

ANÁLISE DE METABOLÔMICA SÉRICA NÃO DIRECIONADA E COMPARATIVA ENTRE CÃES SAUDÁVEIS E DIABÉTICOS

LEONARDO A. PRÍNCIPE^{1*}, THIAGO H. A. VENDRAMINI¹; RAFAEL V. A. ZAFALON¹; PEDRO H. MARCHI¹; FABIO ALVES TEIXEIRA¹; MARCIO ANTONIO BRUNETTO¹

¹Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (Cepen Pet), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP), Pirassununga-SP

Contato: leoprincipe@usp.br / Apresentador: LEONARDO DE ANDRADE PRÍNCIPE

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar os perfis metabólicos do soro sanguíneo de cães diabéticos em comparação ao de cães saudáveis. Os metabólitos foram identificados a partir de espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H (RMN) de alta resolução, análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante de quadrados ortogonais parciais (OPLS-DA), que foram construídos usando o pré-processamento de escala de pareto do soro sanguíneo dos animais, de acordo com os componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2). O espectro do grupo diabético demonstrou aumento significativo nas permissões de algumas atribuições de metabólitos de sinais RMN. O grupo diabético agrupou-se em componentes principais negativos (PC2), mas generalizou-se através de componentes principais positivos (PC1). Os metabólitos que influenciaram a separação no eixo 1 foram α - e β -glicose. Além disso, animais distribuídos em PC2 positivo apresentaram concentrações mais elevadas de glicose e lactato. Cães diabéticos, em PC2 positivo, apresentaram concentrações mais elevadas de lipídios, lactato e aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA). Concluiu-se que o perfil de metabólitos de cães diabéticos difere do determinado em cães saudáveis. Cães diabéticos apresentaram aumento de glicose, lactato, BCAA e lipídeos.

PalavrasChaves: diabetes mellitus, metabólitos, lactato, BCAA, lipídeos

UNTARGET SERUM METABOLOMICS ANALYSIS COMPARING HEALTHY AND DIABETIC DOGS

Abstract: The aim of this study was to evaluate the metabolic profiles of the blood serum of diabetic dogs compared to healthy dogs. The metabolites were identified from high-resolution ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectra, principal component analysis (PCA) and partial orthogonal square discriminant analysis (OPLS-DA), which were constructed using preprocessing pareto scale of the animals' blood serum, according to principal components 1 (PC1) and 2 (PC2). The spectrum of the tested diabetic group increased significantly in the permissions of some metabolite assignments of NMR signals. The diabetic group was grouped into negative principal components (PC2), but generalized through positive principal components (PC1). The metabolites that influenced the separation on axis 1 were α - and β -glucose. Furthermore, animals distributed in positive PC2 showed higher levels of glucose and lactate. Diabetic dogs, with positive PC2, presented higher levels of lactate, lipids and branched-chain amino acids (BCAA). It was concluded that the metabolic profiles of diabetic dogs differ from healthy dogs. Diabetic dogs had increased glucose, lactate, BCAA and lipids.

Keywords: diabetes mellitus, lactate, BCAA, lipids

Introdução: O diabetes mellitus (DM) em cães é caracterizado pela deficiência parcial ou absoluta de insulina, decorrente da perda das células beta-pancreáticas (O'KELL & DAVISON, 2023). A análise metabolômica, por sua vez, permite identificar novos biomarcadores e assim elucidar novos princípios para as diferentes particularidades das doenças, desde de sua origem, tratamento e prevenção. A etiologia do diabetes mellitus canino assemelha-se em diversos aspectos ao diabetes mellitus tipo 1 (DM1) em humanos, portanto, os cães tornam-se um modelo experimental para estudos de DM1 em humanos (NELSON & REUSCH, 2014). Além disso, as variáveis observadas na análise metabolômica de cães diabéticos são semelhantes à de roedores e humanos (O'KELL et al., 2021). O objetivo desta pesquisa foi avaliar os perfis metabólicos em amostras de soro sanguíneo de cães diabéticos e compará-los com os de cães saudáveis, por meio da metabolômica.

