

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

JONAS RIBEIRO DA ROSA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO URINÁRIO NO
BINÔMIO *DIABETES MELLITUS* E SARS-COV-2**

Bragança Paulista
2023

JONAS RIBEIRO DA ROSA – R.A.:202127426

**AVALIAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO URINÁRIO NO
BINÔMIO *DIABETES MELLITUS* E SARS-COV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: (Farmacologia ou Biologia Molecular e Celular; para os alunos ingressantes a partir de 2021: Área de Concentração: Ciências da Saúde)

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Andreia de Melo Porcari

Bragança Paulista
2023

WD 200 Rosa, Jonas Ribeiro da.
R695a Avaliação do perfil metabólico urinário no binômio diabetes mellitus e SARS-COV-2 / Jonas Ribeiro da Rosa. – Bragança Paulista, 2023.
82 p.

Dissetação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Andreia de Melo Porcari.

1. Metabólica. 2. SARS-CoV-2. 3. Diabetes Mellitus.
4. Urina. I. Porcari, Andreia de Melo. II. Título.



ROSA, Jonas Ribeiro da. "Avaliação do perfil metabólico urinário no binômio *Diabetes Mellitus* e SARS-COV-2". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 26 de outubro de 2023 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Andréia de Melo Porcari - Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya
(por videoconferência)
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Leonardo Henrique Dalcheco Messias
Universidade São Francisco

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha gratidão à Universidade São Francisco que proporcionou um ambiente acadêmico inspirador, bem como uma equipe profissional e instalações, que possibilitaram uma experiência enriquecedora e inesquecível durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Gostaria de expressar minha imensa gratidão à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). O apoio financeiro concedido pela CAPES foi fundamental para que realização de meu mestrado.

Gostaria de agradecer imensamente a minha orientadora, prof. Dr^a Andreia de Melo Porcari. Sua orientação precisa e rigorosa contribuiu significativamente para meu crescimento como pesquisador. Sua capacidade de motivar e inspirar me encorajou a buscar novos desafios. É com muita admiração e gratidão que reconheço o papel fundamental nesta trajetória acadêmica, sendo um exemplo de dedicação, conhecimento e competência profissional. Sou profundamente grato pela confiança depositada em mim e por ter tido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus amigos Alexandre, Alex, Danilo, Pedro e Junier por sua inestimável contribuição para a conclusão dessa dissertação. A orientação, conhecimento especializado, feedback construtivo e colaboração ativa que recebi de cada um deles foram fundamentais para o sucesso dessa jornada acadêmica. Sua dedicação, inspiração e apoio foram verdadeiramente valorizados e sou extremamente grato por conhecê-los e tê-los em minha vida acadêmica.

A ciência é uma empreitada que exige esforços coletivos, não sendo possível realizá-la de maneira individual. Nesse sentido, gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho acadêmico.

Epígrafe

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”
Antoine de Saint-Exupéry*

Antoine de Saint-Exupéry
O pequeno príncipe. Editora Schwarcz-Companhia das Letras, 2015.

RESUMO

A pandemia de COVID-19 representou um dos maiores desafios globais de saúde até o momento. Apesar dos avanços na compreensão e tratamento da COVID-19, lacunas de conhecimento persistem, especialmente em relação aos impactos do vírus em pacientes com doenças pré-existentes. Comorbidades de base como cardiopatias, hipertensão, obesidade e diabetes, acentuam os riscos de complicações e mortalidade. No Brasil, a diabetes afeta cerca de 10% da população e poucos estudos investigaram o perfil metabólico de diabéticos, acometidos ou não pela infecção por SARS-CoV-2. Nesse contexto e inspirados por trabalhos anteriores de nosso grupo utilizando a urina como ferramenta diagnóstica para COVID-19, aplicamos a avaliação metabolômica urinária para caracterizar voluntários diabéticos e voluntários com COVID-19, possuindo essas enfermidades de forma concomitante ou isolada. Foram coletadas amostras de urina de 357 participantes de pesquisa que, após exclusões, resultaram em 109 amostras, divididas em quatro grupos: voluntários diabéticos com COVID-19 (DPCP), voluntários não diabéticos com COVID-19 (DNCP), voluntários diabéticos sem COVID-19 (DNCN) e voluntários não diabéticos sem COVID-19 (DNPN). O estudo recebeu aprovação do comitê de ética (CAAE: 31573020.9.0000.5514). As amostras de urina foram inativadas termicamente, diluídas e analisadas utilizando cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, por meio de uma abordagem global (*untargeted*), permitindo a ampla detecção de metabólitos, tanto em modo positivo quanto negativo de ionização. A simplicidade do preparo amostral resultou num método altamente reprodutível e preciso. A elevada sensibilidade desta plataforma analítica permitiu a detecção de mais de 21 mil metabólitos, possibilitando a identificação de diferenças entre os quatro grupos estudados. Foi possível identificar metabólitos exógenos e endógenos, sendo os últimos priorizados para caracterização dos grupos. A presença de COVID-19 foi apontada por 19 metabólitos endógenos identificados. A presença concomitante de diabetes e COVID-19 impactou em 31 metabólitos identificados. Além disso, foram observadas diferenças notáveis no perfil metabólico de voluntários diabéticos com COVID-19 (DPCP) em comparação com voluntários não diabéticos com COVID-19 (DNCP). O grupo DPCP apresentou, por exemplo, maior abundância de ácido diidrowyerona em comparação ao grupo DNCP, sugerindo uma resposta inflamatória mais acentuada nos voluntários diabéticos afetados pelo SARS-CoV-2. Apesar de não terem sido identificadas vias metabólicas, foram destacadas 157 moléculas de interesse, com funções metabólicas conhecidas, predominando informações relacionadas a aminoácidos e acilcarnitinas. Futuras pesquisas devem se aprofundar na análise funcional desses metabólitos e considerar a integração com outras técnicas, como a avaliação de citocinas inflamatórias, a fim de oferecer uma visão abrangente das patologias associadas à diabetes e COVID-19. Essa abordagem multidisciplinar tem o potencial de revelar novos mecanismos inflamatórios presentes em comorbidades, buscando terapias mais precisas e eficazes para o tratamento dessas patologias quando associadas.

Palavras-chaves: Metabolômica; SARS-Cov-2; Diabetes Mellitus; Urina

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has represented one of the most significant global health challenges to date. Despite advances in understanding and treating COVID-19, knowledge gaps persist, especially regarding the impacts of the virus on patients with pre-existing conditions. Underlying comorbidities such as heart disease, hypertension, obesity, and diabetes accentuate the risks of complications and mortality. In Brazil, diabetes affects approximately 10% of the population, and few studies have investigated the metabolic profile of diabetic patients, whether affected by SARS-CoV-2 infection or not. In this context and inspired by previous work from our group using urine as a diagnostic tool for COVID-19, we applied urinary metabolomic evaluation to characterize diabetic patients and COVID-19 patients, either individually or concurrently affected by these conditions. Urine samples were collected from 357 research participants, resulting in 109 samples after exclusions, categorized into four groups: diabetic patients with COVID-19 (DPCP), non-diabetic patients with COVID-19 (DNCP), diabetic patients without COVID-19 (DNCN), and non-diabetic patients without COVID-19 (DNPN). The study received ethics committee approval (CAAE: 31573020.9.0000.5514). Urine samples were thermally inactivated, diluted, and analyzed using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with high-resolution mass spectrometry, employing an untargeted approach, allowing for the comprehensive detection of metabolites in both positive and negative ionization modes. The simplicity of the sample preparation resulted in a highly reproducible and accurate method. The high sensitivity of this analytical platform enabled the detection of over 21,000 metabolites, facilitating the identification of differences among the four studied groups. Both exogenous and endogenous metabolites were identified, with a focus on the latter for group characterization. The presence of COVID-19 was indicated by 19 identified endogenous metabolites. The concurrent presence of diabetes and COVID-19 impacted 31 identified metabolites. Furthermore, noticeable differences were observed in the metabolic profile of diabetic patients with COVID-19 (DPCP) compared to non-diabetic patients with COVID-19 (DNCP). For instance, the DPCP group exhibited a higher abundance of dihydroxyteronic acid compared to the DNCP group, suggesting a more pronounced inflammatory response in diabetic patients affected by SARS-CoV-2. Although specific metabolic pathways were not identified, 157 molecules of interest were highlighted, primarily related to known metabolic functions, with an emphasis on amino acids and acylcarnitines. Future research should delve into the functional analysis of these metabolites and consider integration with other techniques, such as the assessment of inflammatory cytokines, to provide a comprehensive understanding of the pathologies associated with diabetes and COVID-19. This multidisciplinary approach has the potential to unveil new inflammatory mechanisms present in comorbidities, aiming to develop more precise and effective therapies for the treatment of these conditions when they occur.

Keywords: Metabolomics; SARS-CoV-2; Diabetes Mellitus; Urine.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

| |
|---|
| AGE - Advanced Glycation End-Product |
| COVID-19 - Coronavirus Disease 2019 |
| CV - Coeficiente de Variação |
| DM - Diabetes Mellitus |
| DNCN - Voluntários não diabéticos negativos para COVID-19 |
| DNCP - Voluntários não diabéticos positivos para COVID-19 |
| DPCN - Voluntários diabéticos negativos para COVID-19 |
| DPCP - Voluntários diabéticos positivos para COVID-19 |
| ESI - <i>Eletrospray ionization</i> |
| FIA - <i>Flow Injection Analysis</i> |
| NET - <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> |
| MCP - Multi Channel Plate |
| MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas |
| mRNA – Messenger Ribonucleic Acid |
| PLS-DA - Partial Least Squares-Discriminant Analysis |
| RT-PCR - Reação em Cadeia Da Polimerase Por Transcriptase Reversa |
| SRA - Síndrome Respiratória Aguda |
| SRAG - Síndrome Respiratória Aguda Grave |
| TOF - <i>Time of flight</i> |
| UTI - Unidades De Terapia Intensiva |
| VIP - <i>Variable Importance in Projection</i> |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------|---|
| Figura 1 - Homeostase glicêmica. | 5 |
|---------------------------------------|---|

| | |
|--|----|
| Figura 2 - Tipos de Diabetes: Esquema ilustra a diferença entre os principais tipos de diabetes. ... | 6 |
| Figura 3 - Principais campos das Ciências Ômicas..... | 10 |
| Figura 4 - Representação esquemática da fonte de ionização por electrospray (ESI)..... | 12 |
| Figura 5 - Representação Esquemática De Um Analisador De Massa Quadrupolo. | 13 |
| Figura 6 - Representação Esquemática De Um Espectrômetro de Massa Triplo-Quadrupolo. | 14 |
| Figura 7 - Representação Esquemática da formação de urina pelos rins. | 15 |
| Figura 8 - Análise de Componentes Principais (PCA) indicando discriminação entre os grupos e amostras de controle de qualidade (QC)..... | 26 |
| Figura 9 - Principais Categorias de metabólitos identificados. | 28 |
| Figura 10 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os quatro grupos. | 29 |
| Figura 11 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os grupos DNCN e DNCP..... | 30 |
| Figura 12 - Distribuição de metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DNCN e DNCP. | 31 |
| Figura 13 - Box plots da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos na urina dos grupos DNCN e DNCP. | 34 |
| Figura 14 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os grupos DNCN e DPCN..... | 35 |
| Figura 15 - Distribuição de metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DNCN e DPCN. | 36 |
| Figura 16 - Box plots da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos na urina dos grupos DNCN e DPCN. | 40 |
| Figura 17 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os grupos DNCN e DNCP..... | 41 |
| Figura 18 - Distribuição de metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DPCN e DNCP. | 42 |
| Figura 19 - Box plots da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos na urina dos grupos DNCN e DPCN. | 45 |
| Figura 20 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os grupos DPCP e DPCN. | 46 |
| Figura 21 - Distribuição de metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DPCP e DPCN. | 47 |
| Figura 22 - Box plots da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos na urina dos grupos DPCN e DPCP..... | 51 |
| Figura 23 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os grupos DPCP e DNCP. | 52 |
| Figura 24 - Distribuição de metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DPCP e DNCP. | 53 |
| Figura 25 - Box plots da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos na urina dos grupos DPCP e DNCP..... | 55 |

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1. Comparação de Grupos de Casos e Controles em Diferentes Abordagens. | 22 |
| TABELA 2. Informações clínicas obtidas dos voluntários recrutados para o estudo. | 25 |
| TABELA 3. Número de metabólitos estatisticamente diferenciais selecionados por p-valor < 0,05 na ANOVA e VIP > 1,0. | 27 |
| TABELA 4. Metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DNCN e DNCP. | 31 |
| TABELA 5. Metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DNCN e DPCN. Seleção | 36 |
| TABELA 6. Metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DNCP e DPCN. | 42 |
| TABELA 7. Metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DPCP e DPCN. | 47 |
| TABELA 8. Metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DPCP e DNCP. | 53 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. | A Pandemia da Covid-19: Aspectos e Perspectivas Gerais | 1 |
| 1.2. | Marcadores para diagnóstico, avaliação de risco e predição prognóstica da COVID-19. | 2 |
| 1.3. | Regulação glicêmica e a Diabetes Mellitus | 4 |
| 1.4. | Diabetes Mellitus e COVID-19 | 7 |
| 1.5. | A Metabômica | 9 |
| 1.6. | Espectrometria de Massas..... | 11 |
| 1.7. | A Urina como Matriz Biológica | 14 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1. | Objetivo geral: | 17 |
| 2.2. | Objetivos específicos: | 17 |
| 3. | HIPÓTESE | 18 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 4.1. | Desenho do estudo e aspectos éticos | 19 |
| 4.2. | Seleção das amostras | 19 |
| 4.2.1. | Coleta e acondicionamento das amostras | 19 |
| 4.2.2. | Crterios de inclusão e exclusão de amostras e cálculo do tamanho amostral | 19 |
| 4.2.3. | Dados clínicos | 20 |
| 4.3. | Preparo das amostras | 20 |
| 4.4. | Análise global (<i>untargeted</i>) por UPLC-QToF-MS..... | 21 |
| 4.5. | Análise estatística dos dados e seleção de variáveis discriminatórias | 22 |
| 5. | RESULTADOS | 24 |
| 5.1. | Conjunto amostral e Dados clínicos | 24 |
| 5.2.1. | Análise de componentes principais UPLC-QToF-MS | 25 |
| 5.2.2. | Seleção dos metabólitos estatisticamente diferenciais | 26 |
| 5.2.3. | Análise Multivariada PLS-DA UPLC-QToF-MS | 28 |
| 5.2.4. | Alterações no metabolôma devido à infecção por COVID-19..... | 29 |
| 5.2.5. | 5.2.3.2 Alterações no metabolôma devido à Diabetes..... | 34 |
| 5.2.6. | Comparação do Metabolôma entre os grupos inflamados..... | 40 |
| 5.2.7. | Alterações no metabolôma diabético devido à infecção por COVID-19 | 45 |
| 5.2.8. | Alterações no metabolôma de acometidos por COVID-19 devido à presença de Diabetes ⁵¹ | |
| 6. | CONCLUSÕES | 56 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Pandemia da Covid-19: Aspectos e Perspectivas Gerais

No final de 2019 ocorreu o surgimento e a dispersão de um novo patógeno viral nomeado de SARS-CoV-2 ou simplesmente coronavírus, causador de uma nova doença batizada de COVID-19, trazendo consequências desastrosas não apenas no âmbito da saúde humana, mas também nos aspectos sociais, econômicos e políticos de todo o mundo (ISER et al, 2020). Os sinais e sintomas mais frequentes entre os casos confirmados da COVID-19 são análogos à uma síndrome gripal comum, também chamada de Síndrome Respiratória Aguda (SRA) e consistem em febre alta, tosse, fadiga, dor de cabeça e garganta, coriza e calafrios. No entanto, outros sintomas menos comuns e difíceis de mensurar de forma objetiva foram associados à doença, como perda ou diminuição do olfato e do paladar, além de sintomas mais graves, como dificuldade respiratória com consequente dessaturação, que podem evoluir para uma grave pneumonia. Nos primeiros meses da pandemia, tais sintomas foram importantes no rastreamento da infecção por SARS-Cov-2, entretanto, após o início da vacinação, os sintomas expressaram-se de forma mais branda e muitas vezes subclínica (SWAIN & JENA, 2021).

Nos aspectos que tangem às manifestações clínicas, a COVID-19 exhibe impactos em diversos órgãos do sistema respiratório. Sua progressão pode levar à complicação do quadro clínico e, quando há critérios de gravidade associados aos sinais e sintomas presentes, a SRA é caracterizada como grave (SRAG) (WU et al, 2021). Os principais critérios de gravidade avaliados são: dispneia, desconforto respiratório, saturação menor que 95% e descompensação de comorbidades de base como hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia, entre outras disfunções metabólicas comuns à população em geral (WU et al, 2021). Além disso, manifestações deletérias também foram identificadas em outros sistemas e órgãos como cérebro, sistema hematológico, fígado, rins, sistema endócrino (SWAIN & JENA, 2021).

Com o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes, consideradas até o presente momento a mais promissora abordagem para o controle das complicações resultantes da infecção pelo coronavírus, o cenário de crise sanitária gerado pela pandemia de COVID-19 foi atenuado. Apesar disso, a infecção pelo SARS-Cov-2, ainda ocasiona elevado número de contaminações e mortes no Brasil (BRASIL, 2022) e embora a compreensão e o tratamento da doença tenham evoluído rapidamente ao longo dos meses, ainda há inúmeras perguntas a serem respondidas e limitadas

informações para caracterizar precisamente as diversificadas manifestações clínicas e epidemiológicas da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Nesse sentido, o SARS-Cov-2 continuará impactando a sociedade e, portanto, ainda expressa riscos à saúde pública, uma vez que uma quantidade significativa de pessoas, principalmente as que não apresentam o esquema vacinal completo, ao contraírem a doença necessitam de assistência hospitalar e potenciais cuidados intensivos. Sendo assim, a investigação científica acerca da COVID-19 é fundamental para a melhoria da qualidade do diagnóstico e prognóstico dos pacientes acometidos por essa infecção (ISER et al, 2020).

1.2. Marcadores para diagnóstico, avaliação de risco e predição prognóstica da COVID-19

Alguns fatores de risco associados à mortalidade por COVID-19 e marcadores de gravidade vêm sendo propostos, com a disponibilidade cada vez maior de informações acerca desta doença. O estado clínico dos pacientes com COVID-19, em particular os níveis de saturação periférica de oxigênio e a presença de comorbidades de base, geralmente determinam a necessidade de admissão em unidades de terapia intensiva (UTI) (WU et al, 2021).

Entre os parâmetros laboratoriais, Velavan & Meyer (2020), apontam correlação significativa com a gravidade da doença relacionada à baixa contagem de linfócitos, bem como os níveis séricos de proteína C-reativa, dímero D, ferritina, troponina cardíaca e interleucina-6 (IL-6), indicando um curso desfavorável da doença quando alguns ou todos esses parâmetros encontraram-se alterados (VELAVAN & MEYER, 2020).

Yao e colaboradores (2020) também evidenciaram a correlação do dímero D com um prognóstico desfavorável, ao avaliar retrospectivamente os casos de 248 pacientes de COVID-19, apontando que uma concentração de dímero D $> 2,0 \text{ mg L}^{-1}$ na admissão hospitalar do paciente está associada com uma probabilidade de morte dez vezes maior [*Odds Ratio* 10.17 (95% CI 1,10–94,38), $p = 0,041$] (YAO et al, 2020). Este estudo mostrou ainda que a presença do dímero D $> 2,0 \text{ mg L}^{-1}$ na admissão gerou um modelo preditivo de óbito com sensibilidade de 88,2% e especificidade de 71,3%, com área sob a curva (AUC) de 0,85 (95% CI = 0,77–0,92). Neutrófilos elevados em sangue periférico também foram apontados como indicadores precoces de infecção por SARS-CoV-2 (ZHANG et al, 2020), sendo reportado que altos níveis de armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*, NETs) foram observados

em pacientes com COVID-19. NETs são estruturas constituídas de componentes intracelulares como fibras de cromatina e proteínas derivadas de grânulos citoplasmáticos, sendo um dos fatores responsáveis pela liberação de citocinas e desenvolvimento de insuficiência respiratória (ZUO et al, 2020).

Mais recentemente, Palmisano e colaboradores (2020), reportaram que o perfil proteômico plasmático detectado por espectrometria de massas é capaz de diferenciar o grau de gravidade da doença e prever o prognóstico de pessoas infectadas por COVID-19 (LAZARI et al, 2021). Alguns estudos têm demonstrado que a composição proteômica e metabolômica de swabs orofaríngeos e biofluidos de pacientes com COVID-19 são capazes de serem utilizadas como ferramenta diagnóstica (NACHTIGALL, PEREIRA, TROFYMCHUK, & SANTOS, 2020; CARDOZO et al, 2020; DELAFIORI et al, 2021).

Outros autores apontaram ainda alterações significativas do proteoma e lipidoma de pacientes infectados pelo SARS-Cov-2 (NACHTIGALL, PEREIRA, TROFYMCHUK, & SANTOS, 2020; SCHWARZ et al, 2022). O estudo realizado por Schwarz e colaboradores (2022) encontrou significativa diferenciação lipidômica ao analisar plasma de pacientes infectados pela COVID-19. Os autores conseguiram diferenciar, através do perfil de mediadores de resposta imune, pacientes infectados e saudáveis. Além disso, foi possível classificar, através da diferenciação de mediadores lipídicos de resposta imune, os pacientes com doença moderada ou grave. Nesse sentido, as alterações lipidômicas possibilitaram a identificação de pacientes positivos para a COVID-19 e a categorização dos mesmos, de acordo com a severidade da doença (SCHWARZ et al, 2022). Em paralelo, algumas comorbidades como obesidade, doenças cardíacas, diabetes e hipertensão, relacionaram-se positivamente com alterações no perfil dos mediadores lipídicos e refletiram num aumento da severidade da doença (SCHWARZ et al, 2022).

Nosso grupo de pesquisa também tem dedicado esforços na busca de marcadores metabólicos para diagnóstico e prognóstico da COVID-19. Nesse sentido, desenvolvemos uma parceria internacional para adaptação da nova tecnologia analítica *MasSpec Pen* e espectrometria de massas para uso na detecção direta de metabólitos diagnósticos de COVID-19 em swab orofaríngeo (GARZA et al, 2021). Nosso experimento, realizado a partir de amostras de 244 indivíduos de hospitais de Bragança Paulista, incluindo voluntários hospitalizados por SRAG com diagnóstico positivo e negativo para COVID-19, além de indivíduos saudáveis, permitiu um rápido diagnóstico

(menos de 1 minuto) baseado no rico perfil lipídico de swab nasofaríngeos. O método preditivo utilizando *machine learning* demonstrou capacidade de distinção entre voluntários PCR-positivo e PCR-negativo com acurácia de 83.5%, sensibilidade de 76.6% e especificidade de 86.6%. Entre as moléculas diferenciais foram encontrados lipídios, ceramidas, aminoácidos, entre outras classes de metabólitos. Ainda, desenvolvemos um projeto utilizando urina como matriz diagnóstica com análise por injeção em fluxo (do inglês *flow injection analysis*, FIA) acoplada à espectrometria de massas, com ótimos resultados de sensibilidade e especificidade (MOURA et al 2022). Esse método é voltado para a detecção de aminoácidos e acilcarnitinas, utilizando adaptação da metodologia utilizada para triagem neonatal de doenças congênitas e erros inatos do metabolismo, conhecido popularmente como 'teste do pezinho' (CHACE, KALAS & NAYLOR, 2003; LA MARCA, 2014).

Como perspectiva desses trabalhos, a capacidade prognóstica desse conjunto de informações metabolômicas também será explorado para permitir o diagnóstico e estratificação de voluntários, bem como uma possível intervenção clínica acelerada em casos de prognóstico desfavorável. A determinação de biomoléculas fortemente relacionadas com a presença do vírus e o curso da doença pode auxiliar no entendimento da ação do vírus sobre o organismo, de forma sistêmica, sendo esta informação essencial para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas (NACHTIGALL, PEREIRA, TROFYMCHUK, & SANTOS, 2020; CARDOZO et al, 2020; DELAFIORI et al, 2021, SCHWARZ et al, 2022). Assim, a correlação dos metabólitos diferenciais com as condições e marcadores clínicos e bioquímicos pode revelar vias e alvos terapêuticos para avançar no entendimento e tratamento da doença.

1.3. Regulação glicêmica e a Diabetes Mellitus

A concentração plasmática de glicose, também chamada de glicemia, desempenha um papel bioenergético essencial ao metabolismo celular. O estado de normalidade glicêmica em jejum é de 70 mg dL⁻¹ a 100 mg dL⁻¹, podendo chegar até 140 mg dL⁻¹ após a alimentação (HALL, 2021; PITITTO et al, 2022). A regulação dos níveis da glicose sanguínea depende essencialmente de dois hormônios: a insulina e o glucagon. A insulina é um hormônio anabólico que potencializa a captação, a utilização e o armazenamento da glicose pela maioria das células do organismo. Um dos principais fatores que estimula a secreção desse hormônio pelo pâncreas é a elevação da concentração sérica de glicose. Em contrapartida, o glucagon atua de maneira oposta, sendo um

hormônio catabólico, que estimula a liberação da glicose previamente armazenada, elevando por consequência a glicemia (HALL, 2021). A Figura 1 mostra esquematicamente os mecanismos homeostáticos glicêmicos.

