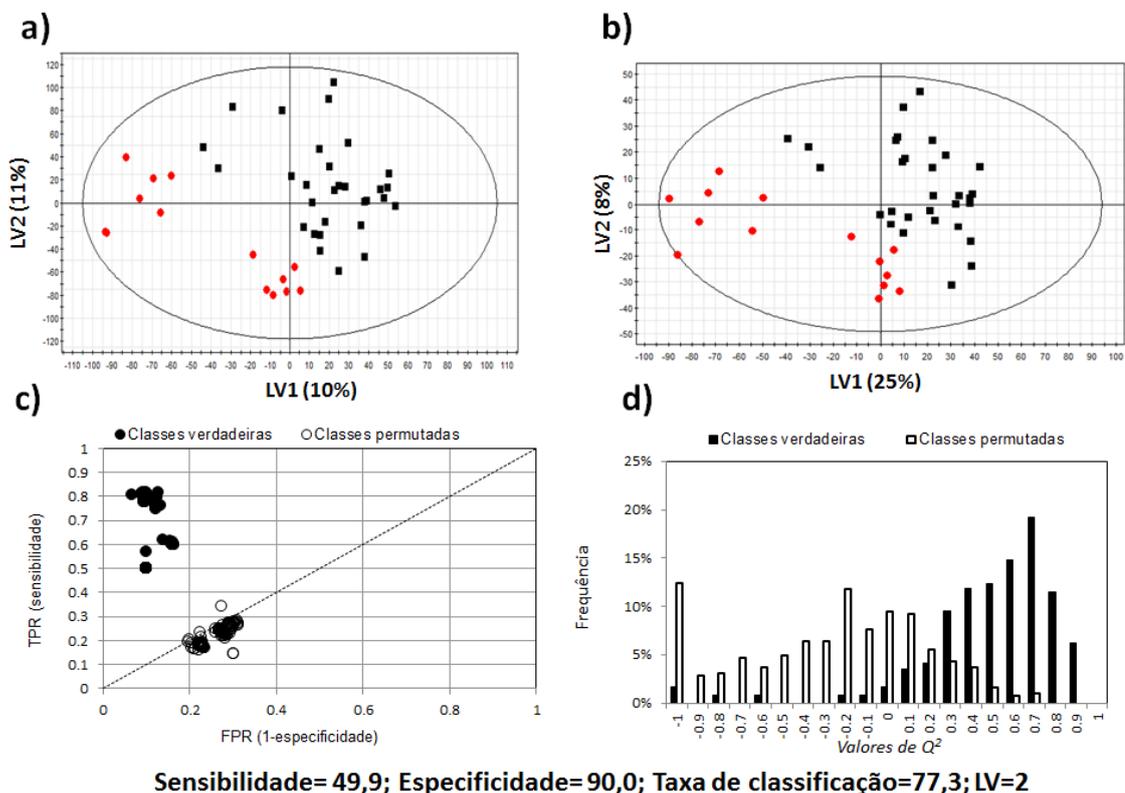


Figura 36. Análise multivariada de controlos (símbolos pretos (n=15)) e T21 (símbolos vermelhos (n=7)) com normalização PQN. a) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV ($R^2X= 0,214$, $R^2Y= 0,716$, $Q^2= 0,401$) antes da seleção de variáveis; b) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV ($R^2X= 0,326$, $R^2Y= 0,697$, $Q^2= 0,438$); c) Gráfico de ROC após seleção de variáveis; d) Gráfico dos valores da distribuição de Q^2 após seleção de variáveis.

Após a validação dos modelos foi feita a análise das contribuições fatoriais da informação contida no LV1, componente que explica maior variação de dados no modelo de PLS-DA. A Figura 37 representa o modelo de contribuições fatoriais de PLS-DA, colorido de acordo com os valores de VIP, com “scaling” UV para normalização PQN antes (a) e depois (b) da seleção de variáveis, onde podemos notar que não existem diferenças entre os dois gráficos de contribuições fatoriais. Os picos com coloração mais

intensa representam as ressonâncias com maior importância, sendo estas: os fosfolípidos ($^+N(CH_3)_3$), fosfolípidos $CH_2-^+N(CH_3)_3$, glicerolfosfolípido ($C(3)H_2$) e fosfolípidos ($PO-CH_2$) em LV1 positivo.

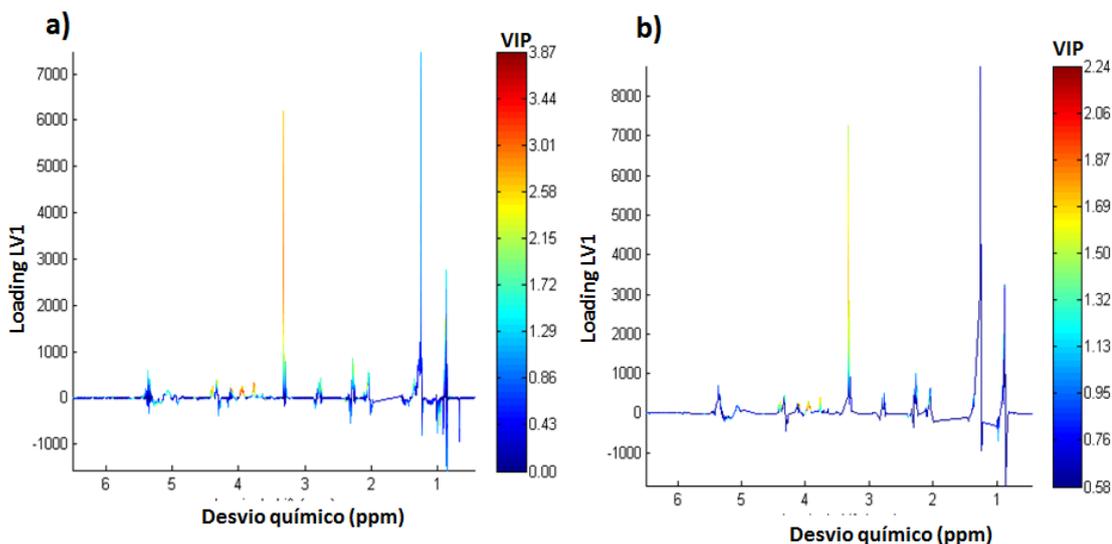


Figura 37. Gráficos das contribuições fatoriais colorido de acordo com os valores de VIP, dos modelos de PLS-DA com “scaling” UV antes (a) e depois (b)) da seleção de variáveis.

De seguida passou-se à análise univariada. Após a integração das ressonâncias que mais variam entre os dois grupos em estudo, foram calculados valores de p utilizando o teste de Wilcoxon. Para as ressonâncias que apresentaram valores significativamente diferentes foram calculados o effect size para as médias padronizadas e a percentagem de variação. Os resultados desta análise se encontram representados na Tabela 21.