Material e Métodos: Dez cães diabéticos e dez cães saudáveis foram selecionados. Todas as amostras de sangue foram coletadas pela manhã, o soro foi separado por centrifugação (1600g, 15 minutos) em até 30 minutos após a coleta e armazenado a -80°C. Os metabólitos foram identificados nos espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H (RMN) de alta resolução. Na sequência, análise de componentes principais (PC) e análise discriminante de quadrados ortogonais parciais (OPLS-DA) foram construídas a partir de pré-processamento de escala de pareto do sangue dos animais. Todos os experimentos de RMN foram realizados a 300 K, em um espectrômetro Bruker AVANCE III HD 600 NMR. Este foi equipado com sonda de detecção multinuclear de 5mm com gradiente z. Todos os desvios químicos de ¹H e ¹³C NMR foram observados em ppm relacionados ao sinal DSS a 0,00 ppm como referência interna e foi aplicado alargamento de linha exponencial de 0,3 Hz. Após a transformação de Fourier, os espectros foram faseados manualmente (zero e primeira fase) e as linhas de base foram corrigidas. Os metabólitos foram atribuídos com base nos deslocamentos químicos e multiplicidades de sinal, no software Chenomix. A análise multivariada dos espectros de ¹H NMR das 20 amostras de soro foi realizada no software SIMCA-P (versão 16.0, Umetrics). A análise de componentes principais (PCA) e a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram realizadas por meio de pré-processamento de escala de Pareto para o conjunto de dados (53 observações \times 236 variáveis).

Resultado e Discussão: O espectro do grupo diabético demonstrou aumento significativo de algumas atribuições de metabólitos de sinais de RMN (Figura 1). Os espectros dos animais diabéticos agruparam-se em componentes principais negativos (PC)1, mas generalizaram-se através de PC2. Os metabólitos que influenciaram a separação no eixo 1 foram α - e β -

glicose. Além disso, animais distribuídos em PC2 positivo apresentaram concentrações mais elevadas de glicose e lactato (Figura 2). Cães diabéticos, com PC2 positivo, apresentaram concentrações mais elevadas de lipídios, lactato e aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) (Figura 3). O aumento do lactato pode estar associado à diminuição do potencial de ação do hormônio insulina (JIN & MA, 2021) e ao decréscimo de metabólitos integrantes da glicólise (DUTTA et al., 2016). Estudos em humanos apontaram aumento de BCAA em pacientes diabéticos (DUTTA et al., 2016) e o mesmo foi observado para cães diabéticos. As maiores concentrações de BCAA apresentadas pelos animais diabéticos pode ser justificada em decorrência do aumento de valina observados nestes animais (O'KELL et al., 2021). Por fim, o aumento de lipídios foi descrito em humanos (DUTTA et al., 2016; VANGIPURAPU et al., 2021) e é justificado pelas alterações metabólicas em cães diabéticos, como a hiperlipidemia (TEIXEIRA, 2020).

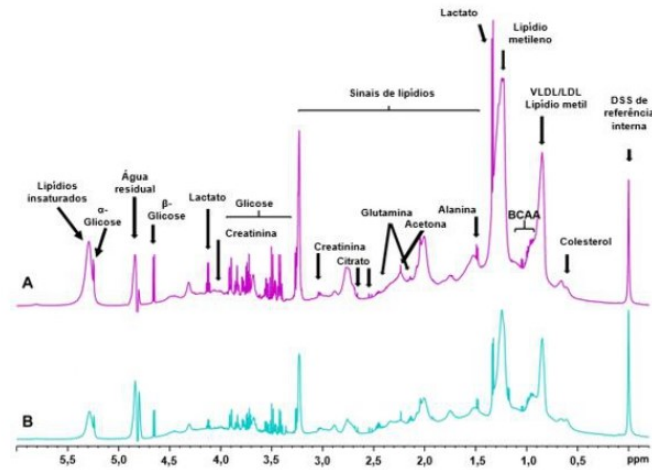


Figura 1. Espectros 1D NOESY-presat 1H NMR (600 MHz, 300 K) dos principais metabólitos detectados; (A) animais diabéticos; (B) animais saudáveis