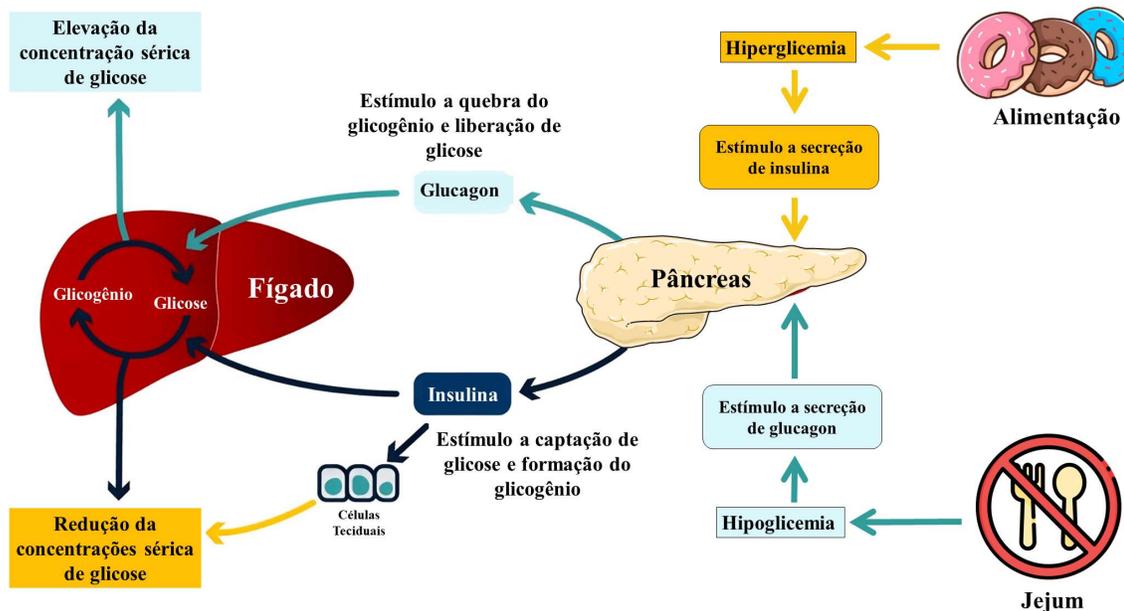


Figura 1 - Homeostase glicêmica. A insulina promove a captação celular de glicose, diminuindo a concentração sua sanguínea. O glucagon eleva os níveis de glicose, estimulando a liberação da mesma pelo fígado. FONTE: Adaptado de BOEHRINGER, 2023.

A elevação da concentração glicêmica gera um quadro de hiperglicemia. Quando os níveis de glicose aumentam significativamente, há o risco de desencadear uma desidratação celular devido ao aumento da pressão osmótica. Além disso, o estado hiperglicêmico resulta na elevação da eliminação de glicose pela urina. A excreção de glicose na urina desencadeia diurese osmótica nos rins, levando à potencial diminuição dos líquidos e eletrólitos no corpo. Por fim, devido a sua elevada reatividade, a glicose tem o potencial de interagir com diversas moléculas sanguíneas, gerando produtos glicosilados reativos que em excesso podem causar lesões em diversas células e tecidos, especialmente nos vasos sanguíneos (AYALA, 2019; HALL, 2021).

Em contrapartida, a queda da concentração glicêmica abaixo de 70 mg dL^{-1} , leva a um quadro chamado de hipoglicemia, ocasionado o inadequado fornecimento energético ao cérebro. Isso pode resultar em sintomas como fome intensa, tremores, sudorese, tontura, irritabilidade e, em casos mais graves, confusão e perda de consciência (HALL, 2021). Dessa forma, a manutenção da homeostase glicêmica é fundamental para assegurar o adequado fornecimento energético para as células e tecidos do organismo, permitindo a utilização da glicose de maneira contínua e controlada,

além de modular flutuações glicêmicas minimizando episódios de hiperglicemia ou hipoglicemia (HALL, 2021).

Uma das principais doenças que afeta a regulação glicêmica é a Diabetes Mellitus (DM), uma alteração multissistêmica que se caracteriza por um distúrbio metabólico decorrente de falhas na produção, secreção ou ação da insulina (OLIVEIRA & VENCIO, 2019; HALL, 2021). Existem dois principais tipos de DM, que embora tenham etiologias diferentes, levam alterações do metabolismo de carboidratos, ocasionando um quadro de hiperglicemia crônica (HALL, 2021).

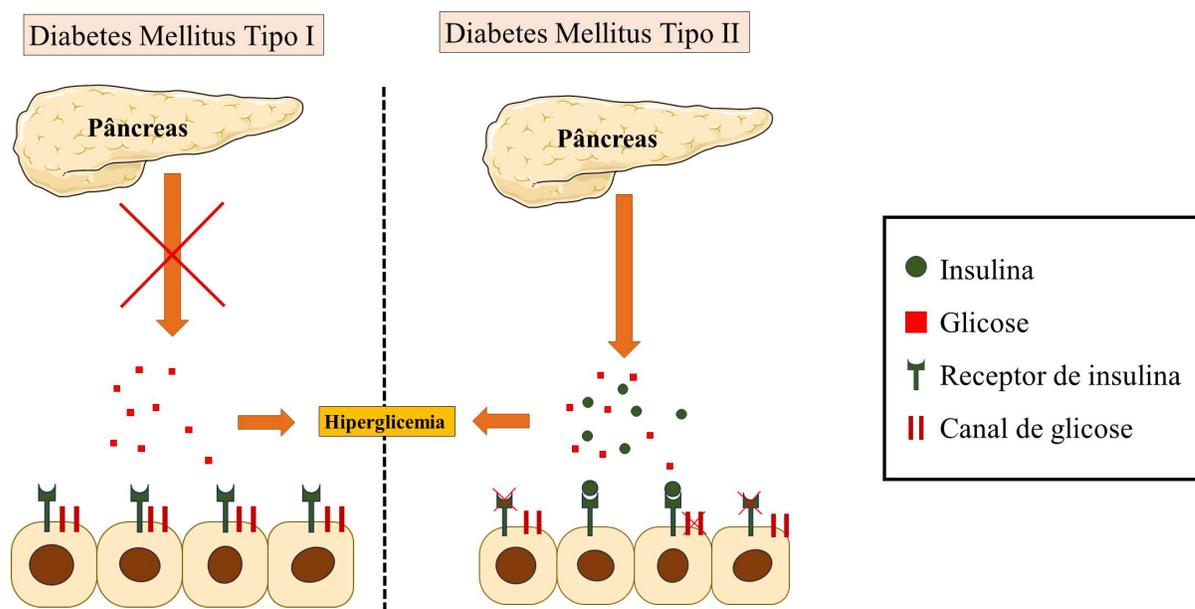


Figura 2 - Tipos de Diabetes: Esquema ilustra a diferença entre os principais tipos de diabetes. Diabetes Mellitus Tipo I: destruição das células beta pancreáticas, limitando a produção da insulina. Diabetes Mellitus Tipo II: alteração da sensibilidade celular a ação da insulina. FONTE: próprio autor.

A diabetes tipo I, chamado de diabetes mellitus insulino-dependente, está diretamente relacionado a produção de insulina. Sua etiologia está relacionada a destruição das células beta do pâncreas por células T do sistema imunológico, levando a diminuição da produção de insulina (Figura 2). Os sintomas geralmente começam na infância, mas podem aparecer mais tarde. Embora não haja cura, seu tratamento baseia-se em injeções de regulares de insulina exógena (KATSAROU et al, 2017; OLIVEIRA & VENCIO, 2019; HALL, 2021).

A diabetes tipo II, chamado de diabetes mellitus não dependente de insulina, está relacionado a alteração da sensibilidade dos tecidos a ação da insulina (Figura 2) (OLIVEIRA & VENCIO, 2019; HALL, 2021). É o principal e mais comum tipo de diabetes, sendo responsável por mais de

90% dos casos de diabetes no mundo e é intimamente associado a fatores como sedentarismo, alimentação e obesidade (DEFRONZO et al, 2015; OLIVEIRA & VENCIO, 2019; HALL, 2021).

Apesar das diabetes tipo 1 e tipo 2 terem etiologias distintas, é essencial reconhecer que o desfecho final, a hiperglicemia, é uma característica comum a ambas. É importante notar que a diabetes tipo 2 é responsável por uma parcela significativa, representando de 90% a 95% dos casos de diabetes no país (SBD, 2023). Portanto, nossa pesquisa direcionou seu foco para a variável relacionada à diabetes tipo 2, com a inclusão deliberada de voluntários mais velhos. Essa abordagem foi influenciada pela crescente prevalência da diabetes tipo 2 no Brasil, impulsionada pelo envelhecimento gradual da população e pelas transformações nos padrões de vida.

1.4. Diabetes Mellitus e COVID-19

O entrelaçamento entre DM e infecções emerge como um tema cada vez mais preocupante no âmbito da saúde pública. Pessoas diabéticas apresentam um risco substancialmente elevado de desenvolver infecções graves originadas por diferentes agentes patogênicos, incluindo a SARS-CoV-2, uma vez que o quadro hiperglicêmico crônico acelera vias metabólicas responsáveis pela formação de produtos de glicação avançada, (do inglês *Advanced Glycation End-Products*, AGEs), favorecendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumentando o estresse oxidativo celular (AYALA, 2019).

Vários estudos têm demonstrado aumento da severidade e mortalidade da COVID-19 associados a presença de comorbidades, como a diabetes, doença que predispõe a variados graus de endotelite, tendo por consequência a maior estimulação de receptores ACE2, principal sítio de ligação entre a SARS-CoV-2 e as células hospedeiras (BARRON et al, 2020; BAKHSHANDEH et al, 2021; MCCULLOUGH et al, 2021; SCHWARZ et al, 2022). O aumento da lesão tecidual, principalmente nos pulmões, durante a resposta imune ao SARS-CoV-2 resulta no aumento na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, que podem gerar um estado hiper inflamatório, dificultando o processo de hematose que leva ao agravamento do estado do paciente (MCCULLOUGH et al, 2021).

Embora não esteja completamente elucidado como o diabetes afeta a gravidade da COVID-19, porém, diversos estudos sugerem que as alterações bioquímicas comuns na diabetes podem influenciar a modulação da infecção pelo SARS-CoV-2 (GUPTA et al, 2020; D'AMORA et al, 2021). O controle glicêmico inadequado influencia a resposta imunológica do organismo perante

infecções virais e infecções pulmonares, afetando negativamente a função das células T, das células natural killer e do sistema de complemento (CRITCHLEY et al, 2018; FERLITA 2019; NYAMBUYA et al 2020). Adicionalmente, o desconforto respiratório em pacientes com COVID-19 está ligado a hipoxemia, mesmo quando a função pulmonar parece estar relativamente preservada. Isso se deve a um estado inflamatório pré-existente que intensifica a liberação de citocinas, contribuindo para disfunções orgânicas mais graves (MADDALONI & BUZZETTI, 2020; GUO et al 2020).

Em pacientes não vacinados, a taxa de mortalidade observada para a COVID-19 é de aproximadamente 4%. Em comparação, a infecção por influenza apresenta uma taxa de mortalidade quarenta vezes menor (0,1%) de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (GHOSN et al, 2021; BRASIL, 2022). A proporção de complicação e morte é mais acentuada em pacientes com 65 anos ou mais e pacientes que apresentam comorbidades; nesse contexto, é importante ressaltar uma das comorbidades mais presentes no cenário brasileiro, a diabetes: doença metabólica que atinge aproximadamente 10% da população (ATLAS, 2019). Paralelamente a isso, em populações mais idosas o percentual de diabéticos pode chegar a 36%. A intersecção desses dois fatores (idade e diabetes) impacta potencialmente na infecção por e na morbidade e mortalidade desse segmento populacional (WU et al, 2021). Esse cenário ilustra a necessidade urgente do desenvolvimento de ferramentas capazes de avaliar e compreender, de forma eficiente, a confluência entre esses dois grupos para assim possibilitar terapias mais precisas, racionais e eficientes.

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo correlacionar os perfis inflamatórios de pacientes diabéticos, infectados ou não pelo SARS-CoV-2, visando explorar as alterações bioquímicas subjacentes que podem agravar o quadro clínico, proporcionando uma compreensão mais profunda da ação sistêmica da COVID-19 nesse grupo específico de indivíduos. Conforme avançamos em nossa investigação sobre as interações entre o diabetes e a COVID-19, a metabólômica aparece como ferramenta fundamental e promissora, por estar no final da cascata ômica, sendo a mais relacionada ao fenótipo. (JOHNSON, IVANISEVIC & SIUZDAK, 2016; GONZALEZ et al, 2022)

A pandemia de COVID-19 acelerou significativamente a pesquisa relacionada à utilização da metabólômica no diagnóstico e prognóstico de doenças infecciosas, especialmente aquelas que

afetam o sistema respiratório (HASAN et al, 2020). Alguns estudos, utilizando Ressonância Magnética Nuclear de prótons (RMN), exploram as alterações metabólicas associadas a doenças metabólicas e como essas podem influenciar na resposta à COVID-19 (BARANOVICOVA et al, 2021; CORREIA et al, 2022).

1.5. A Metabômica

A palavra metabolismo, do grego "metaballein", que significa "mudar" ou "fazer alterações", foi criada a partir da junção do termo grego "metabole", que significa "mudança", com o sufixo "-ismo", que se refere à "qualidade" ou "sistema" (SILVA, 2014). O metabolismo é, portanto, o conjunto de reações químicas que acontecem em um sistema biológico, a fim de suprir suas necessidades energéticas e estruturais (VOET, VOET & PRATT, 2016).

As substâncias químicas formadas durante o metabolismo são chamadas de metabólitos, e são uma ampla variedade de pequenas moléculas (<1500 Da), como aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e sacarídeos, que desempenham papéis essenciais na regulação e manutenção das funções biológicas em um organismo vivo. O conjunto de todos os metabólitos encontrados em uma célula, órgão ou sistema biológico é denominado metaboloma (GONZALEZ et al, 2022).

O metaboloma, em conjunto com os outros componentes da estrutura celular, oferece uma imagem dinâmica, abrangente e precisa do fenótipo. De maneira geral o metaboloma reflete direta ou indiretamente toda a informação expressa pelo genoma, transcriptoma e proteoma, possibilitando o acompanhamento de metabólitos relevantes que caracterizam uma ampla gama de fenótipos (Figura 3) (GIERA, SPILKER & SIUZDAK, 2018).

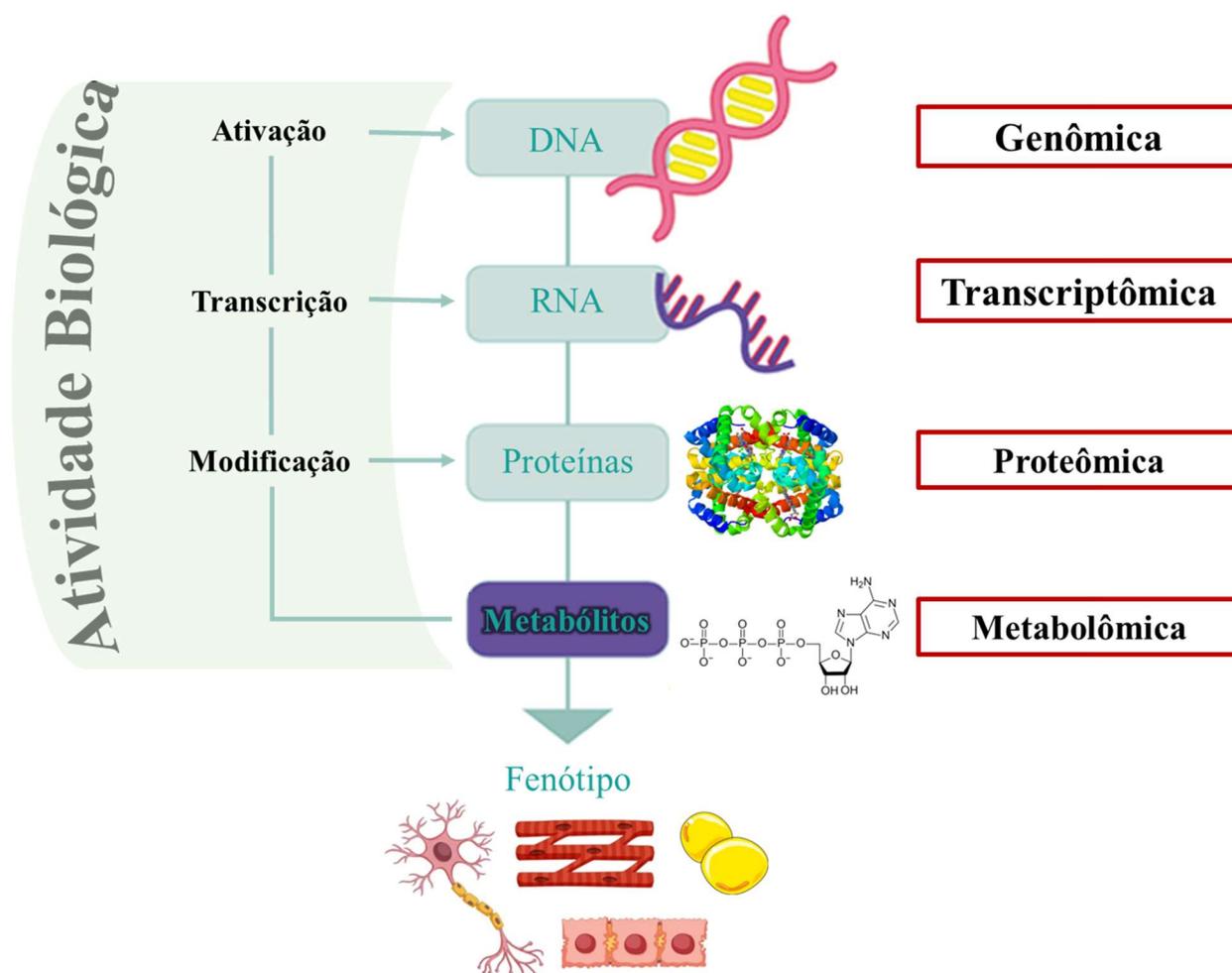


Figura 3 - Principais campos das Ciências Ômicas. O metaboloma fornece importantes informações bioquímicas resultante de todas as camadas ômicas. FONTE: adaptado de GIERA, SPILKER & SIUZDAK, 2018.

Nesse contexto, o metaboloma tem uma íntima relação com a alteração da homeostase orgânica, sendo profundamente impactado em estados patológicos (GONZALEZ et al, 2022). Ele retrata de maneira pontual o estado fisiológico de um organismo e tem sido amplamente estudado, sendo utilizado na vanguarda das descobertas biomédicas, na busca por biomarcadores de fácil detecção para explicar mecanismos de relevância fisiopatológica (JOHNSON, IVANISEVIC & SIUZDAK, 2016).

A ciência dedicada ao estudo do metaboloma é denominada metabolômica e, de maneira geral, tem sido utilizada para caracterizar respostas e processos orgânicos em diferentes matrizes biológicas. O objetivo principal do estudo do perfil de metabólitos é determinar e mensurar uma vasta variedade de metabólitos presentes em uma determinada matriz biológica. Esse tipo de

análise pode ser aplicado de maneira direcionada (*targeted analysis*), na qual um conjunto previamente selecionado de metabólitos de determinada classe química, ou que estejam relacionados às rotas metabólicas de interesse, é estudado em maior profundidade por meio de técnicas específicas de extração e detecção (CANUTO et al, 2018). Outra abordagem amplamente utilizada no estudo do perfil de metabólitos é a análise não direcionada (*untargeted analysis*), também chamada de análise metabolômica global, e é baseada na análise do maior número de metabólitos possíveis contidos no sistema biológico estudado, sem conter um alvo pré-estabelecido (SILVA, 2014; CANUTO et al, 2018). Devido à sua abordagem ampla, a metabolômica não direcionada precisa ser combinada com técnicas avançadas de análise de dados, como análise multivariada, para simplificar os grandes conjuntos de dados produzidos em um conjunto menor e mais manejável de informações (SCHRIMPE-RUTLEDGE et al., 2016).

Há duas técnicas principalmente utilizadas para análises metabolômicas: a espectrometria de massas (MS) e a ressonância magnética nuclear (RMN). Cada uma dessas técnicas apresenta vantagens e desvantagens em relação à sensibilidade, performance, capacidade de diferenciação e aplicabilidade. Nesse trabalho será utilizada a técnica de MS (VOET, VOET & PRATT, 2016.)

1.6. Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica utilizada para medir a razão massa/carga (m/z) de uma ou mais moléculas presentes em uma matriz biológica. Nessa técnica, as moléculas são convertidas em íons de fase gasosa para que possam ter sua trajetória direcionada por campos eletromagnéticos (SILVA, 2020). Cada espectrômetro de massas é composto por três componentes básicos: fonte de ionização, analisador de massas e sistema de detecção de íons (EL-ANEED et al, 2009; SILVA, 2020).

A fonte de ionização é o compartimento físico em que é realizada a ionização das moléculas neutras do analito. Uma das técnicas mais utilizadas na espectrometria de massas é a ionização por *eletrospray* (do inglês *Eletrospray ionization*, ESI). A ESI envolve a formação de aerossóis de uma solução contendo as moléculas de interesse, que são, então, nebulizadas em uma corrente de gás aquecido, que gradativamente vaporiza o solvente. À medida que o diâmetro da gota diminui, chega-se a um ponto em que a repulsão eletrostática faz com que a gota se desintegre em gotículas menores (SILVA, 2014). O processo continua até que restem apenas moléculas ionizadas da

amostra. Através da manipulação do potencial elétrico do sistema, os íons formados são então atraídos para o analisador (Figura 04).

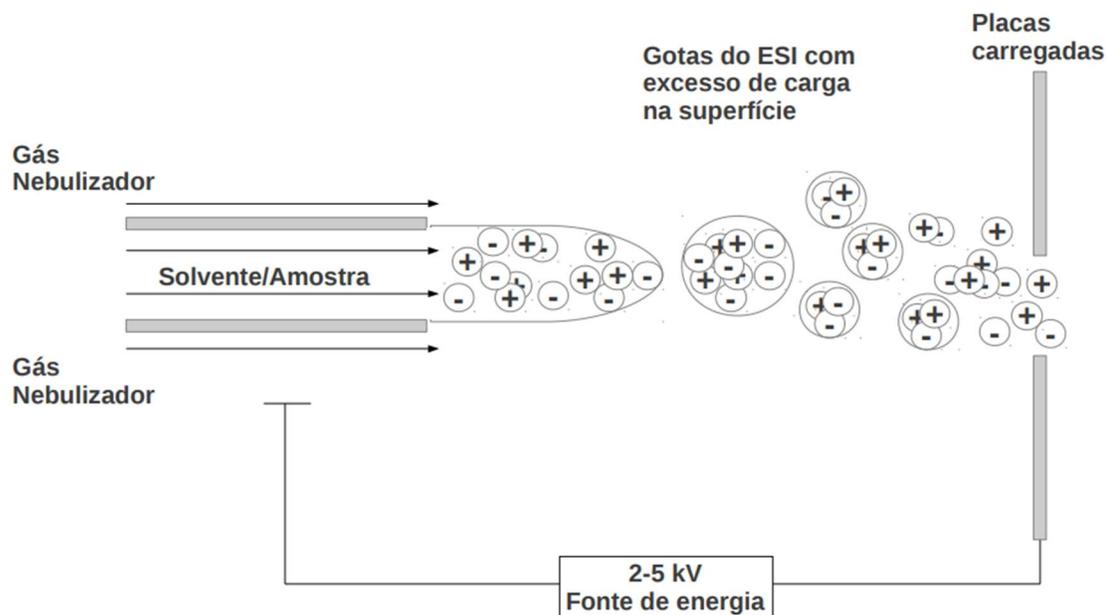


Figura 4 - Representação esquemática da fonte de ionização por electrospray (ESI). Uma alta voltagem é aplicada a um líquido para criar um aerossol e produzir íons a partir de macromoléculas. FONTE: Adaptado de SILVA, 2014.

O segundo componente de um espectrômetro de massas é o analisador. Os íons gerados na fonte de ionização, são transferidos para essa região do equipamento de massas, em que sua razão (m/z) é mensurada. Uma das principais características de um analisador de massas é o poder de resolução, que é a habilidade de produzir sinais distintos para dois íons que possuem uma pequena diferença de massa (DINIZ, 2011; BOESL, 2017). Há vários analisadores de massa disponíveis atualmente, cada um com desvantagens relacionadas à velocidade de operação, resolução de separação dos valores m/z e outros requisitos operacionais. Nesse sentido, a escolha dos analisadores depende do propósito da pesquisa (SILVA, 2020).

Um dos tipos de analisadores mais utilizados são os quadropólos (Figura 5). De maneira simplificada, esse tipo de analisador utiliza-se de campos elétricos oscilantes, gerados por quatro eletrodos, para estabilizar ou desestabilizar seletivamente os íons, durante sua passagem pelo centro do quadropólo, o que possibilita que os íons de diferentes valores de m/z atinjam os detectores, possibilitando sua diferenciação (DINIZ, 2011; SILVA, 2020).

Os analisadores tempo de voo (do inglês *Time of flight*, TOF) baseiam-se na medição do tempo que um íon percorre a distância um tubo de vácuo colocado entre a fonte de íons e o detector

(EL-ANEED et al, 2009; DINIZ, 2011). Tais analisadores fundamentam-se na determinação empírica da mobilidade dos portadores de carga em um sistema. Logo, se dois íons com mesma carga, mas com massas diferentes, forem acelerados através de um campo elétrico com potencial constante, suas velocidades serão proporcionais a suas massas e eles atingirão o detector com “tempos de voo” diferentes (BOESL, 2017).