Tabela 21. Resultados da análise univariada de T21 vs. controles (^a nível de significância 95% (p <0.05); t=triplete, s = singlete e m=multiplete).

Desvio químico /ppm (multiplicidade)	Composto	T21 (n=7) vs. Controlos (n=15)		
		Valor de p ^a	% variação	Effect size
0,88-0,90 (t)	Ácidos gordos CH_3	-	-	-
1,20-1,40 (s)	Ácidos gordos $(\text{CH}_2)_n$	-	-	-
2,24-2,34 (m)	Ácidos gordos CH_2CO	-	-	-
2,74-2,79 (m)	Ácidos gordos 18:2 $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$	-	-	-
5,29-5,46 (m)	Ácidos gordos $-\text{HC}=\text{CH}-$	-	-	-
1,00-1,01 (s)	Colesterol $\text{C}(19)\text{H}_3$	-	-	-
3,22-3,41 (s)	Fosfolípidos $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$ (de fosfatidilcolina e esfingomielina)	7,6E-04	-10,7±3,4	-1,2±0,7
3,67-3,88 (s)	Fosfolípidos $\text{CH}_2-^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$ (de fosfatidilcolina e esfingomielina)	4,8E-04	-9,6±13,7	-0,3±0,6
3,88-4,02 (s)	Glicerolfosfolípido $\text{C}(3)\text{H}_2$	1,3E-04	-10,6±3,0	-1,4±0,7
4,32-4,45 (m)	Fosfolípidos $\text{PO}-\text{CH}_2$	4,2E-02	-13,8±10,1	-0,6±0,6
4,08-4,18 (m)	Esqueleto de glicerol dos triglicéridos $\text{C}(1)\text{H}_2$	-	-	-
4,25-4,32(m)	Esqueleto de glicerol dos triglicéridos $\text{C}(3)\text{H}_2$	-	-	-

Observando a Tabela 21 podemos concluir que apenas as ressonâncias pertencentes a classe dos fosfolípidos é que variam (valor de p >0,05) e todas variam no sentido negativo, significando que estas ressonância encontram-se diminuídas no grupo T21 quando comparado com o grupo controlo. Das ressonâncias acima listadas, os fosfolípidos $\text{PO}-\text{CH}_2$ apresentam maior variação, com um valor de % de variação igual a 13,8%. Analisando os valores do effect size podemos ver que para todas as ressonâncias este valor possui um erro associado muito elevado, o que significa que as diferenças entre os grupos de T21 e controlos são menores que as diferenças existentes dentro do mesmo grupo.

A Figura 38 representa as caixas de bigodes obtidas pela análise univariada, das ressonâncias que apresentam diferenças entre o grupo de T21 e o grupo controlo.

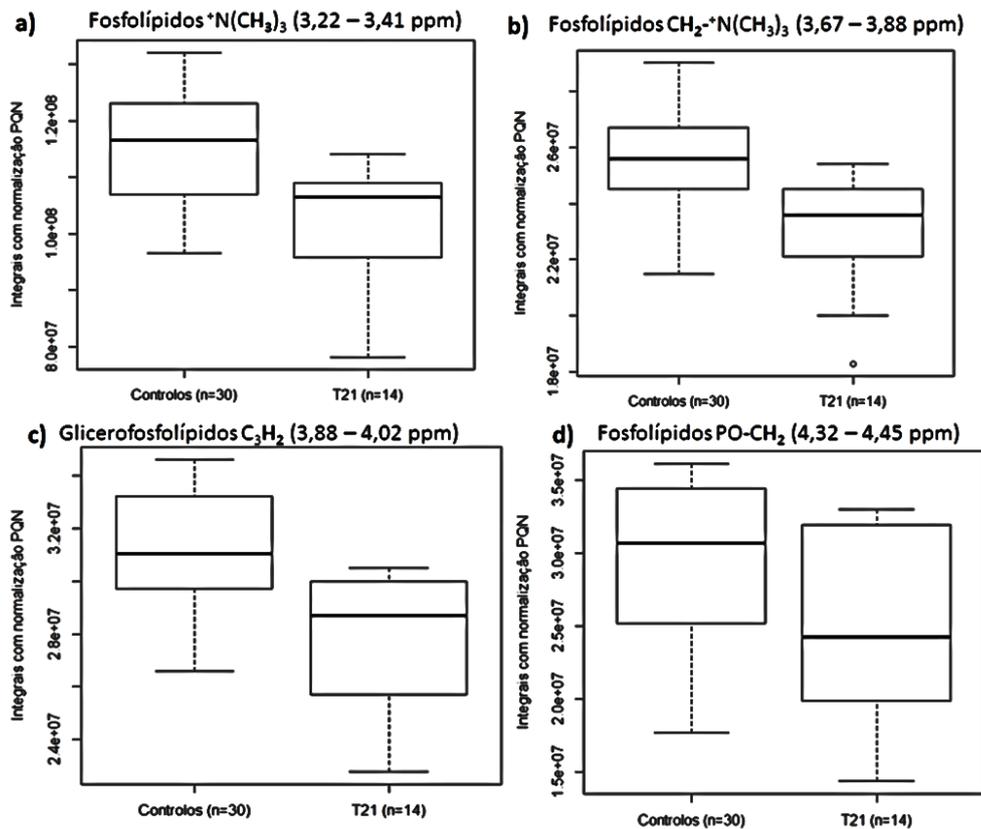


Figura 38. Caixas de bigodes dos valores dos integrais das ressonâncias com diferenças significativas entre controlos e T21.