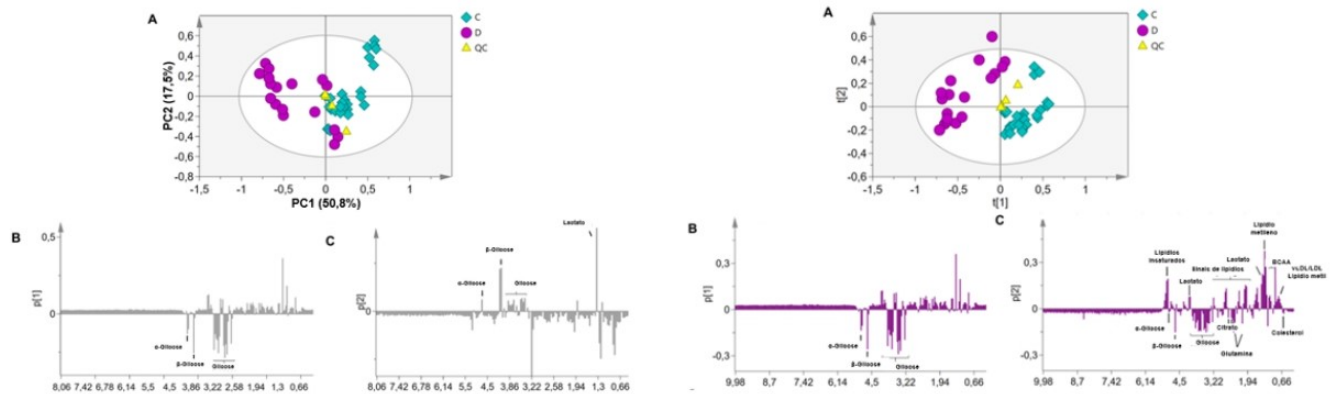


Figura 2. Análise de componentes principais (PCA) de dados de 1H NMR de soro de cães; (A) PCA Score gráfico de dispersão do primeiro componente principal (PC1) versus segundo componente principal (PC2); (B) Gráfico da coluna de carregamentos de PC1 do PCA, que aponta os principais metabólitos que influenciaram a separação; (C) Gráfico da coluna de carregamentos de PC2 do PCA, que aponta os principais metabólitos que influenciaram a separação

C: animais saudáveis; QC: pool de controle de qualidade das amostras; D: animais diabéticos.

Figura 3. Análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) de dados de 1H NMR de soro de cães; (A) Gráfico de dispersão de pontuação PLS-DA do eixo 1 versus eixo 2; (B) gráfico da coluna de cargas do eixo 1 do PLS-DA - principais metabólitos que influenciaram na separação; (C) Gráfico da coluna de carregamentos do eixo 2 do PLS-DA - principais metabólitos que influenciaram a separação

C: animais saudáveis; QC: pool de controle de qualidade das amostras; D: animais diabéticos.

Conclusão: Concluiu-se que o perfil de metabólitos de cães diabéticos, determinado de forma mais ampla por meio da metabolômica, difere do observado em cães saudáveis. Cães diabéticos apresentaram aumento de glicose, lactato, BCAAs e lipídios.

Agradecimentos: À Premier Pet e Capes.

Referências Bibliográficas: DUTTA, T., KUDVA, Y.C., PERSSON, X.M., SCHENCK, L.A., FORD, C.G., SINGH, R.J., CARTER, R., & NAIR, K.S. (2016). Impact of long-term poor and good glycemic control on metabolomics alterations in type 1 diabetic people. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101, p. 10023-1033. JIN, Q., MA, R.C.W. (2021). Metabolomics in Diabetes and Diabetic Complications: Insights from Epidemiological Studies. *Cells*, 11(10), p. 11-38. NELSON, R., REUSCH, C. (2014). Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dog. *The Journal of endocrinology*, 222(3), p. 1-9. O'KELL, A.L., WASSERFALL, C., GUINGAB-CAGMAT, J., WEBB-ROBERSTON, B.M., ATKINSON, M.A., GARRETT, T.J. (2021). Targeted metabolomic analysis identifies increased serum levels of GABA and branched chain amino acids in canine diabetes. *Metabolomics*, 17(11), 100. O'KELL, A.L., DAVISON, L.J. (2023). Etiology and Pathophysiology of Diabetes Mellitus in Dogs. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, p. 1-18. TEIXEIRA F.A. (2020). Respostas metabólicas de cães diabéticos alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de ômega-3. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – University of São Paulo, São Paulo. VANGIPURAPURU, J., SILVA, L. F., KUULASMAA, T., SMITH, U., LAAKSON, M. (2020). Microbiota-Related Metabolites and the Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 43(6), p. 1319-1325.