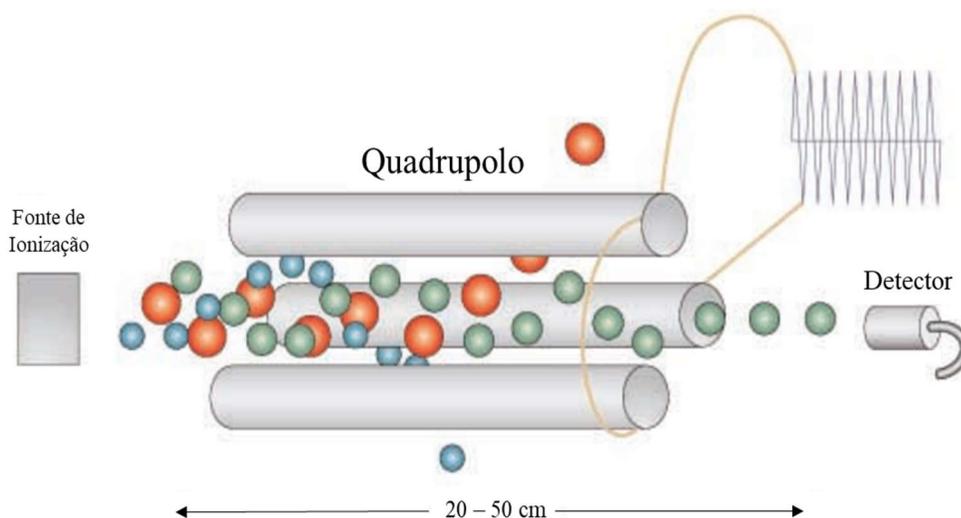


Figura 5 - Representação Esquemática De Um Analisador De Massa Quadrupolo. A haste superior não foi representada. Campos elétricos oscilante aplicados às hastes permitem que íons de um único valor de m/z mantenham trajetórias estáveis até o detector, enquanto íons com valores m/z diferentes são incapazes de fazê-lo. FONTE: Adaptado de GLISH & VACHET, 2003.

Outra configuração possível dos analisadores é a espectrometria de massas sequencial, também conhecida como MS/MS ou MS², uma técnica em análise instrumental em que dois ou mais analisadores de massas são acoplados, gerando uma etapa de reação adicional para aumentar suas habilidades para análise e detecção de moléculas (HOFFMANN & STROOBANT, 2007). Uma das configurações mais utilizadas da espectrometria de massas sequencial é o espectrômetro de massas tipo triplo-quadrupolo, também conhecido como QqQ-MS. De maneira similar, os espectrômetros de massa QqQ funcionam com o mesmo princípio dos espectrômetros de massas de quadrupolo único (Figura 5). Em instrumentos QqQ, o primeiro quadrupolo é usado para selecionar um íon precursor. No segundo quadrupolo, chamado de célula de colisão, ocorre um processo chamado de dissociação induzida por colisão (CID). Para obter especificidade ou informação estrutural, os íons selecionados no primeiro quadrupolo são fragmentados no segundo, pela colisão com moléculas neutras. O terceiro quadrupolo gera um espectro dos fragmentos ou íons produto resultantes. Uma grande vantagem do emprego de MS/MS é a capacidade de usar o

primeiro quadrupolo para descartar ruídos, resultando em menor necessidade de limpeza da amostra (Figura 6).

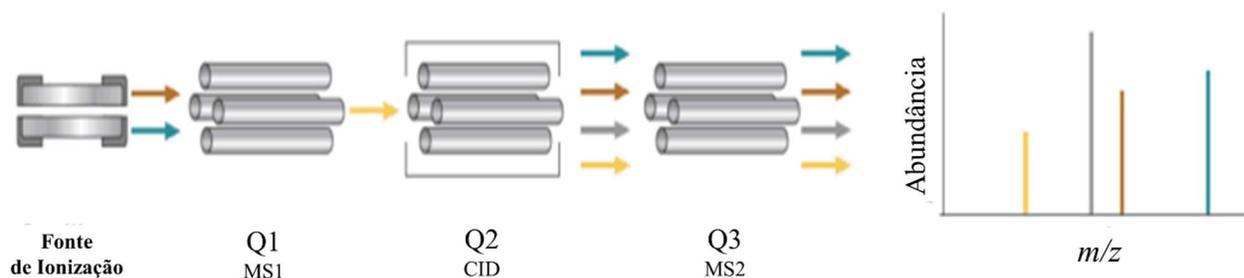


Figura 6 - Representação Esquemática De Um Espectrômetro de Massa Triplo-Quadrupolo. (Q1) primeiro quadrupolo, usado para seleção de íons. (Q2) segundo quadrupolo onde ocorre a dissociação induzida por colisão (CID). (Q3) terceiro quadrupolo, onde se obtém um espectro dos íons produto resultantes. FONTE: adaptado de LUBRIZOL, 2019.

O terceiro componente de um espectrômetro de massas é o detector. Esse segmento tem a função de captar e amplificar o sinal da corrente de íons, proporcional à sua abundância, emitido pelo analisador e que é transferido para o sistema de processamento de dados (HOFFMANN & STROOBANT, 2007). Existem três principais tipos de detectores: fotomultiplicador, multiplicador de elétrons e placa de microcanais.

Por ser uma ferramenta poderosa para identificação e quantificação de compostos, a espectrometria de massas é amplamente utilizada em estudos de metabolômica como os realizados em nosso grupo de pesquisa objetivando o diagnóstico de COVID-19 em amostras de swab (GARZA et al, 2021) e amostras de urina (MOURA et al, 2022). Características como sensibilidade, possibilidade de detecção de vários compostos ao mesmo tempo, especificidade, capacidade de caracterização e rapidez de análise são as principais características que fizeram desta técnica, a técnica de escolha nesse trabalho (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; LANÇAS, 2019).

1.7. A Urina como Matriz Biológica

A manutenção do equilíbrio dos líquidos corpóreos, sejam eles intracelulares, intersticiais ou sanguíneos, juntamente com a adequada proporção de solutos, é uma condição primordial para o funcionamento correto das funções orgânicas em seres vivos (SANDS & LAYTON, 2014). Esse equilíbrio se estende ao controle preciso das concentrações de subprodutos metabólicos, independentemente de serem prejudiciais ou não ao organismo, desempenhando um papel essencial na preservação da vida (SANDS & LAYTON, 2014).

O sistema urinário desempenha um papel de destaque. Sua função primária envolve a regulação da homeostase e a excreção de metabólitos prejudiciais ao corpo ou de produtos em excesso (Figura 7). Exerce um papel crucial na regulação da osmolaridade, das concentrações de solutos e água nos fluidos corporais, bem como na manutenção do pH e da pressão arterial. A urina, um líquido claro e estéril resultado do metabolismo renal, desempenha o papel de conter resíduos solúveis retirados da corrente sanguínea, incluindo uma diversidade de substâncias nitrogenadas e toxinas, além de compostos orgânicos e inorgânicos variados (BOEHRINGER, 2022).

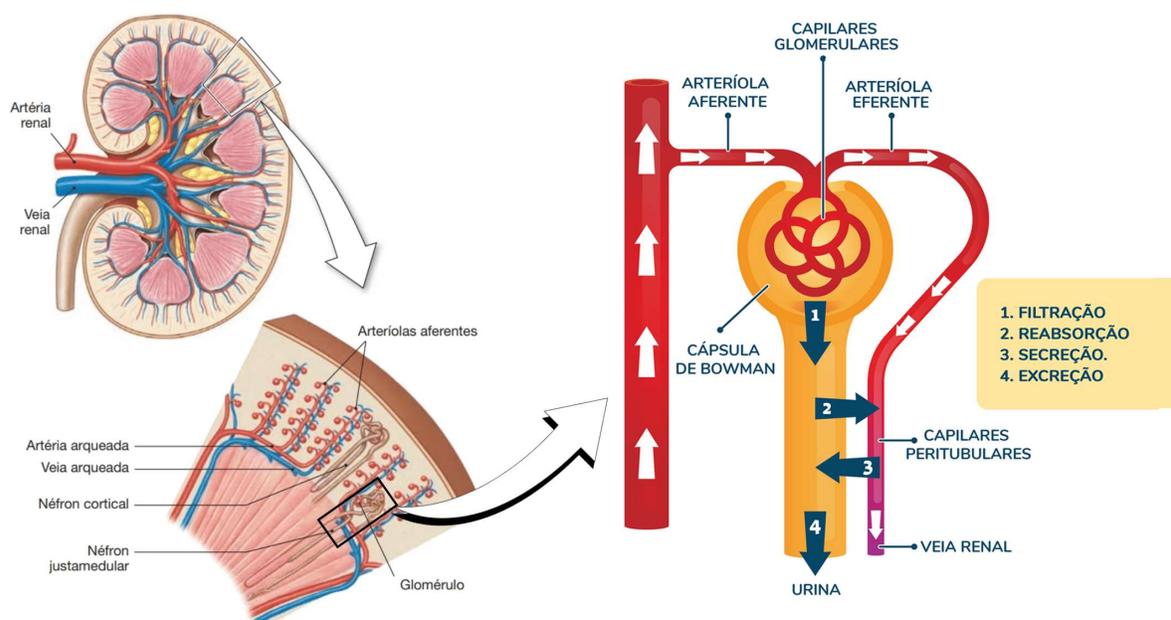


Figura 7 - Representação Esquemática da formação de urina pelos rins. Modelo simplificado de um néfron ilustra o processo de formação da urina, começando com a filtração do sangue no glomérulo, seguida pela modificação do filtrado através de reabsorção e secreção nos diferentes segmentos do túbulo renal, culminando na excreção final de urina. FONTE: Adaptado de NIDDK, 2018; BOEHRINGER, 2022.

A rica diversidade de substâncias contidas na urina estabelece uma matriz analítica de complexidade considerável. Paralelamente, essa complexidade intrínseca também a confere um notável potencial informativo. A urina também possui outras características vantajosas, como a facilidade de coleta não invasiva, a disponibilidade de grandes volumes de amostras para análise, a alta estabilidade em condições adequadas de armazenamento e a presença reduzida de interferentes em comparação com outras matrizes biológicas, a urina tem sido amplamente empregada para a investigação de metabólitos associados a desequilíbrios metabólicos, diagnóstico e evolução de doenças, bem como para a exploração de substâncias relevantes em contextos forenses (ZHANG et al, 2012; KHAMIS et al, 2017; CHANDRAPALAN, S., & ARASARADNAM, 2020).

Nesse contexto, a urina apresenta várias vantagens como matriz analítica, requerendo um pré-tratamento menos complexo devido ao seu baixo teor de proteínas, tamanho relativamente pequeno e maior estabilidade termodinâmica das proteínas e peptídeos urinários, bem como menor complexidade geral da amostra, incluindo uma menor interação intermolecular. Conseqüentemente, o metaboloma urinário humano possui um potencial vasto, abrangendo todos os metabólitos endógenos e substâncias exógenas que podem ser detectados (ZHANG et al, 2012; KHAMIS et al, 2017).

A metabolômica aplicada à urina fornece informações detalhadas sobre os metabólitos, sendo adequada para estudar sistemas complexos e globais (ZHENG et al, 2010; SUHRE et al, 2011; PLUMB et al, 2023). Cada vez mais estudos mostram como a metabolômica da urina tem potencial para identificar os mecanismos bioquímicos por trás de doenças e possibilitar diagnósticos precoces (DETTMER et al, 2007; ZHENG et al, 2010; SUHRE et al, 2011; PLUMB et al, 2023; NIZIOŁ et al, 2023). Portanto, a busca por novos biomarcadores usando a metabolômica da urina se tornou um aspecto fundamental da pesquisa molecular facilitando a exploração das alterações metabólicas subjacentes à infecção por COVID-19 e comorbidades de base como a diabetes, influenciando na identificação dos potenciais biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico dessas doenças (WEI et al, 2012; SCHWARZ et al, 2022; BI et al, 2022; DEWULF et al, 2022; BAIGES-GAYA et al, 2023).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Avaliar o perfil metabolômico global (*untargeted*) da urina de participantes de pesquisa contaminados ou não com SARS-CoV-2 e acometidos ou não por *Diabetes Mellitus*, associando os achados ao perfil clínico e bioquímico.

2.2. Objetivos específicos:

A. Determinar e comparar o perfil metabolômico urinário de participantes de pesquisa, divididos em 4 grupos: 1) portadores de *Diabetes Mellitus* e hospitalizados pela COVID-19; 2) portadores de *Diabetes Mellitus* sem infecção pela COVID-19; 3) participantes da pesquisa sem *Diabetes Mellitus* e sem infecção pela COVID-19; 4) e participantes da pesquisa sem *Diabetes Mellitus* e com infecção pela COVID-19.

B. Selecionar os metabólitos discriminantes entre os grupos e identificá-los através de estudos de fragmentação e dados de massa exata. Realizar a análise de vias bioquímicas com as moléculas diferenciais identificadas e realizar a interpretação biológica.

3. HIPÓTESE

Com base nos objetivos desse trabalho a principal hipótese levantada é que há diferenças significativas no metabolismo em função da presença ou ausência de *Diabetes Mellitus* e da infecção por SARS-CoV-2 e que tais diferenças podem ser detectadas na urina. Sugere-se ainda que a análise de metabólitos da urina, em conjunto com os dados clínicos, considerando a ocorrência ou ausência de diabetes, podem revelar as vias bioquímicas potencialmente impactadas pela presença do SARS-Cov-2 e o efeito somático das infecções.

Com essa hipótese em mente, deseja-se responder às seguintes questões:

- 1- Qual o efeito da *Diabetes Mellitus* no metabolôma urinário?
- 2- Qual o efeito da infecção por SARS-CoV-2 no metabolôma urinário?
- 3- Considerando o metabolôma urinário, qual o efeito da infecção por SARS-CoV-2 em voluntários de pesquisa com *Diabetes Mellitus*?

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo e aspectos éticos

Trata-se de um estudo de corte transversal. Todos os protocolos foram submetidos à apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (CAAE: 31573020.9.0000.5514). Os pontos de coleta incluíram o Complexo Hospitalar Santa Casa de Bragança Paulista, o Hospital Bragantino, o Hospital Universitário São Francisco e a Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG). As amostras de urina foram coletadas após os voluntários assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), descrito em detalhes no anexo 1.

4.2. Seleção das amostras

4.2.1. Coleta e acondicionamento das amostras

As amostras de urina foram coletadas entre julho e dezembro de 2020. A coleta de urina foi realizada de forma espontânea e autônoma pelos voluntários, sendo orientada uma retenção urinária mínima de 1 hora antes da coleta do material. O tamanho amostral consiste em 357 amostras de urina, incluindo, voluntários internados (enfermaria ou unidade de tratamento semi-intensiva) com resultado positivo para SARS-Cov-2 (n=175), voluntários com síndrome respiratória aguda grave (SRAG) com resultado negativo para SARS-Cov-2 (n=30) e voluntários não hospitalizados, sem histórico de COVID-19 (n=152).

Os participantes de pesquisa foram nomeados da seguinte forma:

- Voluntários diabéticos e com diagnóstico positivo de COVID-19 (DPCP);
- Voluntários não diabéticos e com diagnóstico positivo de COVID-19 (DNCP);
- Voluntários diabéticos e com diagnóstico negativo de COVID-19 (DPCN);
- Voluntários não diabéticos e com diagnóstico negativo de COVID-19 (DNCN).

4.2.2. Critérios de inclusão e exclusão de amostras e cálculo do tamanho amostral

Das amostras coletadas (n=357) foram selecionadas n=109, de acordo com os seguintes critérios:

I. Para participantes dos grupos DNCP e DPCP deveria ser observado o mínimo de quatro dias entre a coleta de urina e diagnóstico de COVID-19 por RT-PCR (LIPPI et al, 2020; TAHAMTAN & ARDEBILI, 2020).

II. Para participantes dos grupos DNCP e DPCP a coleta deveria ser realizada com menos de 16 dias de início dos sintomas de COVID-19 (HUNG et al, 2009; HE et al, 2020; LIPPI et al, 2020; TAHAMTAN & ARDEBILI, 2020; HENEGHAN, BRASSEY & JEFFERSON, 2021).

Os participantes foram selecionados ainda para manter uma distribuição equivalente em relação a idades e gênero em cada um dos grupos (SLUPSKY et al, 2007; THÉVENOT et al, 2015). A quantidade mínima de participantes de pesquisa foi calculada através *R studio*, considerando $\alpha=0,05$ e o tamanho do efeito=0,8, (CARDENAS et al, 2016) em cada categoria de análise, para manter um poder estatístico de $\geq 80\%$ (GARCIA et al., 2013) (Anexo 2).

4.2.3. Dados clínicos

Os dados clínicos dos participantes da pesquisa foram obtidos através da análise dos prontuários, por meio do preenchimento da ficha de coleta de dados demonstrada no Anexo 3. As seguintes variáveis clínicas foram consideradas: sexo, idade, sintomas iniciais, uso de medicação contínua, medicações utilizadas durante a internação, achados radiológicos e tomográficos, alterações laboratoriais e presença de comorbidade como Asma, Doença renal, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), Doenças Cardiovasculares, Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), Neoplasias e Obesidade.

Para os voluntários saudáveis, os dados foram obtidos através da ficha preenchida no momento da coleta, demonstrada no Anexo 4. Os dados estão organizados em planilhas Excel, onde cada linha foi atribuída a um paciente e cada coluna a uma variável clínica-laboratorial.

4.3. Preparo das amostras

4.3.1. Preparo das amostras dos participantes e amostras de controle de qualidade

Após a coleta, as amostras de urina foram termicamente inativadas a 65°C por 30 minutos, em uma cabine de segurança biológica Classe II (KAMPF & SCHEITHAUER, 2020). As amostras foram aliqüotadas e armazenadas em freezer -80°C. A preparação da amostra baseou-se no estudo de MOURA (2022). Todas as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e, antes de sua extração, foi produzido um *pool* das amostras a partir de partes iguais (10 μ L) de cada amostra

de urina, para formar as amostras de controle de qualidade (QC). Foram aliqüotados 12 tubos contendo o *pool* de amostras, injetadas no equipamento a cada 10 amostras analisadas, para monitoramento instrumental.

As amostras dos participantes da pesquisa (300 μL) foram randomizadas e centrifugadas à 12.000 rpm a 4 °C por 10 min. Em seguida, o sobrenadante (150 μL) foi coletado e foi realizada a adição de água (120 μL), acetonitrila (15 μL) e 15 μL de solução de padrão interno (PI) N,N,N - trimetil-d9 isovaleril-DL-carnitina em metanol à 11,1 ng mL⁻¹. As amostras brancas foram preparadas usando água ultrapura no lugar de urina.

4.4. Análise global (*untargeted*) por UPLC-QToF-MS

A análise global (*untargeted*) foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido Acquity UPLC H-Class (Waters™, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas XEVO-G2XS QToF (Waters™, EUA). Os modos de ionização positivo e negativo foram empregados separadamente. A separação utilizou uma coluna ACQUITY UPLC® BEH Amide (2.1 mm \times 150 mm, 1.7 μm) mantida a 45°C. A fase móvel consistiu de (A) 10 mM de acetato de amônio em ACN:água (95:5, v/v) e (B) 10 mM de acetato de amônio em ACN:água (50:50, v/v), a um fluxo de 0,40 mL min⁻¹, para dois modos. Para o modo positivo com um gradiente linear (em % B): 0-1,0 min: 1%; 1,0-10,0 min: 1%-100%; 10-10,1 min: 100%-1%; após 10,1 min diminuir para 1% (para reequilíbrio da coluna), resultando em uma análise de 14 min. Para o modo negativo (em % A): 0-1,0 min: 1%; 1,0-8,0 min: 1%-100%; 8-8,1 min: 100%-1%; após 8,1 min diminuir para 1% (para reequilíbrio da coluna), resultando em uma análise de 13 min. O volume de injeção foi de 1 μL no modo de ionização positivo e 5 μL no modo de ionização negativo.

Empregou-se a fonte de ESI, operando com uma tensão capilar de 3,0 kV, tensão do cone de 40 kV, temperatura da fonte de 140 °C, temperatura de dessolvatação de 550 °C, fluxo de gás de 10 L h⁻¹ e fluxo de gás de dessolvatação de 900 L h⁻¹. O ESI negativo foi empregado numa tensão capilar de 2,5 kV e fluxo de gás de 50 L h⁻¹, enquanto os outros parâmetros foram mantidos os mesmos. A faixa de varredura foi de 50 a 1200 Da, no modo centróide, usando a abordagem de aquisição independente de dados (MS^E). Leucina encefalina (massa molecular = 555,62; 200 pg μL^{-1} em ACN:H₂O (1:1, v/v)) foi usada como *Lock Mass* para medições precisas de massa e formato de sódio (0,5 mM) foi usado para calibração do instrumento.

O software TargetLynx (Waters) foi utilizado para o processamento de dados. Os arquivos RAW foram processados usando Software Progenesis QI (fabricante Nonlinear Dynamics, Newcastle, United Kingdom), para realizar o alinhamento, deconvulação e seleção de *features*. Foram considerado os seguintes adutos nesse processo: $[M+H]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+ACN+H]^+$, $[M+ACN+Na]^+$, $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-2H_2O]^+$ e $[M+NH_4]^+$ para o modo positivo, e $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M-H_2O-H]^-$, $[M+FA-H]^-$, e $[M+Na-2H]^-$ para o modo negativo. O Progenesis organiza os dados em planilhas no formato csv, em que os *features* recebem os nomes em função do tempo de retenção e razão *m/z*, em função das áreas do cromatograma. Posteriormente, os dados obtidos foram exportados em planilhas de excel para seguir para o tratamento estatístico.

4.5. Análise estatística dos dados e seleção de variáveis discriminatórias

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o auxílio do software on-line *MetaboAnalyst 5.0* (<http://www.metaboanalyst.ca>). As planilhas .csv oriundas das análises *untargeted* foram filtrados usando o intervalo interquartil (IQR, do inglês *interquartile range*) de 40%, transformadaos por raiz quadrada e auto-escaladas (XIA & WISHART, 2011; CHONG et al, 2019).

Os dados metabolômicos obtidos nas diferentes abordagens foram analisados em 4 grupos distintos (DNCN, DNCP, DPCN e DPCP) utilizando teste de análise de variância unidirecional (ANOVA *one-way*) com *p-value* $FDR \leq 0,05$ para as comparações descritas na Tabela 1.

TABELA 1. Comparação de Grupos de Casos e Controles em Diferentes Abordagens. Análise de Variância Unidirecional (ANOVA *one-way*) com *p-value* $FDR \leq 0,05$ para Comparação entre Grupos DNCN, DNCP, DPCN e DPCP.

| Grupo de Casos | | vs | Grupo de Controle |
|----------------|--|----|-------------------|
| DNCP | | | DNCN e DPCN |
| DPCN | | | DNCN e DNCP |
| DNCN | | | DNCP e DPCN |
| DNCP | | | DPCP e DPCN |
| DPCN | | | DPCP e DNCP |
| DPCP | | | DNCP e DPCN |

Os *features* significativos entres os grupos foram usados para a criação do modelo por meio de uma técnica estatística, chamada a Análise de Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais, do inglês *Partial Least Squares-Discriminant Analysis* (PLS-DA), técnica empregada para

visualizar a separação entre os grupos e identificar os principais contribuintes para a discriminação entre os grupos. Os dados metabolômicos da PLS-DA foram obtidos em comparações dois a dois em cinco arranjos diferentes: 1ª Comparação: DNCN (n=27) vs DNCP (n=30), 2ª Comparação: DPCN (n=24) vs DNCN (n=27), 3ª Comparação: DPCP (n=28) vs DNCP (n=30) e 4ª Comparação: DPCP (n=28) vs DPCN (n=24) e 5ª Comparação: DPCN (n=24) vs DNCP (n=30).

Por fim, foi realizado um critério duplo para selecionar as principais *features* das comparações. Os critérios de seleção utilizaram um *p-value* FDR de ANOVA $\leq 0,05$ e um VIP $\text{score} \geq 1$ (COCCHI et al, 2018).

4.6. Identificação de Metabólitos

A identificação putativa dos metabólitos é baseada em experimentos de MS1 e MS2 (XIAO, ZHOU & RESSOM, 2012). Devido à obtenção de espectros com baixa e alta energia de fragmentação simultaneamente, é possível a identificação de íons precursores (adquiridos com baixas energias de fragmentação) e de seus fragmentos (adquiridos com altas energias de fragmentação). O erro de massa considerado na atribuição de precursores foi ≤ 5 ppm e para fragmentos ≤ 10 ppm. Foram avaliadas características como a fragmentação, a precisão de massa, o erro de massa e a semelhança de isótopos para confirmar a identificação das moléculas.

Para permitir a compatibilidade dos dados do Progenesis QI e das bibliotecas de espectros baseadas em arquivos de dados de estrutura externos, utilizamos um *software* interno chamado "SDF2PQI" para aumentar o número de correspondências de fragmentos (SANCHES et al., 2023). Foram utilizadas bibliotecas de espectros baseadas em SDF externas, como LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org/>), Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/metabolites>) e o MoNA - MassBank of North America (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>).

5. RESULTADOS

5.1. Conjunto amostral e Dados clínicos

Ao todo, 357 amostras de urina foram coletadas no estudo. Entretanto, os voluntários internados tinham intervalo de permanência hospitalar variando de 0 a 95 dias de internação até a data da coleta de urina. Foram obtidas amostras de indivíduos com uma elevada heterogeneidade em relação a presença e progressão dos sintomas causados pela COVID-19. Diversos estudos mostram que a concentração de carga viral da SARS-Cov-2 tem um grande aumento entre o segundo e quinto dia do início dos sintomas, diminuindo gradualmente em direção ao limite de detecção por RT-PCR entre 14º ao 21º dia após a contaminação (HUNG et al, 2009; HE et al, 2020; LIPPI et al, 2020; TAHAMTAN & ARDEBILI, 2020; HENEGHAN, BRASSEY & JEFFERSON, 2021).