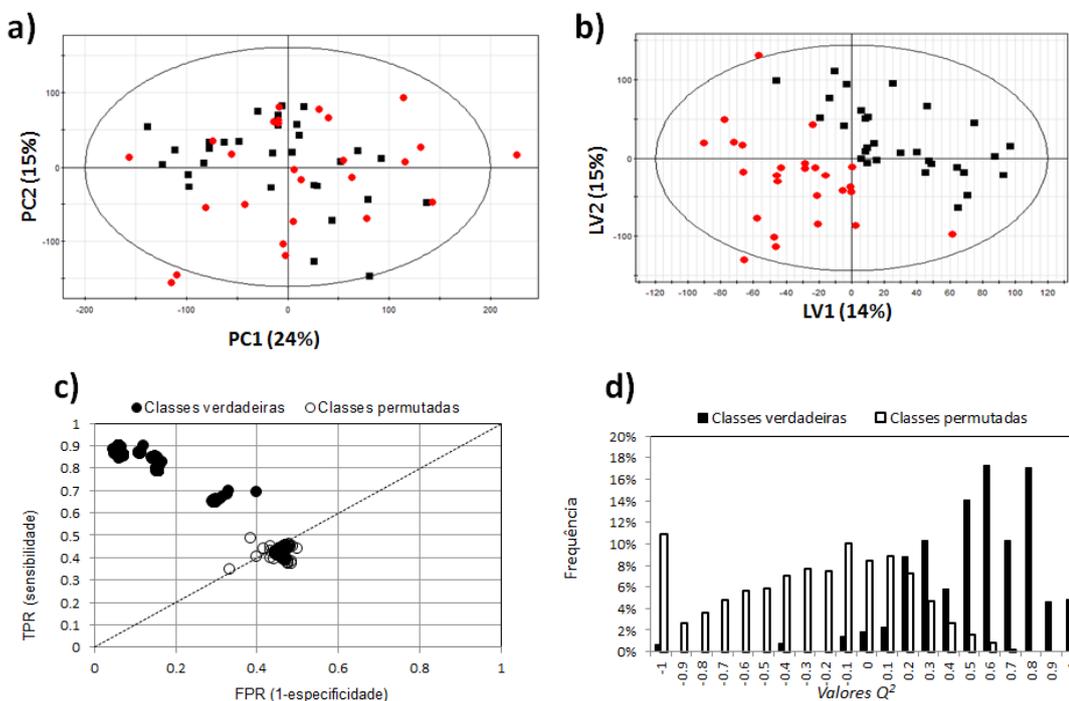
Observando as caixas de bigodes podemos verificar que a variação nos fosfolípidos PO-CH₂ (Figura 38 d)), entre os grupos controlos e T21, não é muito significativa visto existir sobreposição entre as caixas de bigodes dos dois grupos. Nas Figuras 38 a), 38 b) e 38 c), a variação entre os dois grupos já é mais significativa havendo menos sobreposição entre os grupos.

3.2.3.2 Trissomia 21 vs. Controlos no 2º trimestre de gravidez

Na análise dos extratos de plasma de mulheres grávidas, no 2º trimestre de gravidez, que tiveram fetos afetados por trissomia 21 fizeram parte 28 amostras em que 13 pertenciam ao grupo de T21 e 15 amostras pertenciam ao grupo controlo. As amostras foram extraídas em duplicados e os extratos lipídicos foram analisados por RMN de ¹H. A mesma estratégia aplicada nos estudos anteriores, pós-DMG e T21 (1º trimestre), foi aplicada nesta análise. Espectros alinhados e normalizados (PQN e área total) foram submetidos a análise multivariada onde foram aplicados os diferentes tipos de “scaling”.

Após validação dos modelos, a normalização PQN com “scaling” UV foi escolhida como que melhor classifica as classes.

Na Figura 39 encontra-se representado o resultado da análise multivariada (Figura 39 a) e b)) e o resultado da validação do modelo de PLS-DA com “scaling” UV pelo método de MCCV. A Figura 39 a) corresponde ao modelo de PCA com “scaling” UV onde podemos observar que não há separação entre o grupo de T21 e o grupo controlo. A Figura 39 b) representa o modelo de PLS-DA com “scaling” UV onde já conseguimos obter separação entre os dois grupos de estudo, com um valor de Q^2 igual a 0,367. Nas Figuras 39 c) e 39 d) temos os gráficos de ROC e de distribuição dos valores de Q^2 , respetivamente. No gráfico de ROC podemos ver separação entre as classes verdadeiras (●) e permutadas (○), embora exista alguma dispersão intra-classes. O gráfico de distribuição dos valores de Q^2 existe alguma sobreposição entre as colasses verdadeiras (■) e permutadas (□). Estes resultados demonstram que embora o modelo possua valores de sensibilidade, especificidade e taxa de classificação iguais a 85,7%, 92,8% e 89,5%, respetivamente, este modelo é pobre na classificação das classes.



Sensibilidade= 85,7; Especificidade=92,8; Taxa de classificação=89,5; LV=2

Figura 39. Análise multivariada de controlos (símbolos pretos (n=15)) e T21 (símbolos vermelhos (n=7)) com normalização PQN. a) PCA de coordenadas fatoriais com “scaling”

UV ($R^2X=0,815$, $Q^2=0,589$); b) PLS-DA de coordenadas fatoriais com scaling UV ($R^2X=0,295$, $R^2Y=0,675$, $Q^2=0,367$); c) Gráfico de ROC; d) Gráfico dos valores da distribuição de Q^2 .

Comparando estes resultados com os obtidos na análise de pós-DMG podemos concluir que o modelo com normalização PQN e “scaling” UV classifica melhor o grupo de T21 do que pós-DMG, uma vez que conseguimos obter nesta análise (Figura 39) menos dispersão e sobreposição entre as classes verdadeiras e permutadas e melhores valores de sensibilidade, especificidade e taxa de classificação, quando comparados com pós-DMG (Figura 29).

O passo seguinte consistiu na seleção das variáveis do modelo com normalização PQN e validação do modelo pelo método de MCCV. A seleção de variáveis permitiu obter modelos de PLS-DA com melhores valores de R^2X , R^2Y e de Q^2 . A Figura 40 representada dois modelos de PLS-DA com “scaling” UV antes (a) e depois (b) da seleção de variáveis e os resultados da validação do modelo expresso em gráficos de ROC (c) e de distribuição dos valores de Q^2 (d).

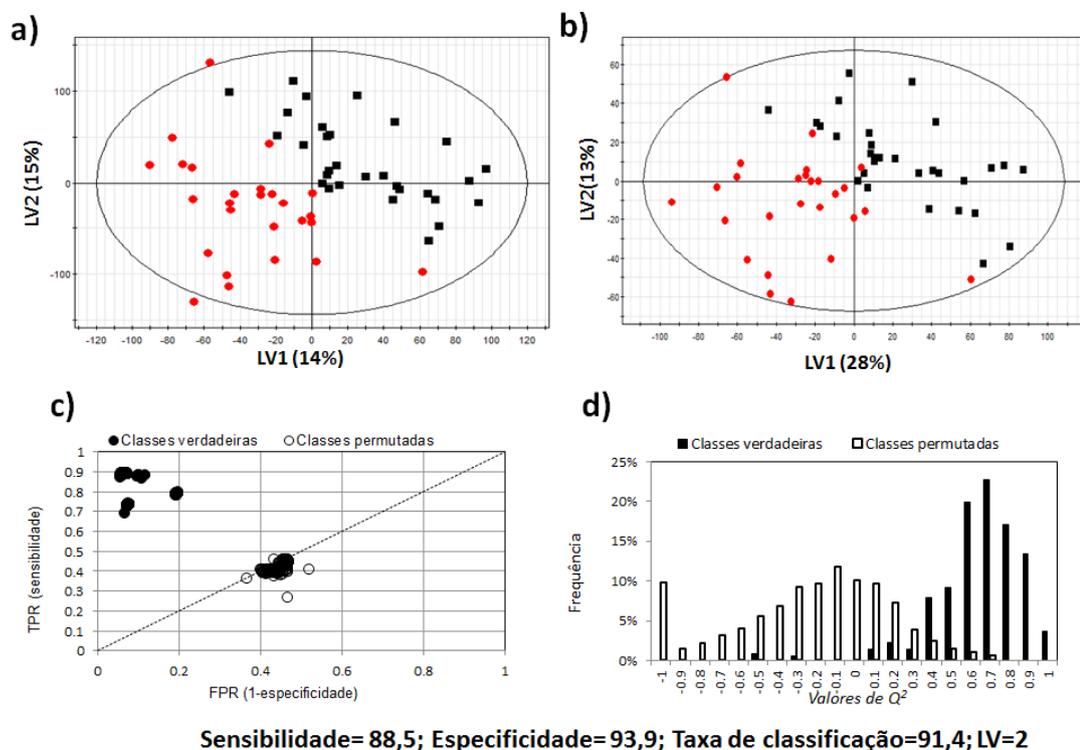


Figura 40. Análise multivariada de controlos (símbolos pretos (n=15)) e T21 (símbolos vermelhos (n=7)) com normalização PQN. a) PLS-DA de coordenadas fatoriais com