Dessa forma, para a seleção das amostras, foi delimitado um intervalo de tempo em que de forma a obter elevada carga viral. Estabeleceu-se, portanto, um filtro em que foram consideradas “amostras qualificadas” aquelas coletadas de voluntários com o intervalo mínimo de quatro dias entre a coleta de urina e diagnóstico por RT-PCR, além de amostras de voluntários com início dos sintomas há no máximo 16 dias antes da coleta de urina. Outro fator considerado é que a composição do metaboloma pode ser influenciada por fatores endógenos como gênero e idade (SLUPSKY et al, 2007; THÉVENOT et al, 2015), para limitar esse fator, foi selecionada uma distribuição equivalente em relação a idades e gênero em cada um dos quatro grupos estudados (Anexo 2).

Foram selecionadas 109 amostras do universo amostral total (perda de quase 70% dos voluntários), como detalhadamente descrito no anexo 5. Essas amostras foram distribuídas em quatro grupos distintos, de acordo com o diagnóstico para COVID-19 e para DM. Os dados clínicos transcritos dos prontuários dos voluntários podem ser visualizados na Tabela 2.

TABELA 2. Informações clínicas obtidas dos voluntários recrutados para o estudo.

| | DPCP | DPCN | DNCP | DNCN | Valor-p |
|---|--------------|-------------|--------------|--------------|----------------|
| Voluntários | 28 | 24 | 30 | 27 | 0,1 |
| Idade Média (Mín-Máx) | 61,5 (22-86) | 63 (33-89) | 62,7 (35-82) | 62,8 (50-82) | 0,3 |
| Feminino | 13 | 10 | 8 | 14 | 0,9 |
| Masculino | 15 | 14 | 22 | 13 | |
| Hospitalizados | 28 | 7 | 30 | 14 | 0,9 |
| Não Hospitalizados | 0 | 17 | 0 | 13 | |
| Comorbidades | | | | | |
| Asma | 0 | 0 | 1 | 1 | 0,9 |
| Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) | 0 | 2 | 0 | 0 | 0,9 |
| Doença Renal | 2 | 2 | 1 | 0 | 0,9 |
| Doença Cardiovascular | 5 | 5 | 6 | 2 | 0,9 |
| Fumante ou ex-fumante | 0 | 3 | 4 | 1 | 0,9 |
| Hipertensão Arterial Sistêmica | 22 | 11 | 12 | 9 | 0,9 |
| Neoplasia | 1 | 0 | 3 | 2 | 0,9 |
| Obesidade | 5 | 1 | 8 | 6 | 0,9 |

*Voluntários não diabéticos positivos para COVID-19 (DNCP), voluntários diabéticos positivos para COVID-19 (DPCP), voluntários não diabéticos negativos para COVID-19 (DNCN) e voluntários diabéticos negativos para COVID-19 (DPCN).

Foi observada a prevalência de comorbidades de base nos voluntários analisados. A comorbidade mais frequente nos quatro grupos foi a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), com 54 voluntários (49,5%) apresentando essa condição. Em seguida, destacam-se a Obesidade, com 20 voluntários (18,3%), e as Doenças Cardiovasculares, com 18 voluntários (16,5%).

Quanto à distribuição das comorbidades entre os grupos, observa-se que a HAS esteve presente em todos os grupos, sendo mais frequente no grupo DPCP (22 voluntários). As doenças cardiovasculares também foram detectadas em todos os grupos, com maior prevalência no DNCP. A asma e doença renal foram as comorbidades menos prevalentes, cada uma com seis voluntários, enquanto a doença renal foi mais comum nos grupos diabéticos, independente da presença ou ausência de COVID-19 (Tabela 2).

5.2. Análise *untargeted* de metabolôma urinário

5.2.1. Análise de componentes principais UPLC-QToF-MS

A abordagem inicial realizada foi a técnica de PCA, em que se englobou todas as amostras, incluindo os QCs, para avaliar a dispersão dos metabólitos. Ao usarmos o método não supervisionado de PCA (Figura 8) não houve uma separação efetiva entre os grupos, entretanto foi possível observar o agrupamento e o comportamento das amostras de QC em relação aos parâmetros instrumentais e analíticos tanto no modo de aquisição negativo, quanto positivo (WANT et al, 2013). A variância explicada total para duas primeiras componentes (PC1 e PC2) do

modo negativo foi de 22,3%. Em contrapartida, para o modo positivos, a variância explicada total para duas primeiras componentes (PC1 e PC2) foi de 27,8%. Essas informações foram obtidas a partir da análise do gráfico de escores. O resultado obtido aponta uma eficiente reprodutibilidade analítica, em especial do modo negativo, uma vez que os QC estavam bem agrupados e pouco dispersos, indicando eficiente desempenho analítico e instrumental, demonstrando a confiabilidade dos dados gerados (Figura 8).

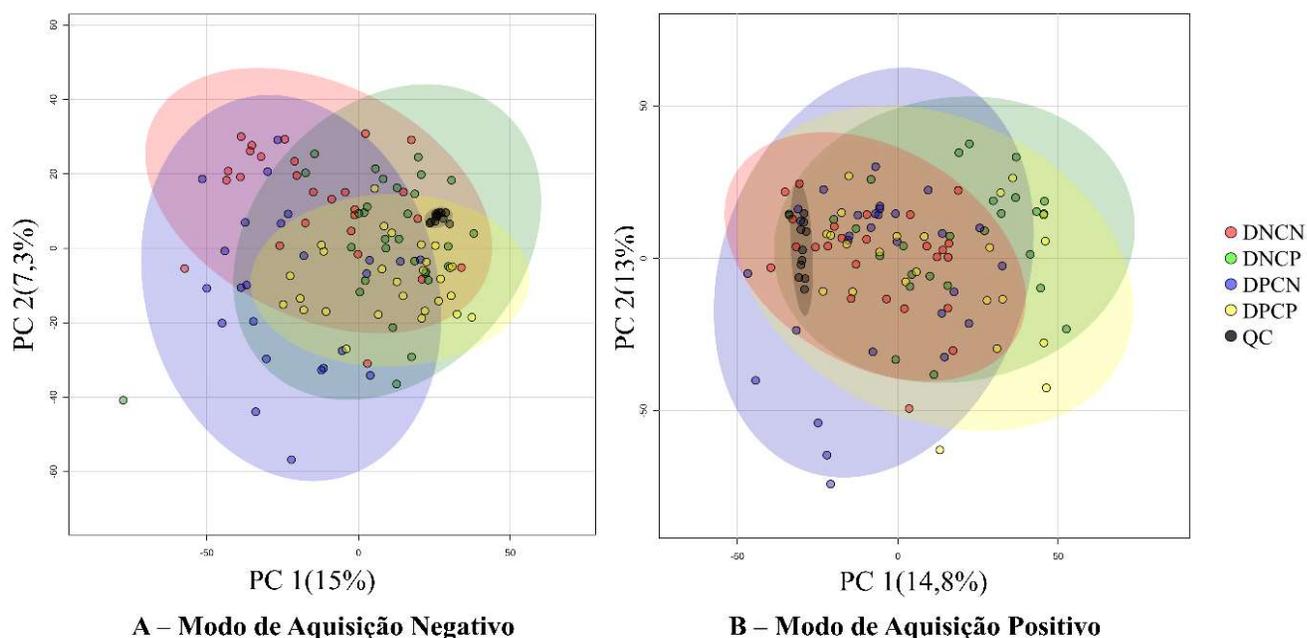


Figura 8 - Análise de Componentes Principais (PCA) indicando discriminação entre os grupos e amostras de controle de qualidade (QC). PCA dos dados obtidos por UPLC-QToF-MS nos modos de aquisição negativo(A) e positivo(B). Comparação com os quatro grupos: voluntários não diabéticos positivos para COVID-19 (DNCP), voluntários diabéticos positivos para COVID-19 (DPCP), voluntários não diabéticos negativos para COVID-19 (DNCN) e voluntários diabéticos negativos para COVID-19 (DPCN). e os QC. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

5.2.2. Seleção dos metabólitos estatisticamente diferenciais

Para identificar de forma rápida os metabólitos estatisticamente relevantes foi usado ANOVA, seguida pelo teste de Fisher para comparações múltiplas, com um limite de significância definido em $p\text{-valor} \leq 0,05$. Além disso, para identificar metabólitos discriminantes, aplicamos o escore de VIP (*Variable Importance Projection*) nos modelos PLS-DA, selecionando aqueles com um $VIP > 1,0$. Portanto, para a seleção de metabólitos estatisticamente diferenciais escolhemos apenas os metabólitos que atenderam a ambos os critérios: $p\text{-valor} \leq 0,05$ na ANOVA e $VIP > 1,0$.

O número de *features* apontados como diferenciais em cada modo de análise e para cada comparação é apresentado na Tabela 3.

TABELA 3. Número de metabólitos estatisticamente diferenciais selecionados por p-valor < 0,05 na ANOVA e VIP > 1,0.

| Comparação | <i>Modo de Aquisição Positivo</i> | <i>Modo de Aquisição Negativo</i> | Total |
|-------------------|--|--|--------------|
| DNCN vs DNCP | 43 | 111 | 154 |
| DNCN vs DPCN | 334 | 254 | 588 |
| DNCP vs DPCN | 526 | 199 | 725 |
| DPCP vs DNCP | 544 | 77 | 621 |
| DPCP vs DPCN | 174 | 43 | 217 |

Os metabólitos apontados como diferenciais foram submetidos ao processo de identificação. Dos 2306 metabólitos, 157 endógenos tiveram uma identificação sugerida. Esses metabólitos foram organizados em função de suas classes químicas. Ao todo identificaram-se 76 classes de metabólitos, incluindo aminoácidos, ácidos nucleicos, lipídios e compostos orgânicos diversos.

O gráfico apresentado na Figura 9 apresenta 16 Categorias de metabólitos, que representam a frequência maior que 1% dos metabólitos identificados. As categorias com as maiores proporções em relação ao total são: ácidos orgânicos e derivados (36%), lipídios e derivados (17,2%), compostos organoheterocíclicos (9,7%), compostos orgânicos de oxigênio (8,1%) ácidos graxos (7,0%) e nucleosídeos e análogos (6,5%).

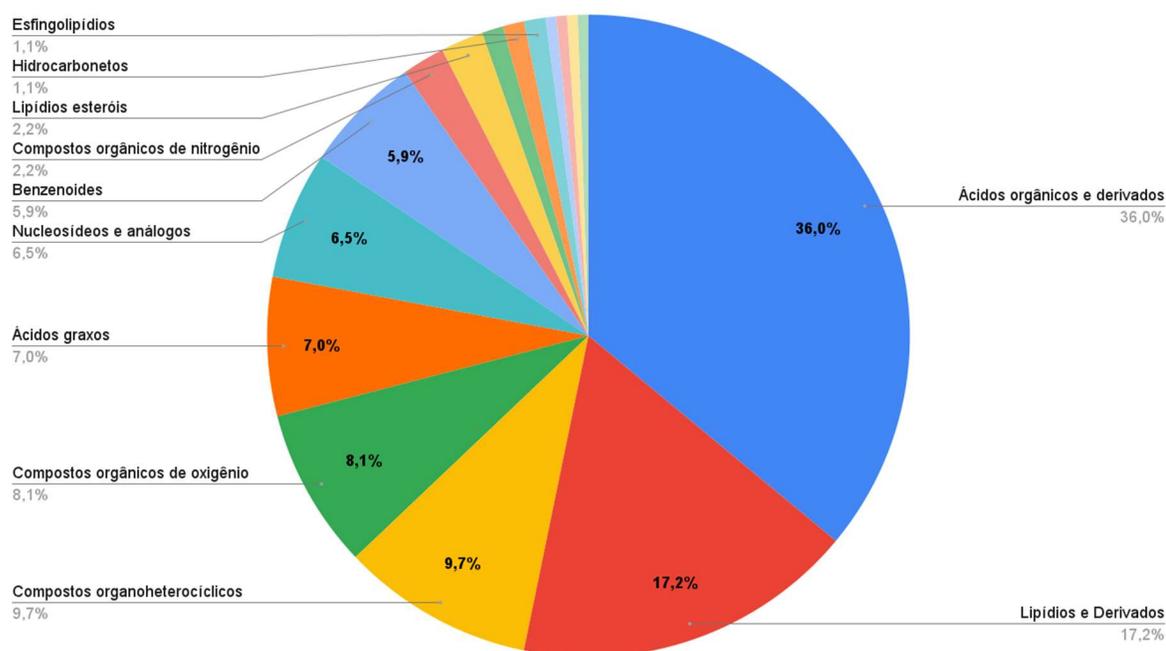


Figura 9 - Principais Categorias de metabólitos identificados. Identificação de metabólitos estatisticamente significativos selecionados com base em um p-valor $\leq 0,05$ na ANOVA e um VIP maior que 1,0. FONTE: Autoria própria.

5.2.3. Análise Multivariada PLS-DA UPLC-QToF-MS

Para modelar e acentuar as diferenças entre os metabólitos responsáveis pela separação dos grupos, as comparações foram avaliadas pelo método de PLS-DA. O ajuste do modelo pode ser verificado por R^2 (variância explicada) e Q^2 (variância predita). Os valores de variância explicada e variância predita dependem do tipo de amostra analisada, entretanto para matriz biológica, $R^2 > 0,7$ e $Q^2 > 0,4$ são aceitáveis (LUNDSTEDT et al., 1998). O modelo PLS-DA foi validado utilizando o método de validação cruzada k-fold (*10-fold cross-validation*), em que o conjunto total de amostras foi dividida em 10 grupos de validação e de teste, para minimizar o *overfitting*, isto é, um “sobreajuste” excessivo aos dados, capturando não só as variações biológicas entre os grupos de indivíduos, mas também o ruído espúrio presente nos dados (WESTERHUIS et al, 2008; LEE et al 2018).

Os resultados obtidos sugerem que o modelo PLS-DA demonstra potencial para discriminar os 4 grupos, com R^2 de 0,76. Além disso, o teste de validação cruzada revelou um Q^2 de 0,42,

valor esperado dado o grande número de grupos (sobreposição) (Figura 10).

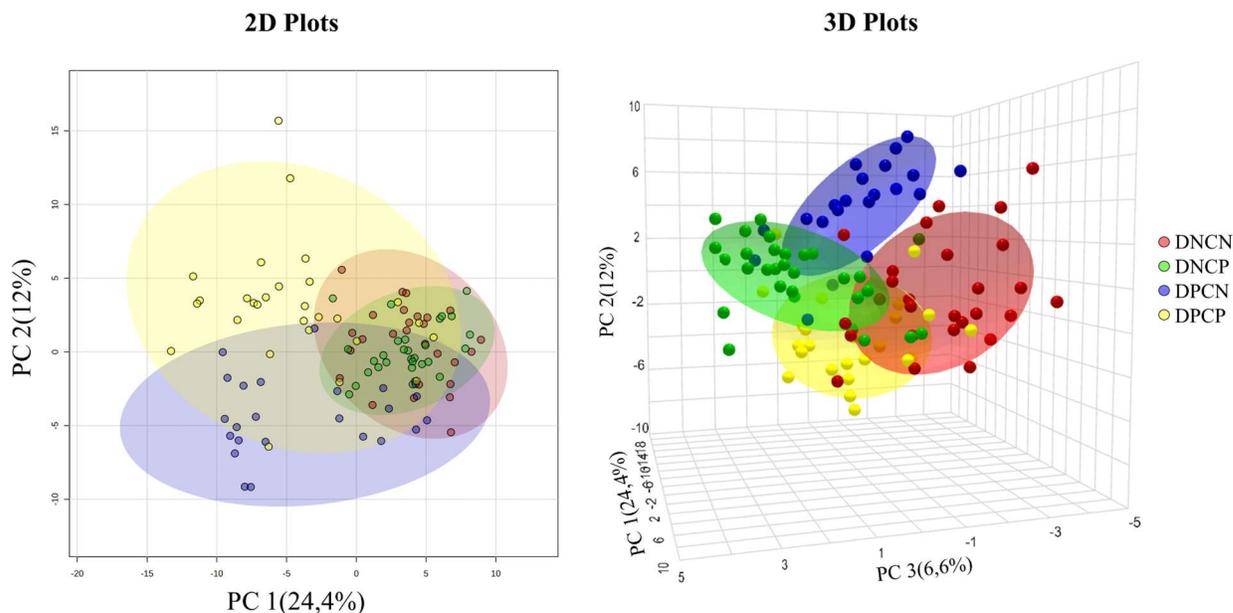


Figura 10 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os quatro grupos. Gráfico de escores de componente 1 versus componente 2, descrevendo 36,4 % da variância total dos dados e gráfico de escores 3D de componente 1 versus componente 2 versus componente 3 descrevendo 43% da variância total dos dados. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

Após a prévia seleção por ANOVA, identificamos 858 features com um valor- $p < 0,05$, que demonstraram ser estatisticamente significativos ao comparar os grupos DNCN e DNCP. Tais *features* foram utilizados para criar o modelo PLS-DA (Figura 11), o modelo discriminou de forma satisfatória os grupos, com R^2 de 0.91 e Q^2 de 0.56. Através de suas duas componentes principais, explicou 20,4 % da variância total. A seguir, os quatro grupos serão comparados dois a dois.

5.2.4. Alterações no metabolôma devido à infecção por COVID-19

Com o objetivo de verificar os elementos que desempenharam um papel relevante na diferenciação e discriminação dos perfis metabólicos entre os grupos DNCN e DNCP, avaliamos o VIP score dos compostos, selecionando aqueles maiores que 1. Ao total 154 *features* se enquadraram nesse requisito e estão detalhadamente descritos na Tabela 2 do Anexo 5.

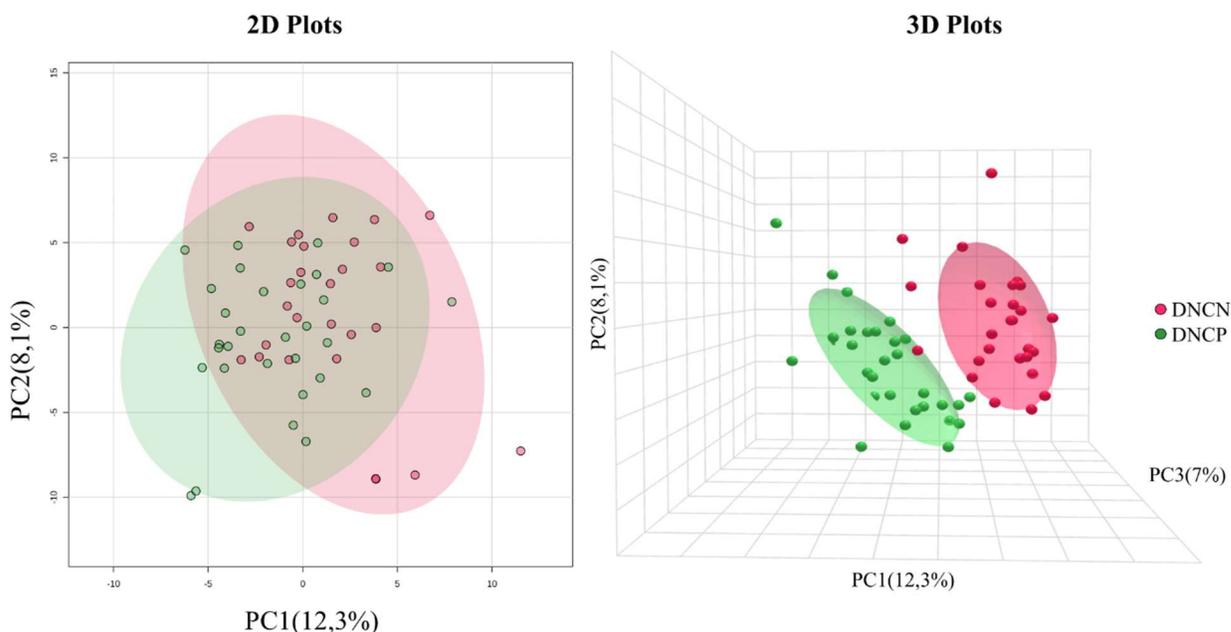


Figura 11 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os grupos DNCN e DNCP. Gráfico de escores de componente 1 versus componente 2, descrevendo 20,4 % da variância total dos dados e gráfico de escores 3D de componente 1 versus componente 2 versus componente 3 descrevendo 27,4% da variância total dos dados. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

Dos 154 metabólitos que apresentaram maiores VIPs scores e significativamente contribuem para a separação dos grupos na PLS-DA, foi possível a identificação putativa de 110 metabólitos, dos quais, 91 foram oriundos de fontes exógenas, tendo destaque a biotransformação de fármacos, principalmente antibióticos da classe dos β -lactâmicos, anticoagulantes, anti-histamínico, anti-inflamatórios não esteroides e anti-hipertensivos (Figura 12).

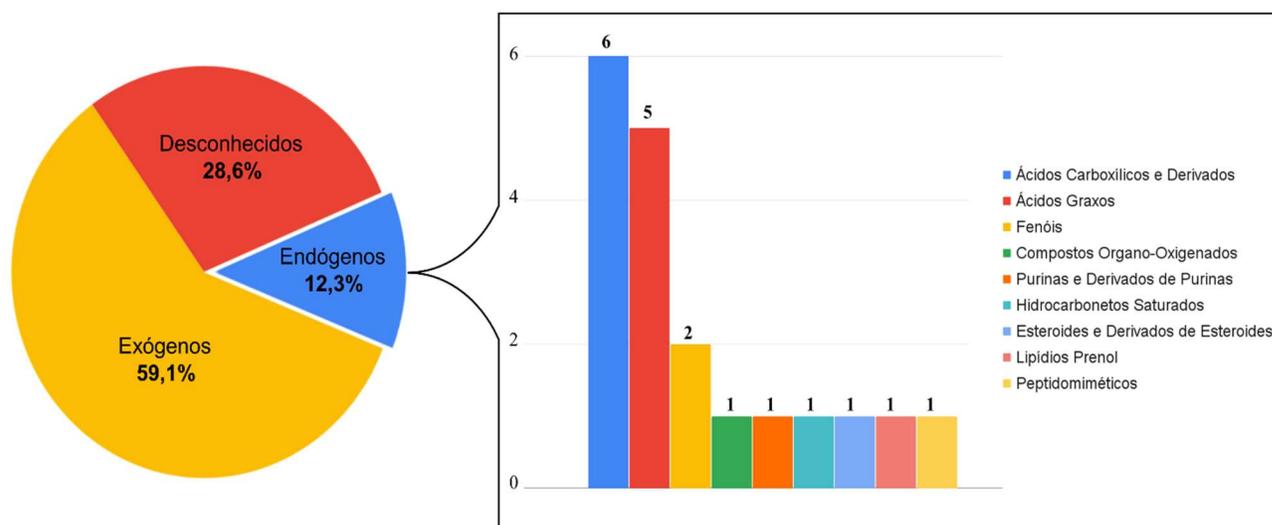


Figura 12 - Distribuição de metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DNCN e DNCP.
 FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

Em relação aos metabólitos endógenos, 19 foram identificados e estão detalhadamente descritos na Tabela 4. As classes mais frequentes foram os Ácidos carboxílicos e derivados (31,5%), os Ácidos Graxos (26,3%) e os Fenóis (10,5%) conforme mostrado na Figura 12.

TABELA 4. Metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DNCN e DNCP. Seleção dos metabólitos endógenos diferencialmente abundantes que mais impactaram a discriminação dos grupos, ranqueados por meio do VIP score.

| HMDB ID | Experimental m/z | Tempo de Retenção | Modo de Ionização | Classes | VIP score | Nível de confiança |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|-----------|--------------------|
| HMDB0039493 | 288.1233m/z | 6.69 | POS | Ácidos Graxos | 2,9 | 2 |
| HMDB0241144 | 330.2277m/z | 5.55 | POS | Ácidos Graxos | 2,8 | 2 |
| HMDB0000230 | 292.1039m/z | 8.77 | POS | Compostos Organo-Oxigenados | 2,8 | 2 |
| HMDB0000824 | 182.1185m/z | 2.55 | POS | Ácidos Graxos | 2,6 | 2 |
| HMDB0000806 | 251.1991m/z | 6.69 | POS | Ácidos Graxos | 2,5 | 2 |
| HMDB0012176 | 161.0932m/z | 7.26 | NEG | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 2,3 | 2 |
| HMDB0000289 | 167.0202m/z | 6.67 | NEG | Purinas e Derivados de Purinas | 2,3 | 2 |
| HMDB0036123 | 493.2228m/z | 3.41 | NEG | Ácidos Graxos | 2,2 | 2 |
| HMDB0029443 | 299.1239m/z | 7.06 | NEG | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 1,9 | 2 |
| HMDB0037269 | 426.0424m/z | 1.05 | NEG | Hidrocarbonetos Saturados | 1,8 | 2 |
| HMDB0006752 | 330.2987m/z | 5.55 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 1,7 | 2 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------|-----|--------------------------------------|-----|---|
| HMDB0062403 | 261.0488m/z | 7.31 | POS | Fenóis | 1,6 | 2 |
| HMDB0062403 | 261.0487m/z | 6.65 | POS | Fenóis | 1,5 | 2 |
| HMDB0059767 | 188.0692n | 6.92 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 1,5 | 2 |
| HMDB0011174 | 251.1369m/z | 6.69 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 1,4 | 2 |
| HMDB0002421 | 469.2261m/z | 2.87 | NEG | Esteroides e Derivados de Esteroides | 1,1 | 3 |
| HMDB0041278 | 400.1643n | 2.25 | NEG | Lipídios Prenol | 1,1 | 2 |
| HMDB0250776 | 210.0434m/z | 4.63 | NEG | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 1,0 | 3 |
| HMDB0012881 | 267.1092m/z | 6.64 | NEG | Peptidomiméticos | 1,0 | 2 |

Um dos compostos endógenos identificados foi o Ácido diidrowyerona, do inglês *Dihydro Wyerone acid*, um tipo de ácido graxo furanóide, que está associado à formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos, as chamadas NET. Tais moléculas desempenham um papel importante na captura e inativação de diversos micro-organismos e são altamente recrutadas durante infecções pulmonares (DIDANGELOS, 2020; DINIZ et al, 2021). Foi observado que a infecção pelo SARS-CoV-2 pode induzir diretamente o a formação e a liberação de NET em neutrófilos saudáveis (VERAS et al, 2020). Adicionalmente, a produção de NET tem sido considerada como um indicador preditivo da gravidade associados aos desfechos clínicos da COVID-19 (DIDANGELOS, 2020; JANIUK et al, 2020; DINIZ et al, 2021). A elevação desse metabólito no grupo DNCP (Figura 13) sugere, portanto, uma resposta inflamatória mais acentuada nesses indivíduos em comparação com o grupo DNCN.

Outro metabólito endógeno identificado foi a 3,9-Diidroxidecanoilcarnitina, uma hidroxil-acilcarnitinas de cadeia média (DAMBROVA et al, 2022). Em relação ao grupo DNCN, o grupo DNCP demonstrou uma maior abundância deste metabólito (Figura 13). Concentrações mais elevadas de acilcarnitinas circulantes de cadeia média foram identificadas em pacientes que não sobreviveram à sepse, sugerindo um papel potencialmente importante para a carnitina na resposta metabólica na sepse. (LANGLEY et al., 2013; PUSKARICH et al., 2018). Em paralelo, estudos em modelos animais têm enfatizado o papel fundamental da oxidação das acilcarnitinas de cadeia média e longa na resposta imunológica, demonstrando o envolvimento desses compostos na ativação das células imunes pró-inflamatórias (MAKRECKA et al, 2014; MALANDRINO et al, 2015; LIEPINSH et al, 2017; DAMBROVA et al, 2022). A hipótese mais aceita é que a disponibilidade de acilcarnitinas de cadeia média e longa, exerce uma influência significativa sobre

o perfil do metabolismo energético nas células do sistema imunológico e, por consequência, direcionam uma ativação das células pró-inflamatória (LIEPINSK et al, 2017; PUSKARICH et al., 2018; DAMBROVA et al, 2022).

O grupo DNCP apresentou abundância menor de propionilcarnitina em comparação com o grupo DNCN (Figura 13). A propionilcarnitina é uma acilcarnitina de cadeia curta, uma correlação foi observada entre a diminuição da presença de acilcarnitinas de cadeia curta na urina e condições metabólicas, tais como a obesidade e resistência à insulina. (CHO et al, 2017; DAMBROVA et al, 2022) Em paralelo, a desregulação dos níveis de acilcarnitinas na urina podem indicar uma cascata de inflamação alterada, devido a intensificação da oxidação incompleta de ácidos graxos beta-mitocondriais (CHO et al, 2017).

Em relação ao grupo DNCN, o grupo DNCP demonstrou um aumento concentração de Ácido mirístico (Figura 13). Esse composto é um ácido graxo insaturado de 14 carbonos que é encontrado nas membranas celulares humanas (STILLWELL, 2016). Devido sua hidrofobicidade é frequentemente usada para ancorar proteínas sinalizadoras à membrana plasmática, através de uma ligação amida com a glicina N-terminal da proteína (BEAUCHAMP et al, 2009; STILLWELL, 2016). A elevação de ácido mirístico livre já foi identificado em pacientes com descompensação da resposta inflamatória sistêmica e septicemia (KAUPPI et al. 2016; ZAZULA et al, 2021). Além disso, o ácido mirístico já foi identificado como um potencial biomarcadores imunológicos em pacientes com COVID-19 (CAI et al, 2021), demonstrando sua relevância mesmo na presença de uma resposta inflamatória induzida durante a infecção assintomática por SARS-CoV-2 (HAO et al., 2021).

O grupo DNCP apresentou abundância menor de N-Acetylneuraminic acid, também conhecido como ácido N-acetilneuramínico, em comparação com o grupo DNCN (Figura 13). Tal molécula pertence à classe dos ácidos siálicos, que são α -cetoácidos de nove carbonos, sendo predominantemente encontrados como resíduos terminais em glicoproteínas (SCHAUER & KAMERLING, 2018; ZHAO et al, 2023). FRANCI et al (2016) relata que que N-acetilneuramínico é o principal sítio de ligação para a entrada de vírus respiratórios como Influenza A e B (FRANCI et al, 2016). Alguns estudos já demonstraram que tal molécula podem funcionar como receptores potenciais para ligação à proteína spike do SARS-CoV-2 (MORNIROLI et al, 2020; KUCHIPUDI et al, 2021; MILANETTI et al, 2021).

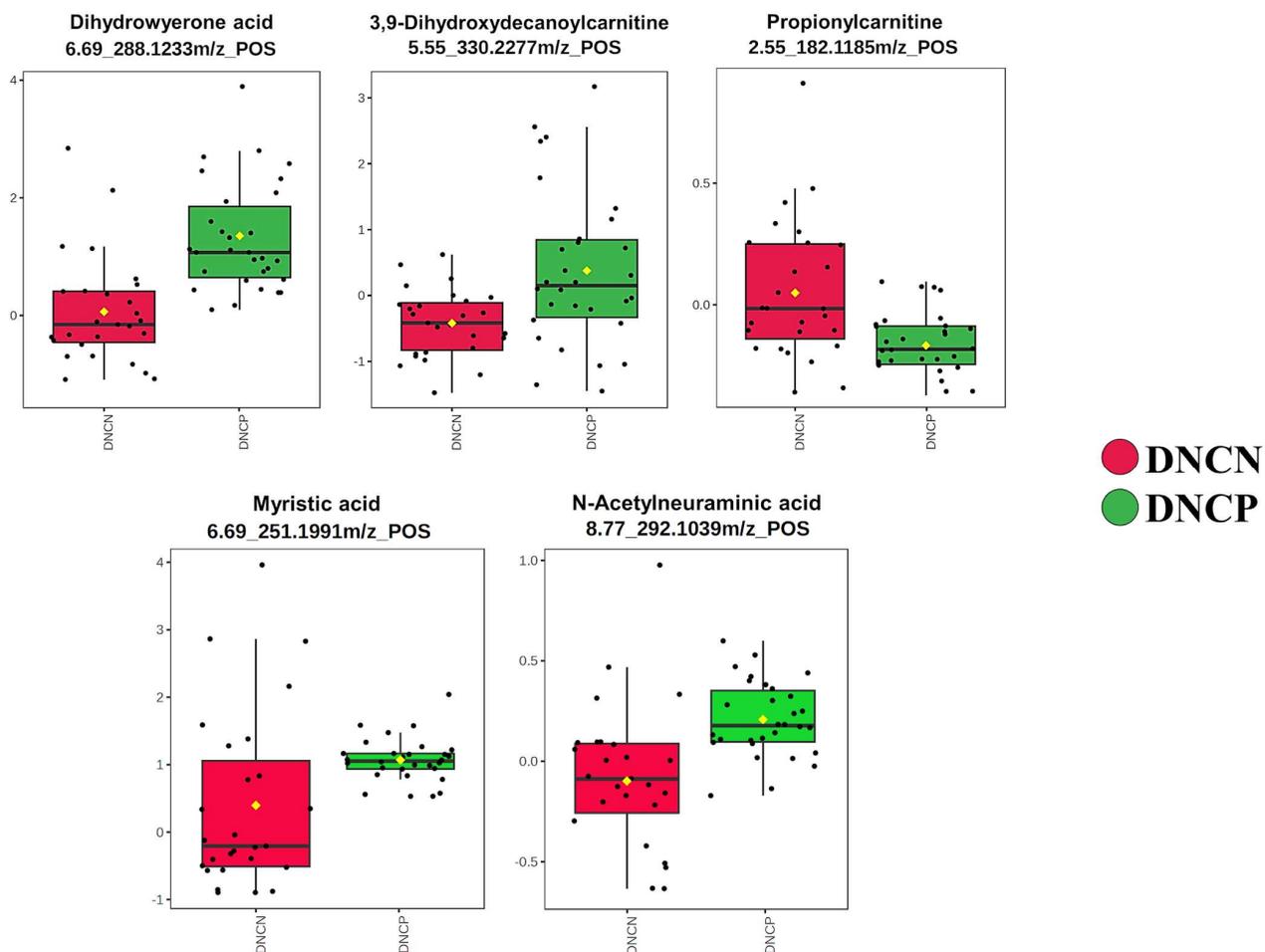


Figura 13 - Box plots da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos na urina dos grupos DNCN e DNCP. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

5.2.5. Alterações no metabolôma devido à Diabetes

Para comparar os grupos DNCN e DPCN, utilizamos os *features* selecionados pela triagem conduzida por ANOVA ($p \leq 0,05$) e obtivemos um total de 855 *features* que revelaram relevância estatística na distinção entre esses dois grupos. Estas *features* foram então aplicadas na formulação do modelo PLS-DA (Figura 14), que obteve sucesso ao discriminar os grupos, com um R^2 de 0.77 e um Q^2 de 0.59. É importante notar que, por meio de suas duas componentes principais, o modelo explicou 37,8% da variância total.

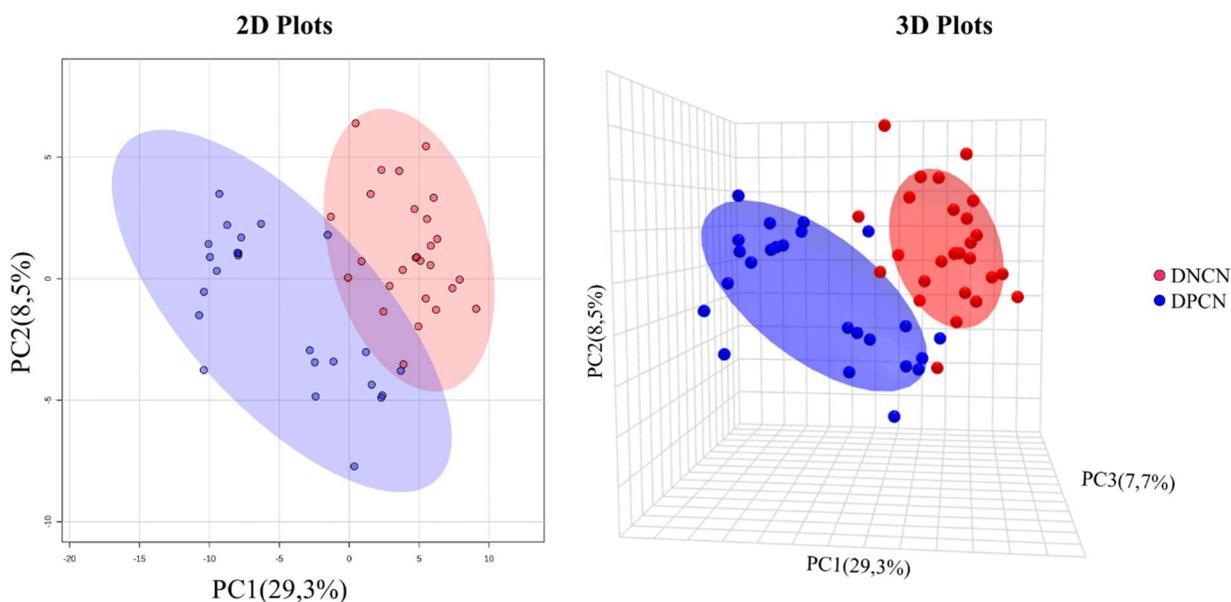


Figura 14 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os grupos DNCN e DPCN. Gráfico de escores de componente 1 versus componente 2, descrevendo 37,8 % da variância total dos dados e gráfico de escores 3D de componente 1 versus componente 2 versus componente 3 descrevendo 45,5% da variância total dos dados. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

Com a finalidade de analisar quais elementos desempenharam um papel significativo na diferenciação dos perfis metabólicos entre os grupos DNCN e DPCN, realizamos uma avaliação dos escores VIP dos compostos, optando por selecionar aqueles com valores superiores a 1. No total, 587 *features* atenderam a esse critério e estão detalhadamente descritos no Anexo 5 Tabela 3. Foi possível a identificação putativa de 203 metabólitos, dos quais, 134 foram oriundos de fontes exógenas. Tendo destaque para produtos exógenos oriundos da biotransformação de fármacos, incluindo hipoglicemiantes (sulfonilureias, tiazolidinedionas e biguanidas), β -lactâmicos, anticoagulantes, anti-histamínicos, anti-inflamatórios não esteroides e anti-hipertensivos (Figura 15).

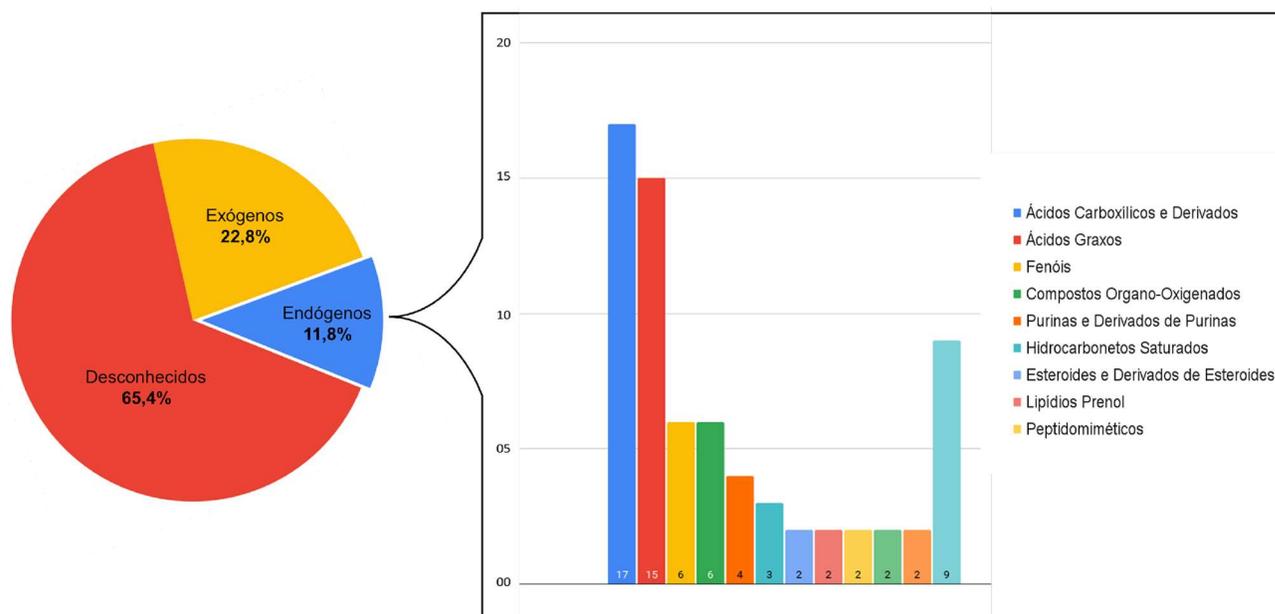


Figura 15 - Distribuição de metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DNCN e DPCN.
 FONTE: Autoria própria.

Em relação aos metabólitos endógenos, 69 foram identificados e estão detalhadamente descritos na Tabela 5. As classes mais frequentes foram os Ácidos Graxos (24,2%), os Ácidos Carboxílicos e Derivados (21,4%) e os Lípidos Prenol (8,5%) conforme mostrado na Figura 15.

TABELA 5. Metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DNCN e DPCN. Seleção dos metabólitos endógenos diferencialmente abundantes que mais impactaram a discriminação dos grupos, ranqueados por meio do VIP score.

| HMDB ID | Experimental m/z | Tempo de Retenção | Modo de Ionização | Classes | VIP score | Nível de confiança |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|-----------|--------------------|
| HMDB0038256 | 238.1567n | 4,56 | NEG | Ácidos Graxos | 4,5 | 2 |
| HMDB0003411 | 115.0637n | 2,18 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 4,2 | 2 |
| HMDB0000192 | 241.0318m/z | 9,61 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 4,0 | 2 |
| HMDB0062762 | 217.1532m/z | 7,71 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 3,9 | 2 |
| HMDB0041943 | 213.1242m/z | 2,42 | POS | Fenóis | 3,5 | 2 |
| HMDB0001182 | 152.0329n | 5,4 | POS | Imidazopirimidinas | 3,5 | 2 |
| HMDB0059729 | 227.1287m/z | 5,21 | POS | Ácidos Graxos | 3,4 | 2 |
| HMDB0059736 | 183.1381m/z | 4,19 | NEG | Ácidos Graxos | 3,3 | 2 |
| HMDB0036143 | 298.2015m/z | 5,14 | POS | Lípidos Prenol | 3,2 | 2 |
| HMDB0005923 | 284.0883m/z | 4,07 | NEG | Nucleosídeos de Pirimidina | 3,1 | 2 |
| HMDB0032395 | 136.1118m/z | 4,07 | POS | Hidrocarbonetos Insaturados | 2,9 | 2 |
| HMDB0241086 | 308.1850m/z | 5,17 | POS | Ácidos Graxos | 2,8 | 3 |
| HMDB0241054 | 310.1656m/z | 5,84 | POS | Ácidos Graxos | 2,7 | 3 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------|-----|---|-----|---|
| HMDB0062620 | 135.0304m/z | 4,40 | NEG | Compostos Orgânicos com Oxigênio | 2,7 | 3 |
| HMDB0006556 | 112.0400m/z | 7,96 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 2,7 | 2 |
| HMDB0006464 | 390.3372m/z | 7,5 | POS | Ácidos Graxos | 2,7 | 2 |
| HMDB0037037 | 427.2117m/z | 1,16 | NEG | Ácidos Graxos | 2,6 | 3 |
| HMDB0029410 | 168.1134m/z | 2,75 | POS | Compostos Orgânicos com Oxigênio | 2,6 | 2 |
| HMDB0241923 | 272.1863m/z | 5,58 | POS | Ácidos Graxos | 2,5 | 3 |
| HMDB0036974 | 591.4218m/z | 4,24 | POS | Ácidos Graxos | 2,5 | 2 |
| HMDB0011174 | 229.1551m/z | 6,65 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 2,5 | 2 |
| HMDB0005960 | 94.0655m/z | 5,23 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 2,4 | 2 |
| HMDB0004148 | 297.0517m/z | 4,89 | POS | Ácidos Sulfúricos Orgânicos e Derivados | 2,4 | 2 |
| HMDB0001129 | 202.0711m/z | 3,85 | NEG | Compostos Orgânicos com Oxigênio | 2,4 | 2 |
| HMDB0094765 | 180.1027m/z | 7,94 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 2,3 | 2 |
| HMDB0032958 | 273.1699m/z | 3,54 | NEG | Ácidos Graxos | 2,3 | 2 |
| HMDB0031865 | 295.1293m/z | 7,57 | POS | Compostos Orgânicos com Oxigênio | 2,3 | 2 |
| HMDB0031133 | 749.5166m/z | 4,28 | POS | Glicerolipídios | 2,3 | 3 |
| HMDB0003334 | 201.1348m/z | 8,08 | NEG | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 2,3 | 2 |
| HMDB0036090 | 181.1108n | 4,24 | POS | Lípidos Prenol | 2,2 | 2 |
| HMDB0014917 | 255.0743m/z | 6,62 | POS | Diazanftalenos | 2,2 | 2 |
| HMDB0010375 | 721.5905m/z | 5,58 | POS | Esteroides e Derivados de Esteroides | 2,2 | 3 |
| HMDB0002120 | 229.0277m/z | 3,15 | NEG | Benzeno e Derivados Substituídos | 2,2 | 2 |
| HMDB0001896 | 192.1027m/z | 4,82 | POS | Indóis e Derivados | 2,2 | 3 |
| HMDB0001432 | 153.1110m/z | 3,52 | POS | Compostos Orgânicos com Nitrogênio | 2,2 | 2 |
| HMDB0039655 | 197.1291m/z | 1,33 | POS | Piridinas e Derivados | 2,1 | 2 |
| HMDB0033643 | 297.1358m/z | 1,14 | NEG | Lípidos Prenol | 2,1 | 2 |
| HMDB0013324 | 286.2016m/z | 5,21 | POS | Ácidos Graxos | 2,1 | 3 |
| HMDB0012843 | 115.0752m/z | 4,24 | POS | Ácidos Hidroxílicos e Derivados | 2,1 | 2 |
| HMDB0010347 | 362.1824m/z | 5,84 | POS | Compostos Orgânicos com Oxigênio | 2,1 | 3 |
| HMDB0002203 | 187.1331m/z | 1,58 | NEG | Ácidos Hidroxílicos e Derivados | 2,1 | 2 |
| HMDB0240724 | 335.2176m/z | 6,30 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 2,0 | 2 |
| HMDB0034757 | 389.0910m/z | 2,87 | NEG | Ácidos Graxos | 2,0 | 2 |
| HMDB0012883 | 199.1081m/z | 2,48 | POS | Indóis e Derivados | 2,0 | 2 |
| HMDB0012162 | 150.0920m/z | 5,48 | POS | Fenóis | 1,9 | 2 |
| HMDB0006584 | 673.2296m/z | 7,34 | NEG | Compostos Orgânicos com Oxigênio | 1,9 | 3 |
| HMDB0304210 | 146.0928m/z | 7,59 | POS | Diazinas | 1,8 | 2 |
| HMDB0039650 | 226.1078m/z | 2,21 | POS | Ácidos Graxos | 1,8 | 3 |
| HMDB0028754 | 264.1193m/z | 7,9 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 1,8 | 2 |
| HMDB0001389 | 296.1358m/z | 1,70 | POS | Indóis e Derivados | 1,8 | 2 |
| HMDB0001238 | 260.1396m/z | 6,3 | POS | Indóis e Derivados | 1,8 | 2 |
| HMDB0241782 | 306.1352m/z | 1,28 | NEG | Ácidos Graxos | 1,7 | 2 |
| HMDB0093324 | 479.3691m/z | 6,94 | POS | Glicerolipídios | 1,7 | 2 |
| HMDB0037104 | 191.1088m/z | 6,73 | NEG | Lípidos Prenol | 1,7 | 2 |
| HMDB0012175 | 160.0976m/z | 7,41 | POS | Ácidos Graxos | 1,7 | 2 |
| HMDB0011174 | 251.1367m/z | 7,11 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 1,7 | 2 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------|-----|--------------------------------------|-----|---|
| HMDB0038793 | 415.2118m/z | 1,04 | POS | Lípidos Prenol | 1,6 | 2 |
| HMDB0001983 | 296.0995m/z | 4,89 | NEG | 5'-Desoxirribonucleosídeos | 1,6 | 2 |
| HMDB0304552 | 122.0968m/z | 4,40 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 1,5 | 2 |
| HMDB0039376 | 331.1323m/z | 3,06 | NEG | Lípidos Prenol | 1,5 | 2 |
| HMDB0031911 | 333.0626m/z | 0,77 | NEG | Ácidos Graxos | 1,5 | 2 |
| HMDB0001138 | 188.0556m/z | 5,46 | NEG | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 1,5 | 2 |
| HMDB0011174 | 267.1108m/z | 6,65 | POS | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 1,4 | 2 |
| HMDB0005923 | 349.1105m/z | 7,39 | POS | Nucleosídeos de Pirimidina | 1,4 | 2 |
| HMDB0013124 | 198.1128m/z | 1,79 | POS | Ácidos Graxos | 1,3 | 2 |
| HMDB0004824 | 310.1152m/z | 4,75 | NEG | Nucleosídeos de Purina | 1,3 | 2 |
| HMDB0002721 | 282.0958n | 3,59 | NEG | Nucleosídeos de Purina | 1,3 | 2 |
| HMDB0004135 | 563.1849m/z | 3,56 | NEG | Ácidos Carboxílicos e Derivados | 1,2 | 2 |
| HMDB0010337 | 480.2569m/z | 6,97 | POS | Esteroides e Derivados de Esteroides | 1,1 | 2 |
| HMDB0005862 | 339.1415m/z | 4,70 | POS | Nucleosídeos de Purina | 1,1 | 2 |

Um dos compostos endógenos identificados com maior vip score foi o Acetoacetato de geranila, do inglês *Geranyl acetoacetate*, composto pertencente à classe dos ésteres de álcoois graxos. Esse composto apresentou maior abundância no grupo DNCN, quando comparado com o grupo DPCN (Figura 16). A compreensão dos mecanismos envolvidos e os benefícios potenciais desse composto ainda não foram completamente esclarecidas, entretanto essa substância demonstrou desempenhar um papel na modulação da comunicação entre o eixo intestino-cérebro, além de atuar como um importante substrato para fermentação realizada pela microbiota intestinal (WACHSMUTH et al, 2022; ZHUAN et al, 2022; ANISONG et al, 2023). É importante ressaltar que o sistema gastrointestinal é importante na regulação da homeostase energética, sendo um componente chave na manutenção dos níveis de glicose sérico, além disso disbioses e alterações gastrointestinais têm sido associadas a elevação na predisposição ao desenvolvimento de doenças metabólicas, como diabetes e obesidade (WACHSMUTH et al, 2022; BAJINKA et al, 2023). Outro fator importante a ser ressaltado é que a microbiota intestinal impacta funções fisiológicas importantes do hospedeiro, incluindo a resposta imunológica e o sistema nervoso (FUNG et al, 2017; WACHSMUTH et al, 2022; BAJINKA et al, 2023).