“scaling” UV ($R^2X= 0,295$, $R^2Y= 0,675$, $Q^2= 0,367$) antes da seleção de variáveis; b) PLS-DA de coordenadas fatoriais com “scaling” UV ($R^2X= 0,418$, $R^2Y= 0,617$, $Q^2= 0,451$); c) Gráfico de ROC após seleção de variáveis; d) Gráfico dos valores da distribuição de Q^2 após seleção de variáveis.

Comparando os modelos de PLS-DA antes (Figura 40 a)) e depois (Figura 40 b)) da seleção de variáveis podemos notar que os modelos são muito semelhantes, apresentando o modelo com seleção de variáveis um valor de Q^2 ($Q^2=0,451$) ligeiramente superior ao valor de Q^2 ($Q^2=0,367$) do modelo de PLS-DA antes da seleção de variáveis. Analisando os gráficos de ROC antes (Figura 39 c)) e depois (Figura 40 c)) da seleção de variáveis podemos observar melhorias na separação entre as classes verdadeiras (●) e permutadas (○), uma vez que a dispersão intra-classes diminuiu. A seleção de variáveis não melhorou a distribuição dos valores de Q^2 , visto continuar a haver sobreposição entre as classes. Os valores de sensibilidade, especificidade e taxa de classificação sofreram um ligeiro aumento, assumindo valores iguais a 88,5%, 93,9% e 91,4%, respectivamente, embora este aumento não tenha sido significativo.

Assumindo os resultados obtidos com a seleção de variáveis foi feita a análise das contribuições fatoriais para as duas componentes e uma vez que não existiam diferenças na informação apenas a informação contida no LV1 foi utilizada para a integração dos sinais. A Figura 41 representa os modelos de contribuições fatoriais de PLS-DA com “scaling” UV para normalização PQN, antes (a)) e depois (b)) da seleção de variáveis. Os gráficos de contribuições fatoriais encontram-se coloridos de acordo com os valores de VIP. Observando os dois gráficos concluiu-se que não existem diferenças significativas. As ressonâncias com maior importância foram identificadas como sendo: colesterol/ésteres de colesterol ($C(18)H_3$), ácidos gordos ($CH_3(CH_2)_n$), ácidos gordos ($(CH_2)_n$), ácidos gordos ($CH_2-CH=$), ácidos gordos (CH_2CO), ácidos gordos 22:6 ($-CH=CH-CH_2-CH_2-CO$), ácidos gordos 18:2 ($=CH-CH_2-CH=$), ácidos gordos 20:4 ($=CH-CH_2-CH=$), fosfolípidos ($^+N(CH_3)_3$), fosfolípidos ($CH_2-^+N(CH_3)_3$), glicerolfosfolípido ($C(3)H_2$) e fosfolípidos ($PO-CH_2$) em LV1 positivo, o que significa que amostras de do grupo controlo em LV1 positivo possuem níveis mais elevados destas ressonâncias quando comparados com as amostras de T21.

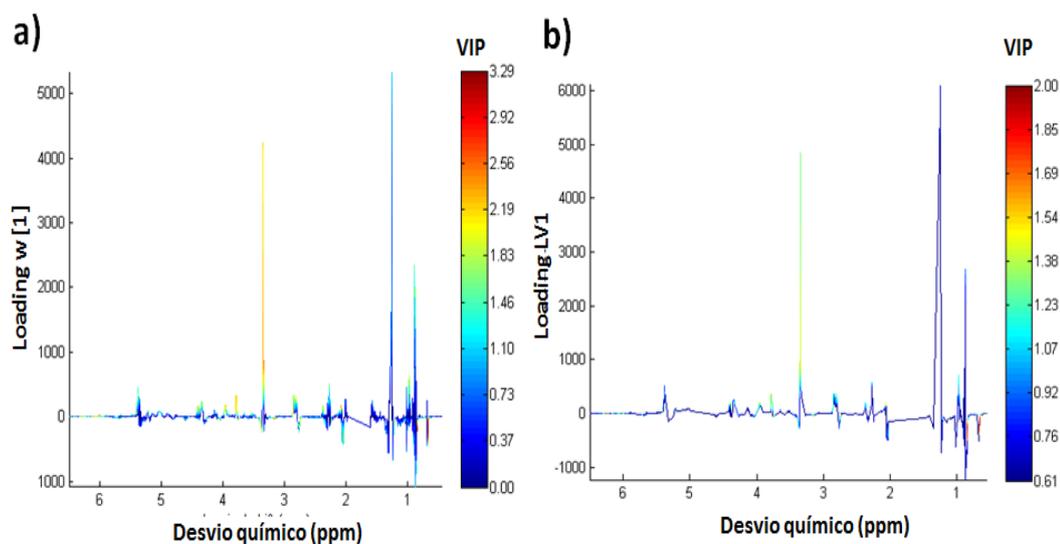


Figura 41. Gráfico de contribuições fatoriais colorido de acordo com os valores de VIP, do modelo de PLS-DA antes (a)) e depois (b)) da seleção de variáveis.

Após a integração dos sinais das ressonâncias que mais variam entre o grupo de T21 e o grupo controlo calculou-se para cada ressonância os respetivos valores de p utilizando o teste de Wilcoxon. Para ressonâncias com valores de p inferiores a 0,05 determinaram-se os valores de “effect size” para as médias padronizadas e a percentagem de variação. Os resultados desta análise encontram-se representados na Tabela 22.

Tabela 22. Resultados da análise univariada T21 vs. controlos do 2º trimestre (^a nível de significância 95% (p < 0.05); t=tripleto, s = singleto e m=multipeto).