O grupo DPCN apresentou abundância maior do aminoácido D-Prolina em comparação com o grupo DNCN (Figura 16). Nas últimas década, novos *insights* sobre a fisiopatologia do diabetes mostraram uma íntima associação entre anormalidades do metabolismo de aminoácidos relacionados ao desenvolvimento de hiperglicemia crônica (WURTZ et al, 2012; KIM et al, 2017; CHEN et al, 2021). CHEN e colaboradores, apontaram a prolina como um marcador para de

alterações no metabolismo da glicose, além de um potencial preditor para do desenvolvimento de diabetes tipo 2. Outro aminoácido diferencial foi entre os grupos DPCN e DNCN foi a *L-cistina*, a única via endógena de produção desse aminoácido é através da transulfuração da homocisteína (YIN et al, 2016; SBODIO et al, 2019). Estudos em modelo animal demonstram elevação dessa produção endógena de cistina em células submetidas a elevado estresse oxidativo (HUANG et al, 2013; YIN et al, 2016). Além disso, a transulfuração desse aminoácido libera sulfeto de hidrogênio (H₂S) e as mudanças no equilíbrio desse composto já foram descritas tendo um papel significativo na disfunção das células beta pancreáticas no diabetes tipo 1 e tipo 2 (SBODIO et al, 2019; ZHAO et al, 2022; SUN et al, 2023).

O grupo DPCN apresentou abundância maior do aminoácido *L-Arginina* em comparação com o grupo DNCN (Figura 16). Alguns estudos demonstram uma elevação sérica desse aminoácido em pacientes com retinopatia diabética (SUMARRIVA et al, 2019). Além disso e a elevação desse composto também demonstrou associação a elevação da capacidade respiratória do músculo esquelético (HAFNER et al, 2016; CHEN et al, 2020). É sabido que esse aminoácido é peça chave em várias vias metabólicas, entre elas a via do Ácido Nítrico (NO) que é uma importante molécula envolvida na regulação mitocondrial (NISOLI et al, 2004). Além disso, a redução da função mitocondrial do músculo esquelético está intimamente associada à resistência periférica à insulina (SCHRAUWEN, 2017).

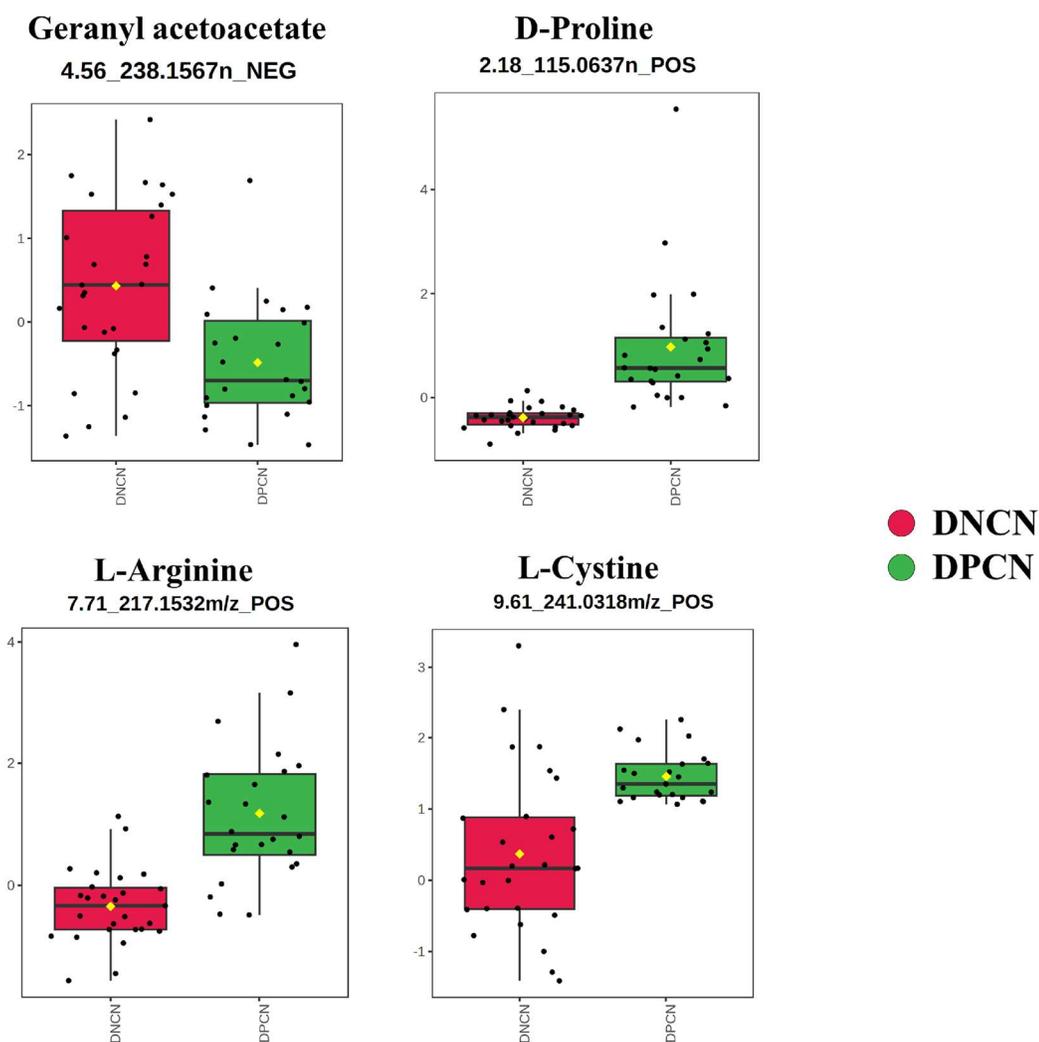


Figura 16 - Box plots da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos na urina dos grupos DNCN e DPCN. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

5.2.6. Comparação do Metabolôma entre os grupos inflamados COVID-19 versus Diabetes

Para realizar a comparação entre os grupos DNCP e DPCN, utilizamos as características previamente selecionadas através da triagem realizada com ANOVA (com um p -valor < 0,05), resultando em um conjunto de 1001 características que demonstraram significância estatística na diferenciação entre esses grupos. Essas características foram então empregadas na construção do modelo PLS-DA (Figura 17), que conseguiu com sucesso discriminar esses grupos, apresentando

um R^2 de 0.95 e um Q^2 de 0.62. É relevante destacar que, por meio de suas duas principais componentes, o modelo explicou 31,8% da variância total.

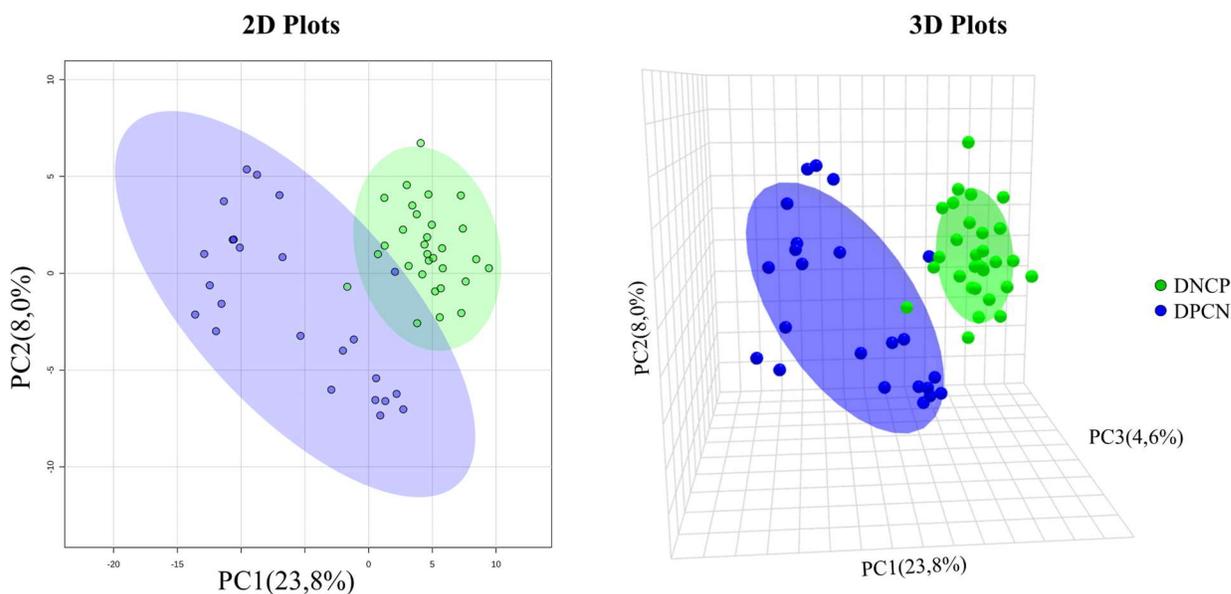


Figura 17 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os grupos DNCP e DNCP. Gráfico de escores de componente 1 versus componente 2, descrevendo 31,8 % da variância total dos dados e gráfico de escores 3D de componente 1 versus componente 2 versus componente 3 descrevendo 36,4% da variância total dos dados. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

Para investigar quais elementos desempenharam um papel relevante na distinção dos perfis metabólicos entre os grupos DNCP e DPCN, conduzimos uma avaliação dos *VIP score* dos compostos, selecionando criteriosamente aqueles com valores acima de 1. No conjunto, encontramos um total de 725 *features* que se enquadram nesse critério, e essas estão detalhadamente dispostas na Tabela 4 anexo 5.

Foi possível a identificação putativa de 226 metabólitos, dos quais, 202 foram oriundos de fontes exógenas (Figura 18). Tendo destaque para produtos exógenos oriundos da biotransformação de fármacos, incluindo esteróides glicocorticóides, sulfonilureias, anti-agregantes plaquetários, anticoagulantes.

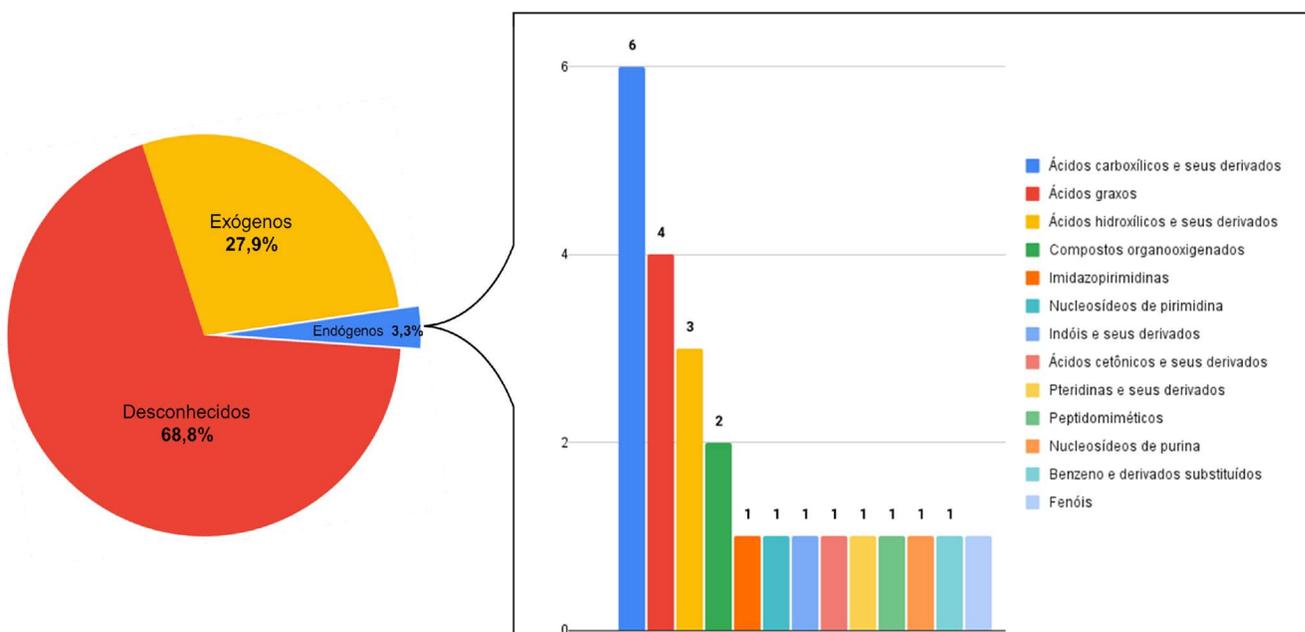


Figura 18 - Distribuição de metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DPCN e DNCP.
 FONTE: Autoria própria.

Em relação aos metabólitos endógenos, 24 foram identificados e estão detalhadamente descritos na Tabela 6. As classes mais frequentes foram os Ácidos carboxílicos e seus derivados (25%), os Ácidos graxos (16,6%), Ácidos hidroxílicos e seus derivados (12,5%) e os Compostos organooxigenados (8,3%) conforme mostrado na Figura 18.

TABELA 6. Metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DNCP e DPCN. Seleção dos metabólitos endógenos diferencialmente abundantes que mais impactaram a discriminação dos grupos, ranqueados por meio do VIP score.

| HMDB ID | Experimental m/z | Tempo de Retenção | Modo de Ionização | Classes | VIP score | Nível de confiança |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------|--------------------|
| HMDB0000289 | 167,0202m/z | 6,67 | NEG | Imidazopirimidinas | 3.9 | 2 |
| HMDB0000357 | 149,0460m/z | 3,61 | NEG | Ácidos hidroxílicos e seus derivados | 3.5 | 2 |
| HMDB0000201 | 203,1157n | 6,73 | POS | Ácidos graxos | 3.1 | 2 |
| HMDB0000214 | 174,1240m/z | 6,87 | POS | Ácidos carboxílicos e seus derivados | 2.2 | 2 |
| HMDB0000296 | 243,0617m/z | 5,46 | NEG | Nucleosídeos de pirimidina | 2.2 | 2 |
| HMDB0000192 | 241,0318m/z | 9,61 | POS | Ácidos carboxílicos e seus derivados | 2.0 | 2 |
| HMDB0000929 | 222,1227m/z | 1,32 | POS | Indóis e seus derivados | 1.9 | 2 |
| HMDB0000060 | 85,0289m/z | 5,21 | POS | Ácidos cetônicos e seus derivados | 1.7 | 2 |
| HMDB0062488 | 632,2960m/z | 6,74 | POS | Ácidos graxos | 1.7 | 2 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------|-----|--------------------------------------|-----|---|
| HMDB0000468 | 237,0863n | 8,67 | POS | Pteridinas e seus derivados | 1.7 | 3 |
| HMDB0000230 | 290,0875m/z | 6,81 | NEG | Compostos organooxigenados | 1.6 | 3 |
| HMDB0000033 | 244,1410m/z | 8,54 | POS | Peptidomiméticos | 1.5 | 2 |
| HMDB0240254 | 263,1128n | 6,45 | POS | Compostos organooxigenados | 1.5 | 2 |
| HMDB0000050 | 232,0839m/z | 8,64 | POS | Nucleosídeos de purina | 1.4 | 2 |
| HMDB0000158 | 146,0608m/z | 6,11 | POS | Ácidos carboxílicos e seus derivados | 1.4 | 2 |
| HMDB0000350 | 260,1495m/z | 6,39 | POS | Ácidos hidroxílicos e seus derivados | 1.4 | 2 |
| HMDB0000172 | 114,0918m/z | 6,71 | POS | Ácidos carboxílicos e seus derivados | 1.3 | 2 |
| HMDB0000205 | 164,0471n | 6,8 | POS | Benzeno e derivados substituídos | 1.3 | 2 |
| HMDB0242036 | 346,3077m/z | 1,3 | POS | Ácidos carboxílicos e seus derivados | 1.2 | 3 |
| HMDB0000336 | 87,0443m/z | 7,89 | POS | Ácidos hidroxílicos e seus derivados | 1.2 | 2 |
| HMDB0000394 | 255,1589m/z | 2,81 | NEG | Ácidos graxos | 1.1 | 2 |
| HMDB0037037 | 427,2117m/z | 1,16 | NEG | Ácidos graxos | 1.1 | 2 |
| HMDB0000022 | 150,0921m/z | 4,59 | POS | Fenóis | 1.0 | 3 |
| HMDB0000459 | 199,1082m/z | 3,89 | POS | Ácidos carboxílicos e seus derivados | 1.0 | 2 |

O grupo DNCP apresentou abundância menor de ácido úrico em comparação com o grupo DPCN (Figura 19). O ácido úrico é um composto derivado do produto da oxidação do metabolismo das purinas. Tem sido proposto que hiperinsulinemia, característica comum em pacientes diabéticos do tipo 2, pode estimular a secreção urinário do ácido úrico (PEREZ-RUIZ et al, 2015; JOHNSON, 2015). Além disso, evidências robustas apontaram que o aumento do ácido úrico precede frequentemente o desenvolvimento síndrome metabólicas complexas, indicando uma ligação direta entre níveis elevados de ácido úrico e condições como hipertensão, obesidade, resistência à insulina, esteatose hepática e doença renal crônica (JOHNSON, 2015; KATSIKI & ATHYROS, 2021). Em contrapartida, o ácido úrico é conhecido, desde a década de 90, como a molécula antioxidante mais abundante no plasma humano (AMES et al, 1981; NERY et al, 2015; SONG et al, 2021). Em paralelo, tem importante papel na reparação de tecidos, mobilizando células progenitoras e combatendo a radicais livres, além de modular resposta imunológicas durante a cicatrização (SONEJA et al, 2005; NERY et al, 2015). Nesse contexto, embora as vias de infecção e a patogênese de diferentes vírus não sejam as mesmas, os mecanismos pelos quais eles causam danos são semelhantes (LEIGH & PROUD, 2015). A invasão viral desencadeia uma resposta imunológica, ativa fatores inflamatórios e gera uma alta produção de radicais livres (AKAIKE et al, 1998; LEIGH & PROUD, 2015) Alguns estudos relacionarem o nível de ácido úrico sérico associado à gravidade da COVID-19, ainda não está claro se um baixo nível de ácido úrico é uma causa ou consequência da condição dessa associação (HU et al, 2021, VELICHKO et al, 2022).

O grupo DPCN apresentou abundância menor do ácido 3-hidroxi-butírico em comparação com o grupo DNCP (Figura 19). Esse metabólito é um produto típico de degradação parcial de aminoácidos de cadeia ramificada liberados do músculo durante a gliconeogênese (ROJAS-MORALES et al, 2016; MIERZIAK et al, 2021). Investigações anteriores verificaram a redução nas concentrações circulantes desse composto em pacientes com resistência à insulina, indicando que concentrações elevadas de insulina direcionaram uma maior utilização ácidos graxos para a esterificação em vez da oxidação (BICKERTON et al, 2008, SHANTAVASINKUL et al 2018). Alguns estudos sugerem também que esse composto pode ser utilizado como biomarcador da função das células beta no diabetes tipo 2, uma vez que pacientes com ácido 3-hidroxi-butírico sérico mais elevado tinham maior probabilidade de ter níveis de hemoglobina glicada mais controlado, além de apresentarem melhor resposta ao tratamento antidiabético (SHANTAVASINKUL et al, 2018; LEE et al 2023). Em contrapartida, o Ácido 3-hidroxi-butírico foi avaliado em soro de pacientes com COVID-19 sendo indicado como um possível marcador de progressão de estágios mais leves para mais graves na COVID-19 (BRUZZONE et al, 2020; SHI et al, 2021). Em modelo animal foi observado que a infecção pelo SARS-Cov-2, facilita produção e a utilização ácido 3-hidroxi-butírico como fonte alternativa de energia (BEALE et al, 2021). Além disso, a presença elevada desse composto pode ser relacionada ao estresse oxidativo hepático, indicando um estresse metabólico geral em pacientes com COVID-19 (BRUZZONE et al, 2020; BEALE et al, 2021).

A L-acetilcarnitina é um éster de ácido acético de carnitina, esse composto facilita a utilização de acetil-CoA nas matrizes mitocondriais de mamíferos durante a oxidação de ácidos graxos. As carnitinas de cadeia curta apresentam um aumento em pacientes diabéticos (ZHAO et al, 2021; BANIMFREG et al, 2022), sendo a patogênese da resistência à insulina associada a distúrbios intra-mitocondriais, em especial de acilcarnitinas de cadeia curta e média, que se acumulam no citosol, levando à interrupção e inibição da sinalização da insulina (SCHOONEMAN et al, 2013; MCCOIN et al, 2015; SUN et al, 2016). A análise lipidômica de pacientes diabéticos também indicou que a dislipidemia relacionada ao diabetes estava principalmente associada aos níveis aumentados de acetilcarnitina (NIE et al, 2019; ZHAO et al, 2021; BANIMFREG et al, 2022). A avaliação dos perfis metabolômicos séricos de pacientes com COVID-19 durante os diferentes estágios da doença também mostraram uma elevação da acetilcarnitina na fase aguda de infecção, posteriormente reduzindo período de recuperação (ANSONE et al, 2021). Níveis

elevados de acetilcarnitina sérica de cadeia curta estão associados à liberação desses ácidos graxos pelo fígado durante infecções ou períodos de estresse (CHUNG et al, 2019; HUMES et al 2022). Processo necessário para auxiliar o aumento da beta oxidação que na síntese e recrutamento de leucócitos (CHUNG et al, 2019).

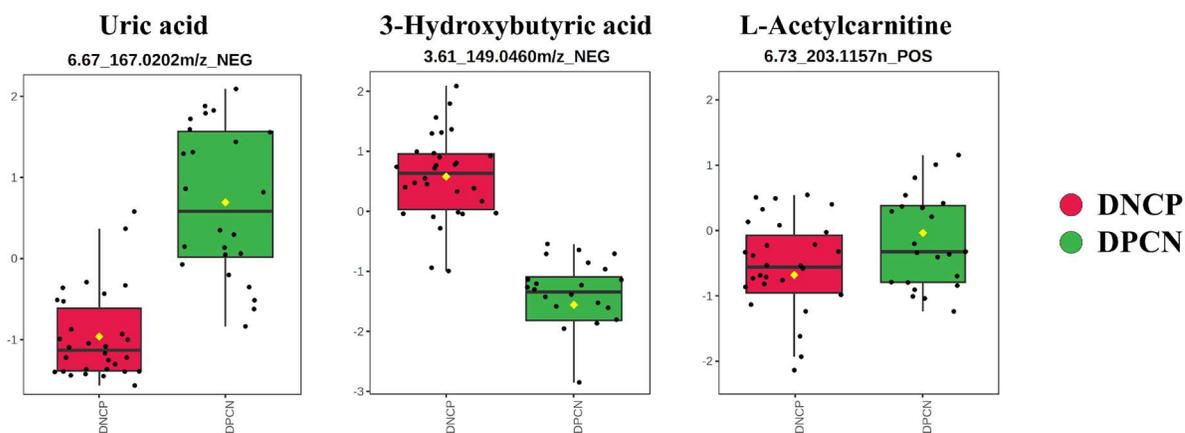


Figura 19 - Box plots da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos na urina dos grupos DNCP e DPCN. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

5.2.7. Alterações no metabolôma diabético devido à infecção por COVID-19

Para realizar a comparação entre os grupos DPCP e DPCN, utilizamos as características previamente selecionadas através da triagem realizada com ANOVA (com um p -valor $\leq 0,05$), resultando em um conjunto de 911 características que demonstraram significância estatística na diferenciação entre esses grupos. Essas características foram então empregadas na construção do modelo PLS-DA (Figura 20), cuja discriminação dos grupos apresentou um R^2 de 0.70 e um Q^2 de 0.54. É relevante destacar que, por meio de suas duas principais componentes, o modelo explicou 38,0% da variância total.

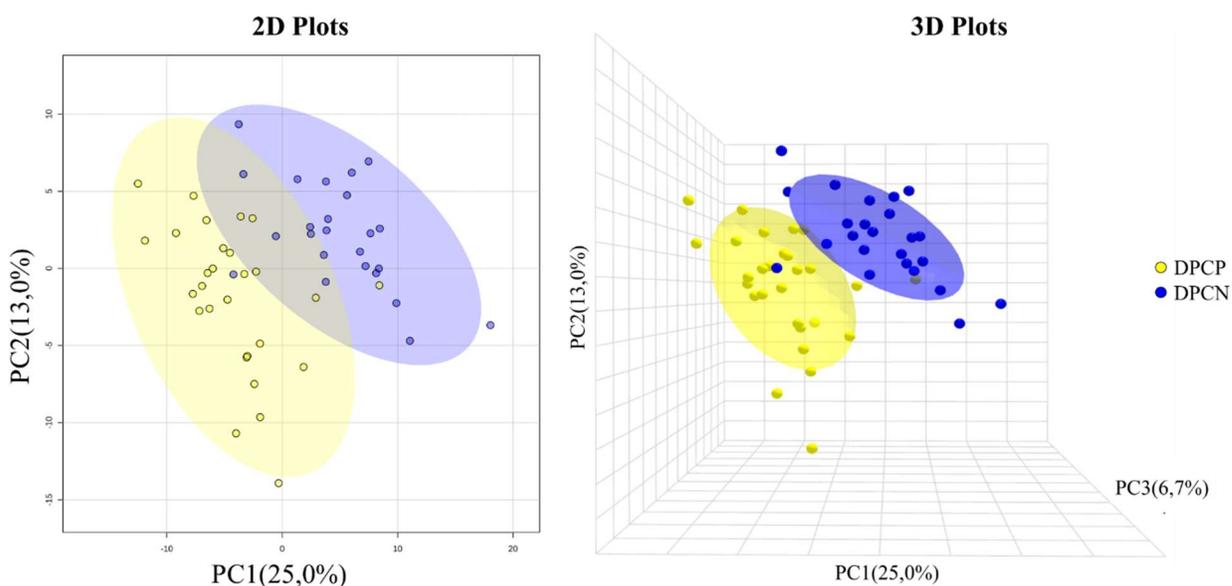


Figura 20 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os grupos DPCP e DPCN. Gráfico de escores de componente 1 versus componente 2, descrevendo 38,0 % da variância total dos dados e gráfico de escores 3D de componente 1 versus componente 2 versus componente 3 descrevendo 44,7% da variância total dos dados. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

Para investigar quais elementos desempenharam um papel relevante na distinção dos perfis metabólicos entre os grupos DPCP e DPCN, conduzimos uma avaliação dos *VIP score* dos compostos, selecionando criteriosamente aqueles com valores acima de 1. No conjunto, encontramos um total de 217 *features* que se enquadram nesse critério, e essas estão detalhadamente dispostas na Tabela 5 do anexo 5. Foi possível a identificação putativa de 98 metabólitos, dos quais, 67 foram oriundos de fontes exógenas (Figura 21).

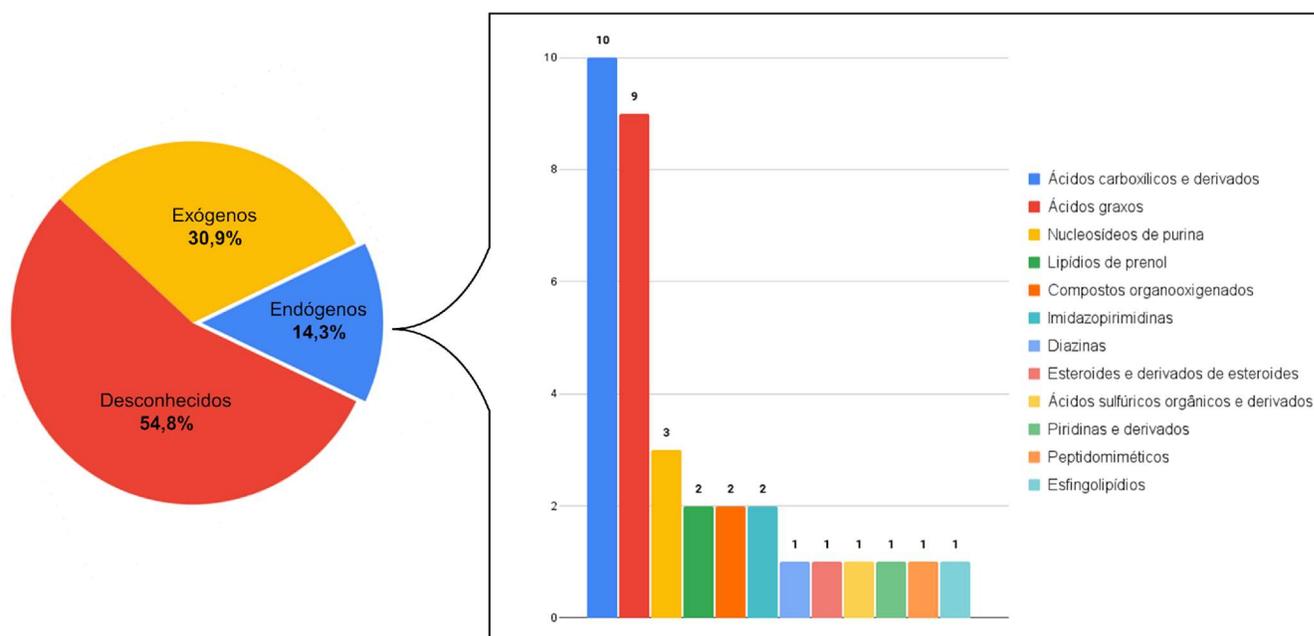


Figura 21 - Distribuição de metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DPCP e DPCN.
 FONTE: Autoria própria.

Em relação aos metabólitos endógenos, 31 foram identificados e estão detalhadamente descritos na Tabela 7. As classes mais frequentes foram os Ácidos carboxílicos e derivados (29,4%), os Ácidos graxos (26,4%) e os Nucleosídeos de purina (8,8%) conforme mostrado na Figura 21.

TABELA 7. Metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DPCP e DPCN. Seleção dos metabólitos endógenos diferencialmente abundantes que mais impactaram a discriminação dos grupos, ranqueados por meio do VIP score.

| HMDB ID | Experimental m/z | Tempo de Retenção | Modo de Ionização | Classes | VIP score | Nível de confiança |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------|--------------------|
| HMDB0250776 | 210,0434 m/z | 4,63 | NEG | Ácidos carboxílicos e derivados | 2.7 | 2 |
| HMDB0059946 | 400,1643n | 5,02 | POS | Lipídios de prenol | 2.2 | 2 |
| HMDB0241144 | 330,2277m/z | 5,55 | POS | Ácidos graxos | 2.2 | 2 |
| HMDB0006752 | 330,2987m/z | 5,55 | POS | Ácidos carboxílicos e derivados | 2.2 | 2 |
| HMDB0000630 | 94,0405m/z | 3,85 | POS | Diazinas | 2.2 | 2 |
| HMDB0000214 | 174,1240m/z | 6,87 | POS | Ácidos carboxílicos e derivados | 2.0 | 2 |
| HMDB0005862 | 210,0434m/z | 5,61 | POS | Nucleosídeos de purina | 2.0 | 2 |
| HMDB0029443 | 170,0931m/z | 7,06 | NEG | Ácidos carboxílicos e derivados | 2.0 | 2 |
| HMDB0012176 | 328,3206m/z | 7,26 | NEG | Ácidos carboxílicos e derivados | 2.0 | 2 |
| HMDB0006556 | 314,2329m/z | 3,92 | POS | Ácidos carboxílicos e derivados | 1.9 | 3 |
| HMDB0031876 | 312,2159m/z | 5,78 | POS | Ácidos graxos | 1.9 | 2 |
| HMDB0002421 | 300,2170m/z | 2,87 | NEG | Esteroides e derivados de esteroides | 1.8 | 2 |
| HMDB0002721 | 287,2100n | 3,85 | POS | Nucleosídeos de purina | 1.8 | 2 |
| HMDB0240254 | 316,2113m/z | 6,45 | POS | Compostos organooxigenados | 1.8 | 2 |

| | | | | | | |
|--------------|-------------|------|-----|---|-----|---|
| HMDB0004148 | 330,2277m/z | 6,88 | POS | Ácidos sulfúricos orgânicos e derivados | 1.8 | 3 |
| HMDB0002123 | 330,2987m/z | 8,56 | POS | Imidazopirimidinas | 1.8 | 2 |
| HMDB0003334 | 298,1155m/z | 9,21 | POS | Ácidos carboxílicos e derivados | 1.8 | 2 |
| HMDB0000017 | 304,2836m/z | 1,27 | POS | Piridinas e derivados | 1.7 | 2 |
| HMDB0012881 | 376,2681m/z | 6,64 | NEG | Peptidomiméticos | 1.7 | 2 |
| HMDB0011161 | 290,1607m/z | 8,74 | POS | Ácidos carboxílicos e derivados | 1.7 | 2 |
| HMDB0041278 | 244,1550m/z | 2,25 | NEG | Lípidios de prenol | 1.6 | 3 |
| HMDB0000289 | 232,1550m/z | 6,67 | NEG | Imidazopirimidinas | 1.6 | 2 |
| HMDB0000230 | 173,0812m/z | 7,61 | POS | Compostos organooxigenados | 1.6 | 2 |
| HMDB0000912 | 263,1128n | 8,45 | POS | Nucleosídeos de purina | 1.6 | 2 |
| HMDB0035028 | 267,1092m/z | 8,75 | POS | Ácidos graxos | 1.6 | 2 |
| HMDB0000001 | 167,0202m/z | 4,75 | POS | Ácidos carboxílicos e derivados | 1.5 | 2 |
| HMDB0013325 | 174,1240m/z | 4,97 | POS | Ácidos graxos | 1.5 | 2 |
| HMDB0061663 | 216,0331m/z | 5,65 | POS | Ácidos graxos | 1.5 | 2 |
| HMDB0241981 | 299,1239m/z | 5,72 | POS | Ácidos carboxílicos e derivados | 1.5 | 2 |
| HMDB0000830 | 161,0932m/z | 9 | POS | Ácidos graxos | 1.5 | 2 |
| HMDB0013130 | 274,0927m/z | 8,44 | POS | Ácidos graxos | 1.4 | 2 |
| LMFA07070074 | 228,1478n | 8,67 | POS | Ácidos graxos | 1.4 | 2 |
| LMSP01050005 | 276,1446m/z | 9,67 | POS | Esfingolípídios | 1.4 | 2 |

Conforme evidenciado na Figura 22, a abundância de sulfóxido de metionina no grupo DPCP foi superior em comparação com o grupo DPCN. O sulfóxido de metionina pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como alfa aminoácidos. Os níveis desse composto estão diretamente relacionados ao estado redox na célula ou tecido, geralmente são elevados sob condições de estresse oxidativo, envelhecimento, inflamação e doenças relacionadas ao estresse oxidativo (SUZUKI et al, 2016; MOSKOVITZ & SMITH, 2021). Pacientes com diabetes tipo 2 mostraram um aumento nos produtos avançados de glicação e nos resíduos de metionina sulfóxido, resultando em danos oxidativos aumentados na apolipoproteína B100 das LDL, que é uma classe de lipoproteína responsável pelo transporte de colesterol. Essa condição contribui para o aumento dos danos oxidativos, aterogenicidade e do risco de doenças cardiovasculares (RABBANI et al, 2010; LIM & LEVINE, 2019). Estudos observacionais identificaram elevação desse metabólito em pacientes com COVID-19, indicando que o sulfóxido de metionina tem o potencial de ser um marcador de gravidade clínica da doença (GU et al, 2020; THOMAS et al, 2020; BENNET et al, 2022). Em paralelo, algumas famílias virais desenvolveram proteases diméricas suscetíveis à oxidação reversível pela enzima metionina sulfóxido redutase, cuja função *in vivo* permanece incerta, mas que possivelmente regulam a atividade enzimática durante o estresse oxidativo,

protegendo o vírus contra danos oxidativos e atuando como sensores para condições favoráveis à replicação (DAVIS et al, 2021; DAVIS, et al, 2022.)

O grupo DPCN exibiu uma abundância significativamente maior de 3,9-Diidroxidecanoilcarnitina, uma acilcarnitinas de cadeia longa, em comparação com o grupo DPCP (Figura 22). O aumento na quantidade de acilcarnitinas no plasma sanguíneo tem sido vinculado ao avanço de várias condições médicas, como resistência à insulina, doenças cardiovasculares (MAKRECKA-KUKA et al., 2017). Algumas pesquisas sugerem que as concentrações plasmáticas de acilcarnitinas, especialmente aquelas de cadeia média e longa, podem servir como indicadores do padrão de metabolismo energético dentro das células e, portanto, podem ser utilizadas como marcadores de disfunção metabólica (MAKRECKA-KUKA et al., 2017). Alteração no metabolismo de acilcarnitinas também pode indicar assinaturas de disfunção mitocondrial e alteração no metabolismo de ácidos graxos, alguns estudos indicaram possíveis associações entre a redução sérica desses compostos a sequelas da infecção por coronavírus (GUNTUR et al, 2022; IWASAKI, & PUTRINO, 2023).

O grupo DPCP apresentou abundância maior de diidroceramida em comparação com o grupo DPCN (Figura 22). A diidroceramida é um esfingolípido pertencente à classe de compostos orgânicos conhecidos como amidas secundárias de ácido carboxílico. Há evidências crescentes que indicam que as diidroceramidas desempenham um papel importante na fisiopatologia da resistência à insulina e da esteatose hepática (CHOI et al, 2021; ZARINI et al, 2022; DENIMAL et al, 2023). Além disso, foi observado concentrações séricas elevadas em pacientes com diabetes tipo 2 (DENIMAL et al, 2023) Estudos recentes apontam que esse metabólito desempenha um papel direto em diversos processos relacionados ao diabetes, incluindo a resistência à insulina e formação de placas de ateroma (CHOI et al, 2021; ZARINI et al, 2022). Notavelmente, os níveis de diidroceramida no plasma sanguíneo estão elevados em pacientes com doença arterial coronariana e estão intimamente associados ao risco de problemas cardiovasculares (POSS et al, 2020; WITTENBECHER et al, 2022). Elevações na concentração desse esfingolípido também foram identificadas em pacientes graves de COVID-19 (TORRETTA et al, 2021).

Como indicado na Figura 22, o grupo DPCP apresentou uma abundância maior do que o grupo DPCN, do aminoácido Ornitina, um membro da classe de compostos conhecidos como L-alfa-aminoácidos. Sua produção é realizada pelo processo de catabolismo da arginina pela enzima

arginase. Foi observado uma elevação da atividade da arginase em pacientes com COVID-19, promovendo a produção de ornitina e seus subprodutos, contribuindo para a supressão do sistema imunológico e o desenvolvimento de doenças vasculares em pacientes infectados pela SARS-Cov-2 (DURANTE, 2022). Foi observado que a depleção da ornitina contribuir para a disfunção endotelial, a desregulação das células T e as alterações na hemostasia, fatores frequentemente observados na COVID-19 (REES et al, 2021; COBRE et al, 2022). Cinco metabólitos relacionados ao ciclo da ornitina (ornitina, N-acetilornitina, 3-amino-2-piperidona, ácido aspártico e asparagina) mostraram correlações positivas com várias citocinas e com a coagulação sanguínea em pacientes com COVID-19, particularmente em casos graves (DEL VALLE ET AL, 2020; LI et al, 2021).

O grupo DPCP apresentou abundância maior de Citosina em comparação com o grupo DPCN (Figura 22). A Citosina, também pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como pirimidinas, sendo é uma das quatro principais bases encontradas nos ácidos nucleicos. Concentrações anormais de bases de ácido nucleico no corpo de mamíferos podem indicar distúrbios metabólicos e/ou imunodeficiência, estando relacionadas a diversas doenças, como câncer, epilepsia e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (DI PIETRO et al, 2001; SEGURA-PACHECO et al, 2005; LIU et al, 2008; CEKAN & SIGURDSSON, 2009; DRAGUSHA et al 2014). A citosina na urina já é utilizada na atualidade como biomarcador no diagnóstico da síndrome da imunodeficiência metabólica, sendo detectada em níveis elevados em crianças com essa condição (MILLS et al, 1979; ZHAO et al, 2023). Estudo em modelo animal realizou a comparação dos perfis metabólicos urinários de camundongos após exposição aos estressores inflamatórios demonstrando elevação da excreção dessa base nitrogenada após indução inflamatória com lipopolissacarídeos bacterianos (LAIAKIS et al, 2012) Acumulam-se evidências que sugerem o potencial papel do lipopolissacarídeo bacteriano na super ativação da resposta imune durante a infecção por SARS-CoV-2. Esse componente interage diretamente com a proteína spike do SARS-CoV-2, intensificando as atividades pró-inflamatórias (PETRUK et al, 2020; PETRLOVA et al, 2022; SAMSUDIN et al, 2022).

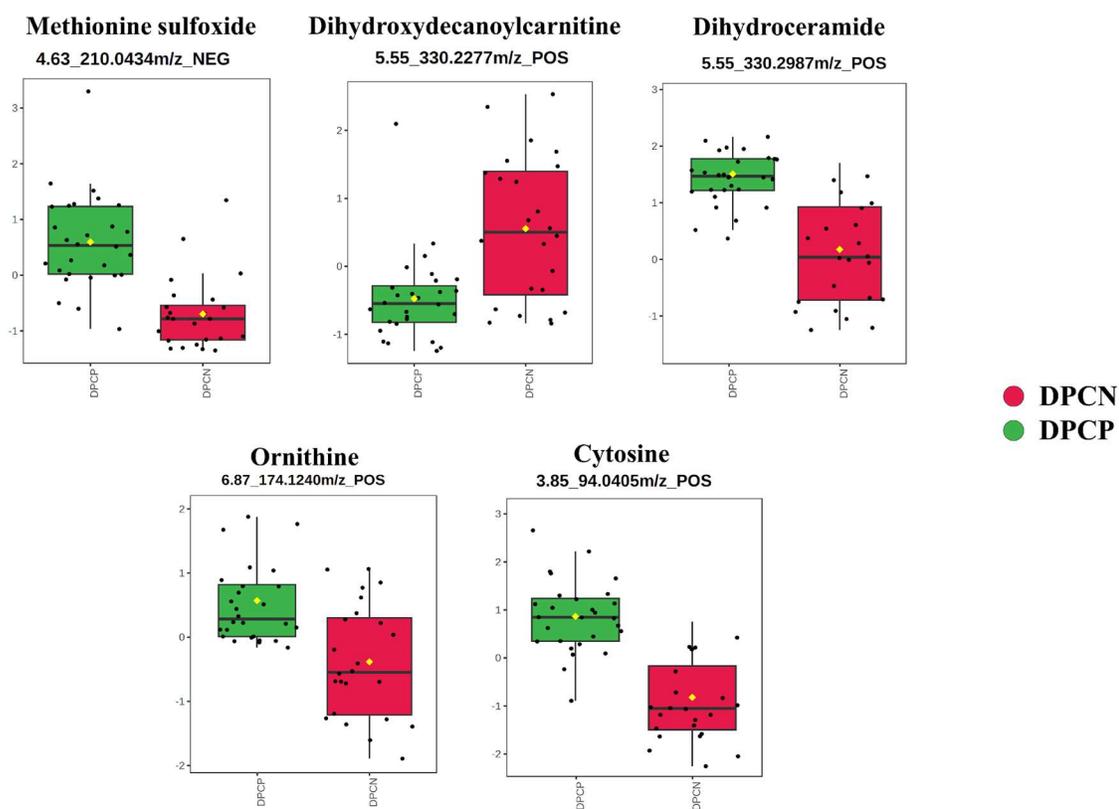


Figura 22 - Box plots da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos na urina dos grupos DPCN e DPCP. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

5.2.8. Alterações no metabolôma de acometidos por COVID-19 devido à presença de Diabetes

No intuito de comparar os grupos DPCP e DNCP, utilizamos as características selecionadas por meio da triagem conduzida com ANOVA ($p \leq 0,05$), resultando em um conjunto de 963 compostos que demonstraram relevância estatística na diferenciação entre esses grupos. Essas características foram, então, empregadas na formulação do modelo PLS-DA (Figura 23), apresentando um R^2 de 0.78 e um Q^2 de 0.48, por meio de suas duas principais componentes, o modelo conseguiu explicar 43,8% da variância total.

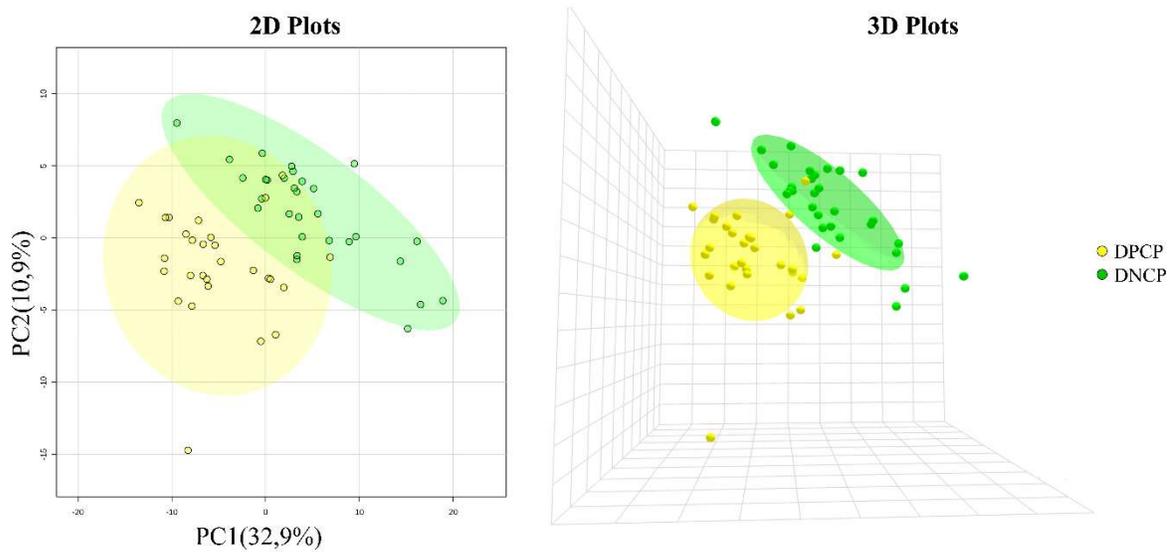


Figura 23 - Gráfico 2D e 3D escores da PLS-DA entre os grupos DPCP e DNCP. Gráfico de escores de componente 1 versus componente 2, descrevendo 43,8 % da variância total dos dados. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

Para investigar quais elementos desempenharam um papel relevante na distinção dos perfis metabólicos entre os grupos DPCP e DPCN, conduzimos uma avaliação dos VIP score dos compostos, selecionando criteriosamente aqueles com valores acima de 1. No conjunto, encontramos um total de 621 *features* que se enquadram nesse critério, e essas estão detalhadamente dispostas na Tabela 6 do anexo 5. Foi possível a identificação putativa de 197 metabólitos, dos quais, 183 foram oriundos de fontes exógenas (Figura 24).

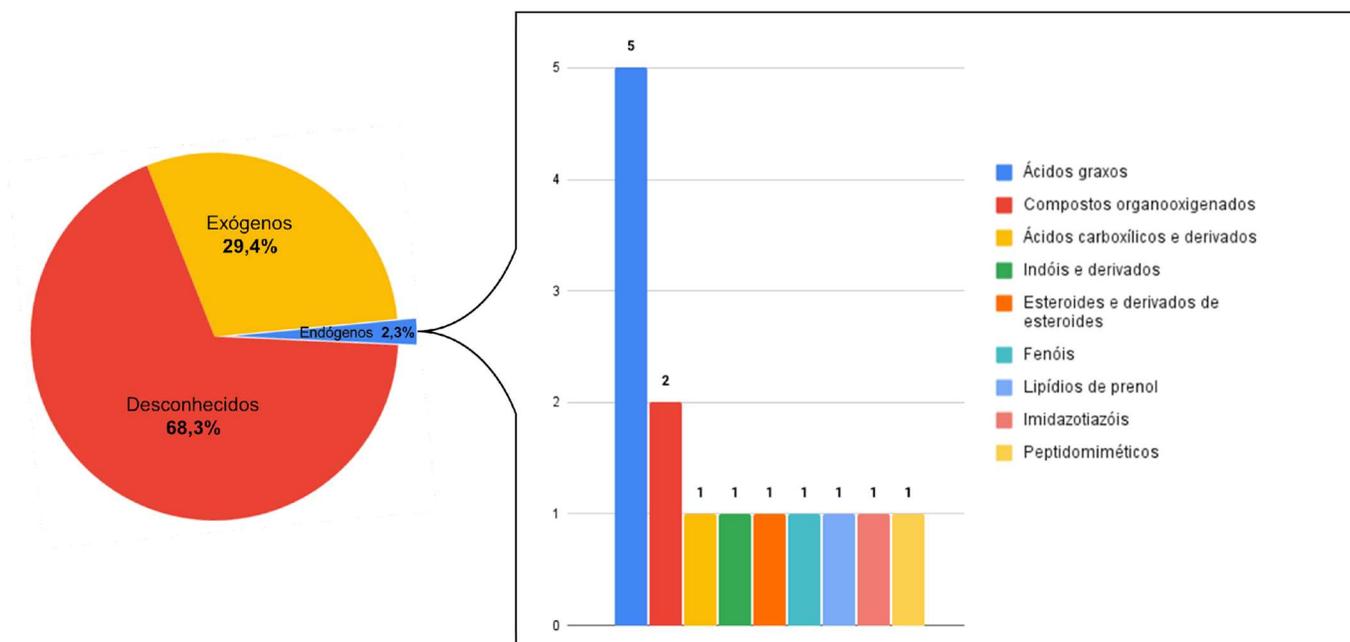


Figura 24 - Distribuição de metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DPCP e DNCP.
 FONTE: Autoria própria.

Em relação aos metabólitos endógenos, 14 foram identificados e estão detalhadamente descritos na Tabela 8. As classes mais frequentes foram os Ácidos graxos (35,7%), os Compostos organooxigenados (14,2%) e os Ácidos carboxílicos e derivados (7,1%) conforme mostrado na Figura 24.

TABELA 8. Metabólitos diferencialmente abundantes aos grupos DPCP e DNCP. Seleção dos metabólitos endógenos diferencialmente abundantes que mais impactaram a discriminação dos grupos, ranqueados por meio do VIP score.

| HMDB ID | Experimental m/z | Tempo de Retenção | Modo de Ionização | Classes | VIP score | Nível de confiança |
|--------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------|--------------------|
| HMDB0039493 | 288,1233m/z | 6,69 | POS | Ácidos graxos | 2.0 | 2 |
| HMDB0000929 | 222,1227m/z | 1,32 | POS | Indóis e derivados | 2.0 | 2 |
| HMDB0001490 | 185,0816m/z | 5,84 | POS | Fenóis | 2.0 | 2 |
| HMDB0011174 | 229,1549m/z | 7,39 | POS | Ácidos carboxílicos e derivados | 2.0 | 2 |
| HMDB0002302 | 253,0943m/z | 3,75 | POS | Indóis e derivados | 1.9 | 2 |
| HMDB0006699 | 707,2516n | 9,53 | POS | Compostos organooxigenados | 1.9 | 2 |
| HMDB0242110 | 592,4063m/z | 2,23 | POS | Esteroides e derivados de esteroides | 1.8 | 3 |
| HMDB0039242 | 721,4859m/z | 5,58 | POS | Lipídios de prenol | 1.4 | 2 |
| HMDB0041723 | 355,1016m/z | 6,81 | POS | Compostos organooxigenados | 1.3 | 2 |
| HMDB0062488 | 632,2960m/z | 6,74 | POS | Ácidos graxos | 1.3 | 2 |
| HMDB0012838 | 402,2599m/z | 7,49 | POS | Ácidos graxos | 1.2 | 2 |
| HMDB0000033 | 244,1410m/z | 8,54 | POS | Peptidomiméticos | 1.0 | 2 |
| LMFA01060003 | 85,0286m/z | 6,3 | POS | Ácidos graxos | 1.0 | 3 |

O grupo DPCP apresentou abundância maior de Ácido diidrowyerona (*Dihydroxyerone acid*) em comparação com o grupo DNCP (Figura 25). A infecção por SARS-CoV-2 foi constatada como capaz de induzir a formação e liberação direta de NETs em neutrófilos saudáveis, conforme demonstrado por Veras et al. em 2020. Além disso, a produção de NETs tem sido considerada como um possível indicador preditivo da gravidade e dos desfechos clínicos da COVID-19. (DIDANGELOS, 2020; JANIUK et al, 2020; DINIZ et al, 2021). A elevação desse metabólito no grupo DPCP (Figura 25) sugere, portanto, uma resposta inflamatória mais acentuada nesses indivíduos em comparação com o grupo DNCP.