Desvio químico /ppm (multiplicidade)	Composto	T21 (n=13) vs. Controlos (n=15)		
		Valor de p ^a	% Variação	Effect size
0,88-0,90 (t)	Ácidos gordos (CH ₃)	-	-	-
1,20-1,40 (s)	Ácidos gordos ((CH ₂) _n)	-	-	-
1,97-2,08 (m)	Ácidos gordos (CH ₂ -CH=)	-	-	-
2,23-2,35 (m)	Ácidos gordos (CH ₂ CO)	-	-	-
2,35-2,42 (m)	Ácidos gordos 22:6 (-CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CO)	4,7E-02	-6,7±3,6	-0,5±0,5
2,74-2,79 (m)	Ácidos gordos 18:2 (=CH-CH ₂ -CH=)	-	-	-
2,79-2,88 (m)	Ácidos gordos 20:4 (=CH-CH ₂ -CH=)	-	-	-
0,67-0,70 (s)	Colesterol/Éster de colesterol (C(18)H ₃)	-	-	-
3,22-3,41 (s)	Fosfolípidos (⁺ N(CH ₃) ₃ de fosfatidilcolina e esfingomielina)	7,6E-04	-6,1±1,9	-0,9±0,5
3,67-3,88 (s)	Fosfolípidos (CH ₂ - ⁺ N(CH ₃) ₃ de fosfatidilcolina e esfingomielina)	2,9E-04	-5,0±1,5	-0,9±0,5
4,32-4,45 (m)	Fosfolípidos (PO-CH ₂)	7,2E-03	-9,4±3,0	-0,9±0,5
3,88-4,03 (s)	Glicerofosfolípido (C(3)H ₂)	2,9E-03	-4,7±1,7	-0,7±0,5

De acordo com os resultados obtidos, as únicas ressonâncias que variam significativamente (valor de p < 0,05) entre os controlos e a doença são os ácidos gordos 22:6 (-CH=CH-CH₂-CH₂-CO), fosfolípidos ⁺N(CH₃)₃, CH₂-⁺N(CH₃)₃ e PO-CH₂ e glicerofosfolípidos C(3)H₂. Destas ressonâncias, a que varia mais são os fosfolípidos PO-CH₂ apresentando um valor de percentagem de variação igual a -9,4%. Os valores da percentagem de variação negativos indicam que estas ressonâncias encontram-se diminuídas nas amostras de T21 em comparação as amostras controlos. Os valores de “effect size” apresentam um grande valor de erro indicando que as diferenças entre o grupo de T21 e o grupo controlo não são significativas quando comparadas com as diferenças que existem intra-grupos.

Na Figura 42 encontram-se caixas de bigodes dos valores dos integrais das ressonâncias que apresentam diferenças significativas entre os grupos controles e T21.

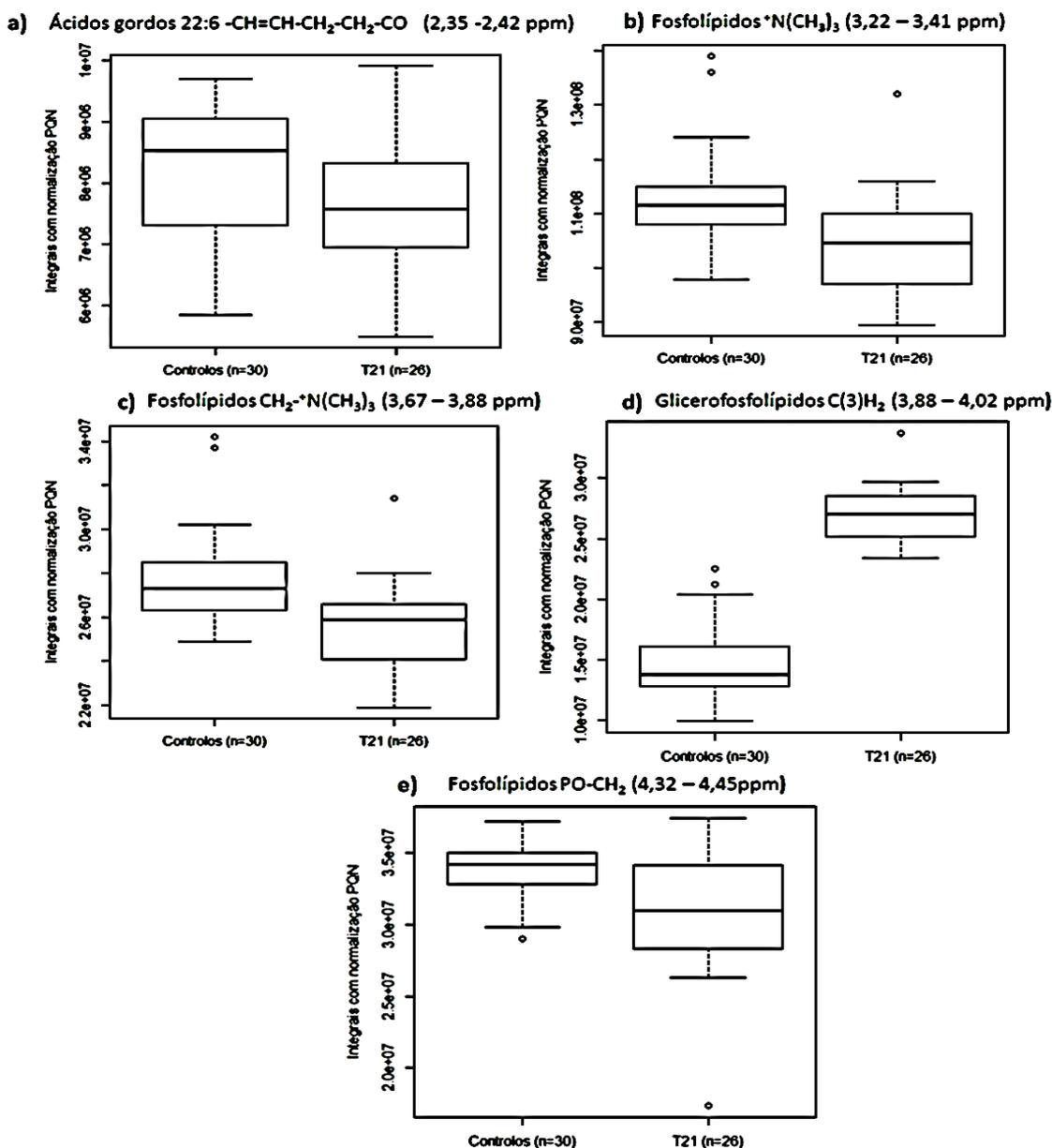


Figura 42. Caixas de bigodes dos integrais das ressonâncias com diferenças significativas entre controles e T21.

Observando as caixas de bigode podemos verificar que a variação nos ácidos gordos (-CH₂-CO) (Figura 42 a)), entre os grupos controles e T21, não é muito significativa visto que existe sobreposição de dados entre as caixas de bigodes dos dois grupos. Nos fosfolípidos, ⁺N(CH₃)₃ (Figura 42 b)), CH₂-⁺N(CH₃)₃ (Figura 43 c)) e PO-CH₂ (figura 42 e)), a variação entre os dois grupos já é mais significativa do que nos ácidos gordos (-CH₂-

CO), sendo maior para o grupo T21, uma vez que a sobreposição de dados é menor. É também de notar a presença de “outliers” em ambos os grupos de estudo. Por último temos as caixas de bigodes dos glicerofosfolípidos (C(3)H₂) (Figura 42 d)). Observado os gráficos podemos concluir que os glicerofosfolípidos (C(3)H₂) são melhores classificadores para T21 uma vez que a variação de dados entre estes dois grupos é significativa visto não haver sobreposição de dados.

4. Conclusões e perspectivas futuras

Este trabalho permitiu, com a utilização do método de extração de MTBE e da espectroscopia de RMN de ¹H de 1D e 2D, identificar diferenças na composição de espécies lipídicas presentes no plasma de mulheres grávidas (1º e 2º trimestres de gravidez), diagnosticadas com DMG (2º trimestre) e com fetos afetados com T21 (1º e 2º trimestres) quando comparadas com mulheres grávidas saudáveis.

A utilização de extratos lipídicos mostrou ser um método eficaz, que ao contrário da análise direta do plasma permite-nos obter sinais estreitos, o que permite uma boa identificação das espécies lipídicas do plasma. Porém, tem como desvantagens o facto de ser necessário muitas horas para realização da extração e a baixa reprodutibilidade do método de extração de MTBE.

A análise multivariada, para além de ter permitido identificar as diferenças existentes entre controlos e doenças, permitiu avaliar dois tipos de normalização, PQN e área total, e diferentes tipos de “scaling”, UV, Pareto e centrado, tendo sido a normalização PQN e o “scaling” UV os escolhidos como os melhores métodos para a classificação dos controlos e doenças. A análise da pós-DMG mostrou que mulheres grávidas com DMG no 2º trimestre de gravidez possuem níveis aumentados de lípidos quando comparados com controlos, apresentando maior variação na ressonância do esqueleto do glicerol dos triglicéridos C(1)H₂. O cálculo do “effect size” revelou que as diferenças entre o grupo controlo e pós-DMG são pequenas/poucas relativamente às variações que existem entre as amostras pertencentes ao mesmo grupo. Grávidas com fetos afetados por T21, tanto no 1º como no 2º trimestre, possuem níveis diminuídos de lípidos quando comparados com controlos, apresentando variações apenas na classe de fosfolípidos. Em ambos os trimestres a ressonância que possui maior variação entre controlo e doença corresponde aos fosfolípidos PO-CH₂, sendo esta variação maior no 1º trimestre. À semelhança do que

acontece na DMG as diferenças entre controlo e doença são pequenas quando comparadas com as diferenças intra-grupos.

No futuro, seria interessante a realização de um estudo de DMG no 1º trimestre para verificar que classes lipídicas se encontram alteradas. Para além disso, a utilização da espetrometria de massa (MS) para complementar este estudo com adição de mais informação sobre a classe de fosfolípidos e um melhor entendimento destas alterações podem vir a permitir a utilização de metabolitos do plasma materno como biomarcadores para estas doenças.

Bibliografia

1. Brugnara L, Vinaixa M, Murillo S, Samino S, Rodriguez MA, Beltran A, Lerin C, Davison G, Correig X, Novials A. Metabolomics approach for analyzing the effects of exercise in subjects with type 1 diabetes mellitus. *PloS One*. 2012; 7 (7): 1–8.
2. Wang C, Kong H, Guan Y, Yang J, Gu J, Yang S, Xu G. Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *Analytical Chemistry*. 2005; 77: 4108–4116.
3. Zhou X, Mao J, Ai J, Deng Y, Roth MR, Pound C, Henegar J, Welti R, Bigler SA. Identification of plasma lipid biomarkers for prostate cancer by lipidomics and bioinformatics. *PloS One*. 2012; 7 (11): 1–11.
4. Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, Müller B, Brockmöller S, Seppänen-Laakso T, Budczies J, Bucher E, Yetukuri L, Castillo S, Berg E, Nygren H, Sysi-Aho M, Griffin JL, Fiehn O, Loibl S, Richter-Ehrenstein C, Radke C, Hyötyläinen T, Kallioniemi O, Iljin, K, Oresic M. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Research*. 2011; 71 (9): 3236–3245.
5. Min HK, Lim S, Chung BC, Moon MH. Shotgun lipidomics for candidate biomarkers of urinary phospholipids in prostate cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011; 399 (2): 823–830.
6. Mader SS. *Understanding human anatomy and physiology*. 5th editio. Boston: MacGraw-Hill Higher Education; 2005.
7. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th editio. New York: W.H. Freeman; 2005.
8. Rivellese A, Vaccaro O, Patti L. The pathophysiology of lipid metabolism and diabetes. *International Journal of Clinical Practice*. 2004; 58 (142): 32–35.
9. Huda SS, Sattar N, Freeman DJ. Lipoprotein metabolism and vascular complications in pregnancy. *Clinical Lipidology*. 2009; 4 (1): 91–102.
10. Bishop M, Fody E, Schoeff L. *Clinical Chemistry: techniques, principles, correlations*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
11. Hadden DR, McLaughlin C. Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2009;14 (2): 66–71.
12. Herrera E, Ortega-Senovilla H. Disturbances in lipid metabolism in diabetic pregnancy—Are these the cause of the problem? *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010; 24: 515–525.

13. Nelson SM, Matthews P, Poston L. Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome. *Human Reproduction Update*. 2010; 16 (3): 255–275.
14. Koukkou E, Watts GF, Lowy C. Serum lipid, lipoprotein and apolipoprotein changes in gestational diabetes mellitus: a cross-sectional and prospective study. *Journal of Clinical Pathology*. 1996; 49 (8):634–637.
15. Couch SC, Philipson EH, Bendel RB, Pujda LM, Milvae RA, Lammi-Keefe CJ. Elevated lipoprotein lipids and gestational hormones in women with diet-treated gestational diabetes mellitus compared to healthy pregnant controls. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 1998; 12: 1–9.
16. Wijendran V, Bendel RB, Couch SC, Philipson EH, Thomsen K, Zhang X, Lammi-Keefe C J. Maternal plasma phospholipid polyunsaturated fatty acids in pregnancy with and without gestational diabetes mellitus: relations with maternal factors. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1999; 70 (1): 53–61.
17. Enquobahrie DA, Williams MA, Qiu C, Luthy DA. Early pregnancy lipid concentrations and the risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2005; 70: 134–142.
18. Sánchez-Vera I, Bonet B, Viana M, Quintanar A, Martín MD, Blanco P, Donnay S, Albi M. Changes in plasma lipids and increased low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in pregnancies complicated by gestational diabetes: consequences of obesity. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2007; 56: 1527–1533.
19. Paradisi G, Ianniello F, Tomei C, Bracaglia M, Carducci B, Gualano MR, La Torre G, Banci M, Caruso A. Longitudinal changes of adiponectin, carbohydrate and lipid metabolism in pregnant women at high risk for gestational diabetes. *Gynecological Endocrinology*. 2010; 26 (7): 539–545.
20. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Del Prato S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2003; 19 (4): 259–270.
21. Bocconi L, Nava S, Fogliani R, Nicolini U. Trisomy 21 is associated with hypercholesterolemia during intrauterine life. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1997; 176 (3): 540–543.
22. Pastor M, Sierra C, Navarro E, Brandi N, Mira A. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down syndrome patients. *Clinical Chemistry*. 1998; 44 (5): 924–929.
23. Jovanovic SVDC, Macleod K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down Syndrome. *Free Radical Biology & Medicine*. 1998; 25 (9): 1044–1048.

24. Murphy EJ, Schapiro MB, Rapoport SI, Shetty HU. Phospholipid composition and levels are altered in Down syndrome brain. *Brain Research*. 2000; 867 (1-2): 9–18.
25. Casado A, López-Fernández ME, Ruíz R. Lipid peroxidation in Down syndrome caused by regular trisomy 21, trisomy 21 by Robertsonian translocation and mosaic trisomy 21. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC*. 2007; 45 (1): 59–62.
26. Adelekan T, Magge S, Shults J, Stallings V, Stettler N. Lipid profiles of children with Down syndrome compared with their siblings. *Pediatrics*. 2012; 129 (6) : 1382–1387.
27. Miall L, Rudolf M, Levene M. *Paediatrics at a glance*. Massachusetts: Blackwell Science; 2003.
28. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins & Cotran-Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009.
29. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison's principles of internal medicine*. 18th ed. New York: McGraw Hill Professional; 2011.
30. Hultén MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, Iwarsson, E. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Molecular Cytogenetics*. 2008; 1 (21): 1–10.
31. Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY, Foo CHF, Xie B, Tsui NBY, Lun FMF, Zee BCY, Lau TK, Cantor CR, Lo YMD. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105 (51): 20458–20463.
32. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105 (42): 16266–16271.
33. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, Van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Grody WW, Nelson SF, Canick JA. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genetics in Medicine*. 2011; 13 (11): 913–920.
34. Papageorgiou EA, Fiegler H, Rakyan V, Beck S, Hulten M, Lamnissou K, Carter NP, Patsalis PC. Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *The American Journal of Pathology*. 2009; 174: 1609–1618.

35. Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nature Medicine*. 2011; 17: 510–513.
36. Diaz SO, Barros AS, Goodfellow BJ, Duarte IF, Galhano E, Pita C, Almeida M, Carreira IM, Gil AM. Second trimester maternal urine for the diagnosis of trisomy 21 and prediction of poor pregnancy outcomes. *Journal of Proteome Research*. 2013; 12: 2946–2957.
37. Bahado-Singh RO, Akolekar R, Mandal R, Dong E, Xia J, Kruger M, Wishart DS, Nicolaides K. Metabolomic analysis for first-trimester Down syndrome prediction. *American journal of Obstetrics & Gynecology*. 2013; 208 (5): 1–8.
38. Diaz SO, Pinto J, Graça G, Duarte IF, Barros AS, Galhano E, Pita C, Almeida M, Goodfellow BJ, Carreira IM, Gil AM. Metabolic biomarkers of prenatal disorders: an exploratory NMR metabolomics study of second trimester maternal urine and blood plasma. *Journal of Proteome Research*. 2011; 10: 3732–3742.
39. Graça G, Diaz SO, Pinto J, Barros AS, Duarte IF, Goodfellow BJ, Galhano E, Pita C, Almeida Maria, Carreira IM, Gil AM. Can Biofluids Metabolic Profiling Help to Improve Healthcare during Pregnancy? *Spectroscopy: An International Journal*. 2012; 27 (5-6) :515–523.
40. Haram K, Sjøfteland E, Bukowski R. Intrauterine growth restriction. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2006; 93: 5–12.
41. Loughna P. Intrauterine growth restriction: Investigation and management. *Current Obstetrics & Gynaecology*. 2006; 16: 261–266.
42. Slattery MM, Morrison JJ. Preterm delivery. *The Lancet*. 2002; 360: 1489–1497.
43. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008; 371 (9606): 5–84.
44. Graça G, Duarte IF, Barros AS, Goodfellow BJ, Diaz SO, Pinto J, Carreira, Isabel M, Galhano E, Pita C, Gil AM. Impact of prenatal disorders on the metabolic profile of second trimester amniotic fluid: a nuclear magnetic resonance metabolomic study. *Journal of proteome research*. 2010; 9: 6016–6024.
45. Diaz SO, Barros AS, Goodfellow BJ, Duarte IF, Carreira IM, Galhano E, Pita C, Almeida M, Gil AM. Following healthy pregnancy by nuclear magnetic resonance (NMR) metabolic profiling of human urine. *Journal of proteome research*. 2013; 12 (2) :969–979.
46. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Del Prato S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2003; 19 (4): 259–270.

47. Joanne Chatfield. ACOG issues guidelines on fetal macrosomia. American College of Obstetricians and Gynecologists. American Family Physician. 2001; 64 (1): 169–170.
48. Jensen F, Wallukat G, Herse F, Budner O, El-Mouseleh T, Costa S-D, Dechend R, Zenclussen AC. CD19+CD5+ cells as indicators of preeclampsia. Hypertension. 2012; 59 (4): 861–868.
49. Shenoy V, Kanasaki K, Kalluri R. Pre-eclampsia: connecting angiogenic and metabolic pathways. Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM. 2010; 21 (9): 529–36.
50. Turner E, Brewster JA, Simpson NAB, Walker JJ, Fisher J. Plasma from women with Preeclampsia has a low lipid and ketone body content-A nuclear magnetic resonance study. Hypertension in Pregnancy. 2007; 26: 329–342.
51. Nwosu Z, Omabe M. Maternal and Fetal Consequences of Preeclampsia. The Internet Journal of Gynecology and Obstetrics. 2009; 13 (1): 1–15.
52. Turner J a. Diagnosis and management of pre-eclampsia: an update. International Journal of Women’s Health. 2010; 2: 327–337.
53. Gharesi-Fard B, Zolghadri J, Kamali-Sarvestani E. Proteome differences of placenta between pre-eclampsia and normal pregnancy. Placenta. 2010; 31 (2): 121–125.
54. Kenny LC, Broadhurst DI, Dunn W, Brown M, North R a, McCowan L, Robert C, Cooper GJS, Kell DB, Baker PN. Robust early pregnancy prediction of later preeclampsia using metabolomic biomarkers. Hypertension. 2010;56 (4): 741–749.
55. Cheng Y, Caughey A. Gestational diabetes: diagnosis and management. Journal of Perinatology. 2008; 28: 657–64.
56. Singh SK, Rastogi A. Gestational diabetes mellitus. Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews. 2008; 2: 227–234.
57. Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A. Gestational diabetes: the need for a common ground. The Lancet. 2009; 373(9677): 1789–1797.
58. Falavigna M, Prestes I, Schmidt MI, Duncan BB, Colagiuri S, Roglic G. Impact of gestational diabetes mellitus screening strategies on perinatal outcomes: A simulation study. Diabetes Research and Clinical practice. 2013; 99: 358–365.
59. Marshall WJ, Bangert SK. Clinical Chemistry. 5th editio. New York: Mosby; 2004.
60. Hamilton RJ, Hamilton S. Lipid analysis: A pratical aproach. New York: Oxford University Press; 1994.

61. Orešič M. Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2009; 19: 816–824.
64. Myher JJ, Kuksis A. General strategies in chromatographic analysis of lipids. *Journal of Chromatography B*. 1995; 671 (1-2): 3–33.
65. Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*. 1986; 27: 114–120.
66. Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TVAS, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*. 2008; 49 (5): 1137–1146.
67. Kriat M, Vion-Dury J, Confort-Gouny S. Analysis of plasma lipids by NMR spectroscopy: application to modifications induced by malignant tumors. *Journal of Lipid Research*. 1993; 34: 1009–1019.
68. Oostendorp M, Engelke UFH, Willemsen MAAP, Wevers RA. Diagnosing inborn errors of lipid metabolism with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clinical Chemistry*. 2006;52 (7): 1395–1405.
69. Reis A, Rudnitskaya A, Blackburn GJ, Fauzi NM, Pitt AR, Spickett CM. A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. *Journal of Lipid Research*. 2013; 54 (7): 1812–1824.
70. Mussap M, Antonucci R, Noto A, Fanos V. The role of metabolomics in neonatal and pediatric laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta*. 2013; 426: 127–138.
71. Desiderio DM. *Mass Spectrometry: Clinical and biomedical applications*. volume 2. New York: Plenum, editor. 1994.
72. Lindon J, Nicholson J. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annual Reviews of Analytical Chemistry*. 2008; 1: 45–69.
73. Macomber RS. *A complete introduction to modern NMR spectroscopy*. New York: Wiley; 1998.
74. Keeler J. *Understanding NMR Spectroscopy*. New York: John Wiley and Sons; 2005.
75. Putri SP, Yamamoto S, Tsugawa H, Fukusaki E. Current metabolomics: technological advances. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2013; 116 (1): 9–16.

76. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2001; 39: 1–40.
77. Liland KH. Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011; 30 (6): 827–841.
78. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *Journal of Proteome research*. 2007; 6 (2): 469–479.
79. Andersen CM, Bro R. Variable selection in regression-a tutorial. *Journal of Chemometrics*. 2010; 24 (11-12): 728–737.
80. Quintás G, Portillo N, García-Cañaveras JC, Castell JV, Ferrer A, Lahoz A. Chemometric approaches to improve PLS-DA model outcome for predicting human non-alcoholic fatty liver disease using UPLC-MS as a metabolic profiling tool. *Metabolomics*. 2011;8 (1): 86–98.
81. Sun X-M, Yu X-P, Liu Y, Xu L, Di D-L. Combining bootstrap and uninformative variable elimination: Chemometric identification of metabonomic biomarkers by nonparametric analysis of discriminant partial least squares. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2012; 115: 37–43.
82. Di Anibal C V, Callao MP, Ruisánchez I. 1H NMR variable selection approaches for classification. A case study: the determination of adulterated foodstuffs. *Talanta*. 2011; 86: 316–323.
83. Cavill R, Keun HC, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK, Ebbels TMD. Genetic algorithms for simultaneous variable and sample selection in metabonomics. *Bioinformatics*. 2009; 25 (1): 112–118.
84. Lin X, Wang Q, Yin P, Tang L, Tan Y, Li H, Yan K, Xu G. A method for handling metabonomics data from liquid chromatography/mass spectrometry: combinational use of support vector machine recursive feature elimination, genetic algorithm and random forest for feature selection. *Metabolomics*. 2011; 7 (4): 549–558.
85. Fujiwara K, Sawada H, Kano M. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Input variable selection for PLS modeling using nearest correlation spectral clustering. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2012; 118: 109–119.
86. EG B, WJ D. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959; 37 (8): 911–917.
87. Retra K, Bleijerveld OB, van Gestel R a, Tielens AGM, van Hellemond JJ, Brouwers JF. A simple and universal method for the separation and identification of phospholipid molecular species. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*. 2008; 22 (12): 1853–1862.

88. Ferraz TPL, Fiúza MC, Santos MLA dos, Carvalho LP de, Soares NM. Comparison of six methods for the extraction of lipids from serum in terms of effectiveness and protein preservation. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2004; 58: 187–193.
89. Craig A, Cloarec O, Holmes E, Nicholson JK, Lindon JC. Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Analytical Chemistry*. 2006; 78 (7): 2262–2267.
90. Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabonomics. *Analytical Chemistry*. 2006; 78 (13): 4281–4290.
91. Van den Berg R a, Hoefsloot HCJ, Westerhuis J a, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*. 2006; 7: 1–15.
92. Xu Q-S, Liang Y-Z. Monte Carlo cross validation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2001; 56 (1): 1–11.
93. Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics : Official Journal of the Metabolomic Society*. 2013; 9 (2): 280–299.
94. Westerhuis J a., Hoefsloot HCJ, Smit S, Vis DJ, Smilde AK, van Velzen EJJ, van Duijnhoven JPM, van Dorsten FA. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*. 2008; 4 (1): 81–89.
95. Berben L, Sereika SM, Engberg S. Effect size estimation: methods and examples. *International Journal of Nursing Studies*. 2012; 49 (8): 1039–1047.
96. Papathanasiou A, Kostara C, Cung M-T, Seferiadis K, Elisaf M, Bairaktari E, Ioannis AG. Analysis of the composition of plasma lipoproteins in patients with extensive coronary heart disease using ¹H NMR spectroscopy. *Hellenic Journal of Cardiology*. 2008; 49: 72–78.
97. Srivastava NK, Pradhan S, Mittal B, Gowd GAN. High resolution NMR based analysis of serum lipids in Duchenne muscular dystrophy patients and its possible diagnostic significance. *NMR in Biomedicine*. 2010; 23: 13–22.
98. Tukiainen T, Tynkkynen T, Mäkinen V-P, Jylänki P, Kangas A, Hokkanen J, Vehtari A, Gröhn O, Hallikainen M, Soininen H, Kivipelto M, Groop P-H, Kaski K, Laatikainen R, Soininen P, Pirttilä T, Ala-Korpela M. A multi-metabolite analysis of serum by ¹H NMR spectroscopy: Early systemic signs of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008; 375: 356–361.

Web sites:

62. Christie WW. Preparation of lipid extracts from tissues. lipidlibrary.aocs.org. 2011.
63. Cyberlipid. Lipid extraction. www.cyberlipid.org. 2013.