Como indicado na Figura 25, o grupo DPCP apresentou uma abundância maior do que o grupo DNCP de Vanilglicol, um dos principais metabólitos oriundos do processo de degradação norepinefrina e da epinefrina, importantes neurotransmissores cruciais em processos fisiológicos, especialmente na resposta do sistema nervoso simpático e em vias neurológicas (KAMAL & LAPPIN, 2019). Esse composto também foi sugerido como um possível biomarcador sérico preditivos de pacientes que tiveram acidente vascular cerebral (KONG et al, 2022). A análise do líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes estágios de Alzheimer também indicou o vanilglicol tem grande variabilidade nas amostras com elevado grau de neurodegeneração (SJÖGREN et al, 1998; IBÁÑEZ et al, 2013).

Como indicado na Figura 25, o grupo DPCP apresentou uma abundância menor abundancia de Triptofano comparado ao grupo DNCP. Durante a infecção por coronavírus níveis elevados de citosina inflamatórias pode induzir a ativação dessa via, reduzindo a concentração sérica desse composto e elevando seus catabólitos como a quinurenina, ácido cinurênico, ácido quinolínico e ácido xanturênico (ALMULLA et al, 2022). O catabolismo do triptofano através da via metabólica da quinurenina é um dos mecanismos envolvidos na modulação da resposta imunológica (MOFFETT & NAMBOODIRI, 2003; FIORE & MURRAY, 2021). Em pacientes com COVID-19 estudos recentes sugerem que essa ativação dessa via possa levar à perda de massa óssea e muscular, causando danos musculoesqueléticos (VYAVAHARE et al, 2021).

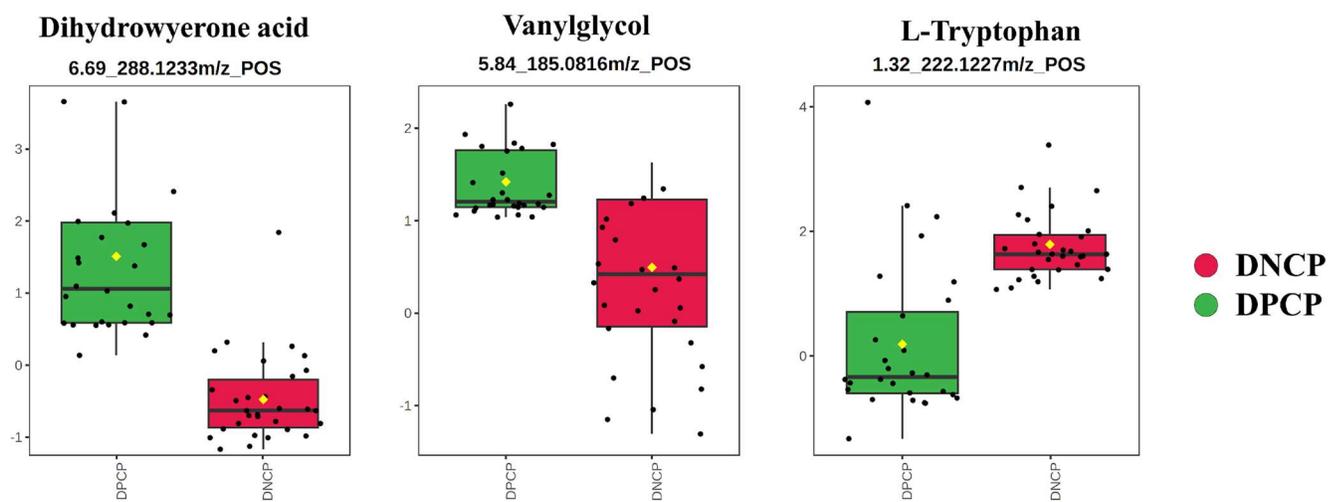


Figura 25 - Box plots da variação das intensidades normalizadas dos metabólitos na urina dos grupos DPCP e DNCP. FONTE: Autoria própria, utilizando a plataforma online Metaboanalyst 5.0.

6. CONCLUSÕES

Os métodos utilizados na abordagem *untargeted* demonstraram sensibilidade e precisão satisfatórias na detecção de metabólitos de diversas classes químicas, sejam endógenos ou exógenos. Juntamente com as estratégias estatísticas aplicadas, observou-se um potencial para diferenciar os grupos DNCN, DNCP, DPCP e DPCN. Além disso, muitos dos metabólitos essenciais para caracterizar esses grupos foram identificados. A literatura fornece uma quantidade maior de informações sobre aminoácidos e acilcarnitinas em comparação com outras classes de metabólitos, o que possibilitou uma análise mais detalhada das diferenças observadas entre os grupos.

Neste trabalho foi possível identificar que a Hipertensão Arterial Sistêmica foi a comorbidade mais frequente no conjunto amostral avaliado, sendo mais frequente no grupo DPCP, o que ilustra o cenário da pandemia onde pacientes cardíacos e diabéticos foram considerados grupos de risco para a infecção por COVID-19.

Em relação à plataforma analítica empregada, o preparo de amostras demonstrou-se simples e de fácil operacionalização. A plataforma instrumental respondeu satisfatoriamente aos objetivos propostos, com reprodutibilidade adequada, revelada pela análise das amostras de controle de qualidade. As análises estatísticas empregadas obtiveram métricas baixas para propósitos de classificação, no entanto, tais métricas são consideradas aceitáveis para discriminação entre os grupos. A comparação entre os grupos revelou que, entre os metabólitos diferenciais, a grande maioria não teve uma identificação sugerida, fato que está em acordo com a literatura, que acusa uma taxa de identificação de 20-30% dos metabólitos em estudos metabolômicos (DA SILVA et al, 2015). Ainda, entre os compostos identificados, observou-se a predominância majoritária de moléculas exógenas relacionadas à biotransformação de fármacos, principalmente antibióticos da classe dos beta-lactâmicos, anticoagulantes, anti-histamínico, anti-inflamatórios não esteroides e anti-hipertensivos. Entre os compostos endógenos observados, as principais classes químicas foram ácidos carboxílicos (aminoácidos), ácidos graxos e lipídios, fenóis, entre outros.

As alterações no metaboloma devido à infecção por COVID-19 manifestaram-se em 19 metabólitos endógenos identificados, entre os quais destacam-se a ácido diidrowyerona, carnitina 3,9-diidroxicodecanoíla, carnitina propionila, ácido mirístico, ácido N-acetilneuramínico. Em relação às alterações no metaboloma devido à diabetes, foram observadas alterações em 69

metabólitos endógenos identificados, entre os quais se destacam Acetoacetato de geranila, D-Prolina e L-Arginina. A comparação do metabolôma entre os diferentes grupos inflamados (COVID-19 ou diabetes), revelou alteração em 14 metabólitos endógenos identificados, entre os quais destacam-se o ácido diidrowyerona, vanilglicol, triptofano. As alterações no metabolôma diabético devido à infecção por COVID-19 revelaram 31 metabólitos endógenos identificados, dentre os quais destacam-se o sulfóxido de metionina, carnitina dihidroxidecanoíla, dihidroceramida, ornitina, citosina.

Em relação às limitações deste estudo, é importante mencionar que o tamanho da amostra foi relativamente pequeno, apesar do grande número de coletas realizadas. A medição dos níveis de glicose no momento da coleta poderia ter auxiliado na identificação de voluntários com glicemia descompensada. Além disso, a intervenção medicamentosa presente nos grupos de pacientes diabéticos e infectados por SARS-CoV-2 emergiu como uma das características distintivas dos grupos, o que pode mascarar ou suprimir alterações mais sutis em metabólitos endógenos.

Embora não tenha sido possível identificar vias metabólicas impactadas pela intersecção entre as enfermidades estudadas, o apontamento de moléculas interessantes como exemplo da ácido diidrowyerona, responsável por induzir a formação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos, pode auxiliar futuros estudos visando aprofundar o entendimento dos impactos de uma enfermidade sobre a outra. Novos estudos nessa perspectiva deveriam aprofundar na análise funcional dos metabólitos identificados para compreender melhor seus papéis biológicos e seus mecanismos fisiológicos subjacentes. Além disso, pretende-se analisar os dados obtidos para essas mesmas amostras pela metodologia direcionada (*targeted*), proporcionando a validação de alguns achados e uma compreensão mais ampla da variação e relevância dos metabólitos nos diferentes grupos. Por fim, a integração de técnicas metabolômicas com outras técnicas como a avaliação de citocinas inflamatórias e a caracterização através de outras ômicas, poderia fornecer uma visão holística das mudanças que ocorrem nessas condições de saúde. Essa possível abordagem multidisciplinar poderia abrir novas perspectivas para uma compreensão mais profunda das patologias associadas à diabetes e COVID-19, potencialmente contribuindo para abordagens terapêuticas mais eficazes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAIKE, T., SUGA, M., & MAEDA, H. **Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO.** Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v. 217, n. 1, p. 64-73, 1998.

ALMULLA, A. F., SUPASITTHUMRONG, T., TUNVIRACHAISAKUL, C., ALGON, A. A., AL-HAKEIM, H. K., & MAES, M. **The tryptophan catabolite or kynurenine pathway in COVID-19 and critical COVID-19: a systematic review and meta-analysis.** BMC Infectious Diseases, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2022.

AMES, B. N., CATHCART, R., SCHWIERS, E., & HOCHSTEIN, P. **Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 78, n. 11, p. 6858-6862, 1981.

ANISONG, N., SIRIPONGVUTIKORN, S., PUTTARAK, P., & WICHIENTHOT, S. **Fecal fermentation and gut microbiota modulation of dietary fibre and polyphenols from Gnetum gnemon Linn. leaves.** Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, v. 30, p. 100380, 2023.

ANSONE, L., BRIVIBA, M., SILAMIKELIS, I., TERENTJEVA, A., PERKONS, I., BIRZNIECE, L., & KLOVINS, J. **Amino acid metabolism is significantly altered at the time of admission in hospital for severe COVID-19 patients: findings from longitudinal targeted metabolomics analysis.** Microbiology spectrum, v. 9, n. 3, p. e00338-21, 2021.

ATLAS, D. International diabetes federation. **IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium:** International Diabetes Federation, 2019.

AYALA, T. S. **A hiperglicemia altera o perfil inflamatório e imunometabólico de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos.** 2019. 153f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

BAIGES-GAYA, G., IFTIMIE, S., CASTAÑÉ, H., RODRÍGUEZ-TOMÀS, E., JIMÉNEZ-FRANCO, A., LÓPEZ-AZCONA, A. F., & JOVEN, J. **Combining semi-targeted metabolomics and machine learning to identify metabolic alterations in the serum and urine of hospitalized patients with COVID-19.** Biomolecules, v. 13, n. 1, p. 163, 2023.

- BAJINKA, O., TAN, Y., DARBOE, A., IGHAEDE-EDWARDS, I. G., & ABDELHALIM, K. A. **The gut microbiota pathway mechanisms of diabetes**. *AMB Express*, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2023.
- BAKHSHANDEH, B., SORBONI, S. G., JAVANMARD, A. R., MOTTAGHI, S. S., MEHRABI, M. R., SOROURI, F., ... & JAHANAFROOZ, Z. **Variants in ACE2; potential influences on virus infection and COVID-19 severity**. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 90, p. 104773, 2021.
- BANIMFREG, B. H., SHAMAYLEH, A., ALSHRAIDEH, H., SEMREEN, M. H., & SOARES, N. C. **Untargeted approach to investigating the metabolomics profile of type 2 diabetes emiratis**. *Journal of Proteomics*, v. 269, p. 104718, 2022.
- BARANOVICOVA, E., BOBCAKOVA, A., VYSEHRADSKY, R., DANKOVA, Z., HALASOVA, E., NOSAL, V., & LEHOTSKY, J. **The ability to normalise energy metabolism in advanced COVID-19 disease seems to be one of the key factors determining the disease progression—a metabolomic NMR study on blood plasma**. *Applied Sciences*, v. 11, n. 9, p. 4231, 2021.
- BARRON, E., BAKHAI, C., KAR, P., WEAVER, A., BRADLEY, D., ISMAIL, KNIGHTON, P., HOLMAN, N., KHUNTI, K., WAREHAM, N. J., YOUNG, B. & VALABHJI, J. Associations of type 1 and type 2 diabetes with COVID-19-related mortality in England: a whole-population study. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 8, n. 10, p. 813-822, 2020.
- BEALE, D. J., SHAH, R., KARPE, A. V., HILLYER, K. E., MCAULEY, A. J., AU, G. G., & VASAN, S. S. **Metabolic profiling from an asymptomatic ferret model of SARS-CoV-2 infection**. *Metabolites*, v. 11, n. 5, p. 327, 2021.
- BEAUCHAMP, E., RIOUX, V., & LEGRAND, P. **New regulatory and signal functions for myristic acid**. *Medecine Sciences: M/S*, v. 25, n. 1, p. 57-63, 2009.
- BENNET, S., KAUFMANN, M., TAKAMI, K., SJAARDA, C., DOUCHANT, K., MOSLINGER, E., & SHETH, P. M. **Small-molecule metabolome identifies potential therapeutic targets against COVID-19**. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 10029, 2022.

BI, X., LIU, W., DING, X., LIANG, S., ZHENG, Y., ZHU, X., & GUO, T. **Proteomic and metabolomic profiling of urine uncovers immune responses in patients with COVID-19.** Cell reports, v. 38, n. 3, 2022.

BICKERTON, A. S. T., ROBERTS, R., FIELDING, B. A., TORNQVIST, H., BLAAK, E. E., WAGENMAKERS, A. J. M., & FRAYN, K. N. **Adipose tissue fatty acid metabolism in insulin-resistant men.** Diabetologia, v. 51, p. 1466-1474, 2008.

BOEHRINGER INGELHEIM . **What is type 2 diabetes and the Cardio–Renal–Metabolic system (CRM)?: The pathophysiology of type 2 diabetes**, 2022. Disponível em: <https://pro.boehringer-ingelheim.com/uk/diseases/type-2-diabetes/overview>. Acesso em: 30 jun. 2023.

BOESL, U. **Time-of-flight mass spectrometry: introduction to the basics.** Mass spectrometry reviews, v. 36, n. 1, p. 86-109, 2017.

BRASIL (São Paulo). Inst. BUTANTAN. **Cinco motivos que comprovam que a pandemia de Covid-19 ainda não acabou.** Disponível em: <https://bityli.com/HCsqrf>. Acesso em: 3 maio 2022.

BRUZZONE, C., BIZKARGUENAGA, M., GIL-REDONDO, R., DIERCKS, T., ARANA, E., DE VICUÑA, A. G., ... & MILLET, O. **SARS-CoV-2 infection dysregulates the metabolomic and lipidomic profiles of serum.** Iscience, v. 23, n. 10, 2020.

CAI, Y., KIM, D. J., TAKAHASHI, T., BROADHURST, D. I., YAN, H., MA, S., & JOHNSON, C. H. **Kynurenic acid may underlie sex-specific immune responses to COVID-19.** Science Signaling, v. 14, n. 690, p. eabf8483, 2021.

CALZADA, E., ONGUKA, O., & CLAYPOOL, S. M. **Phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease.** International review of cell and molecular biology, v. 321, p. 29-88, 2016.

CAMPOS, L. F., BARRETO, P. A., CENICCOLA, G. D., GONÇALVES, R. C., MATOS, L. B. N., ZAMBELLI, C. M. S. F., & CASTRO, M. G. **Parecer BRASPEN/AMIB para o enfrentamento do COVID-19 em pacientes hospitalizados.** BRASPEN J, v. 35, n. 1, p. 3-5, 2021.

- CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; DA CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. **Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas**. Química Nova, v. 41, p. 75-91, 2018.
- CEKAN, P., & SIGURDSSON, S. T. **Identification of single-base mismatches in duplex DNA by EPR spectroscopy**. Journal of the American Chemical Society, v. 131, n. 50, p. 18054-18056, 2009.
- CHACE, D. H., KALAS, T. A., & NAYLOR, E. W. **Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns**. Clinical chemistry, v. 49, n. 11, p. 1797-1817, 2003.
- CHANDRAPALAN, S., & ARASARADNAM, R. P. **Urine as a biological modality for colorectal cancer detection**. Expert review of molecular diagnostics, v. 20, n. 5, p. 489-496, 2020.
- CHANG, W., HATCH, G. M., WANG, Y., YU, F., & WANG, M. **The relationship between phospholipids and insulin resistance: From clinical to experimental studies**. Journal of cellular and molecular medicine, v. 23, n. 2, p. 702-710, 2019.
- CHEN, X., LUO, X., CHEN, D., YU, B., HE, J., & HUANG, Z. Arginine promotes porcine type I muscle fibres formation through improvement of mitochondrial biogenesis. British Journal of Nutrition, v. 123, n. 5, p. 499-507, 2020.
- CHEN, Y., WANG, N., DONG, X., ZHU, J., CHEN, Y., JIANG, Q., & FU, C. **Associations between serum amino acids and incident type 2 diabetes in Chinese rural adults**. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, v. 31, n. 8, p. 2416-2425, 2021.
- CHO, K., MOON, J. S., KANG, J. H., JANG, H. B., LEE, H. J., PARK, S. I., & CHO, J. Y. **Combined untargeted and targeted metabolomic profiling reveals urinary biomarkers for discriminating obese from normal-weight adolescents**. Pediatric obesity, v. 12, n. 2, p. 93-101, 2017.
- CHOI, R. H., TATUM, S. M., SYMONS, J. D., SUMMERS, S. A., & HOLLAND, W. L. **Ceramides and other sphingolipids as drivers of cardiovascular disease**. Nature reviews Cardiology, v. 18, n. 10, p. 701-711, 2021.

CHONG, J., WISHART, D. S., & XIA, J. **Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis**. *Current protocols in bioinformatics*, v. 68, n. 1, p. e86, 2019.

CHONG, J., WISHART, D. S., & XIA, J. **Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis**. *Current protocols in bioinformatics*, v. 68, n. 1, p. e86, 2019.

CHUNG, K. P., CHEN, G. Y., CHUANG, T. Y., HUANG, Y. T., CHANG, H. T., CHEN, Y. F., & YU, C. J. **Increased plasma acetylcarnitine in sepsis is associated with multiple organ dysfunction and mortality: a multicenter cohort study**. *Critical Care Medicine*, v. 47, n. 2, p. 210-218, 2019.

COBRE, A. F., SUREK, M., STREMEL, D. P., FACHI, M. M., BORBA, H. H. L., TONIN, F. S., & PONTAROLO, R. **Diagnosis and prognosis of COVID-19 employing analysis of patients' plasma and serum via LC-MS and machine learning**. *Computers in biology and medicine*, v. 146, p. 105659, 2022.

COCCHI, M., BIANCOLILLO, A., & MARINI, F. **Chemometric methods for classification and feature selection**. In: *Comprehensive analytical chemistry*. Elsevier, 2018. p. 265-299.

CORREIA, B. S., FERREIRA, V. G., PIAGGE, P. M., ALMEIDA, M. B., ASSUNÇÃO, N. A., RAIMUNDO, J. R., & CARDOSO, D. R. **¹H qNMR-based metabolomics discrimination of covid-19 severity**. *Journal of Proteome Research*, v. 21, n. 7, p. 1640-1653, 2022.

COSTA, J. A., DE OLIVEIRA LIMA, D., MOREIRA, I. P. M., SANTOS, B. S., BARROS, F. R., SILVA, T. R., & TAVEIRA, L. C. **Terapia nutricional para pacientes com Covid-19 em cuidados intensivos: Uma abordagem acerca de estudos retrospectivos**. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 5, p. e24810514861-e24810514861, 2021.

CRITCHLEY, J. A., CAREY, I. M., HARRIS, T., DEWILDE, S., HOSKING, F. J., & COOK, D. G. **Glycemic control and risk of infections among people with type 1 or type 2 diabetes in a large primary care cohort study**. *Diabetes care*, v. 41, n. 10, p. 2127-2135, 2018.

D'AMORA, P., SILVA, I. D. C., BUDIB, M. A., AYACHE, R., SILVA, R. M. S., SILVA, F. C., & NAGOURNEY, R. A. **Towards risk stratification and prediction of disease severity and**

mortality in COVID-19: Next generation metabolomics for the measurement of host response to COVID-19 infection. PLoS One, v. 16, n. 12, p. e0259909, 2021.

DA SILVA, R. R., DORRESTEIN, P. C., & QUINN, R. A. **Illuminating the dark matter in metabolomics.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 112, n. 41, p. 12549-12550, 2015

DAMBROVA, M., MAKRECKA-KUKA, M., KUKA, J., VILSKERSTS, R., NORDBERG, D., ATTWOOD, M. M., & SCHIÖTH, H. B. **Acylcarnitines: nomenclature, biomarkers, therapeutic potential, drug targets, and clinical trials.** Pharmacological Reviews, v. 74, n. 3, p. 506-551, 2022.

DAVIS, D. A., BULUT, H., SHRESTHA, P., MITSUYA, H., & YARCHOAN, R. **Regulation of Retroviral and SARS-CoV-2 Protease Dimerization and Activity through Reversible Oxidation.** Antioxidants, v. 11, n. 10, p. 2054, 2022.

DAVIS, D. A., BULUT, H., SHRESTHA, P., YAPARLA, A., JAEGER, H. K., HATTORI, S. I., & YARCHOAN, R. **Regulation of the dimerization and activity of SARS-CoV-2 main protease through reversible glutathionylation of cysteine 300.** Mbio, v. 12, n. 4, p. 10.1128/mbio.02094-21, 2021.

DEFRONZO, R. A., FERRANNINI, E., GROOP, L., HENRY, R. R., HERMAN, W. H., HOLST, J. J. & WEISS, R. Type 2 diabetes mellitus. Nature reviews Disease primers, v. 1, n. 1, p. 1-22, 2015.

DEL VALLE, D. M., KIM-SCHULZE, S., HUANG, H. H., BECKMANN, N. D., NIRENBERG, S., WANG, B., & GNJATIC, S. **An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival.** Nature medicine, v. 26, n. 10, p. 1636-1643, 2020.

DELAFIORI, J., NAVARRO, L. C., SICILIANO, R. F., DE MELO, G. C., BUSANELLO, E. N. B., NICOLAU, J. C., ... & CATHARINO, R. R. **Covid-19 automated diagnosis and risk assessment through metabolomics and machine learning.** Analytical Chemistry, v. 93, n. 4, p. 2471-2479, 2021.

DENIMAL, D., BERGAS, V., PAIS-DE-BARROS, J. P., SIMONEAU, I., DEMIZIEUX, L., PASSILLY-DEGRACE, P., & VERGÈS, B. **Liraglutide reduces plasma dihydroceramide levels in patients with type 2 diabetes.** Cardiovascular Diabetology, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2023.

- DETTMER, K., ARONOV, P. A., & HAMMOCK, B. D. **Mass spectrometry-based metabolomics**. *Mass spectrometry reviews*, v. 26, n. 1, p. 51-78, 2007.
- DEWULF, J. P., MARTIN, M., MARIE, S., OGUZ, F., BELKHIR, L., DE GREEF, J., & MORELLE, J. **Urine metabolomics links dysregulation of the tryptophan-kynurenine pathway to inflammation and severity of COVID-19**. *Scientific reports*, v. 12, n. 1, p. 9959, 2022.
- DEYN, P. P., D'HOOGHE, R., VAN BOGAERT, P. P., & MARESCAU, B. **Endogenous guanidino compounds as uremic neurotoxins**. *Kidney International*, v. 59, p. S77-S83, 2001.
- DI PIETRO, M. C., VANNONI, D., LEONCINI, R., LISO, G., GUERRANTI, R., & MARINELLO, E. **Determination of urinary methylated purine pattern by high-performance liquid chromatography**. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 751, n. 1, p. 87-92, 2001.
- DIDANGELOS, A. **COVID-19 hyperinflammation: what about neutrophils?**. *MSphere*, v. 5, n. 3, p. 10.1128/msphere.00367-20, 2020.
- DING, X., ZHANG, W., LI, S., & YANG, H. **The role of cholesterol metabolism in cancer**. *American journal of cancer research*, v. 9, n. 2, p. 219, 2019.
- DINIZ, L. F. A., MATSUBA, B. K., SOUZA, P. S. S., LOPES, B. R. P., KUBO, L. H., OLIVEIRA, J., & TOLEDO, K. A. **Effects of neutrophil extracellular traps during human respiratory syncytial virus infection in vitro**. *Brazilian Journal of Biology*, v. 83, 2021.
- DINIZ, M. E. R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. Orientador: Adão A. Sabino, 2011. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal De Minas Gerais. Instituto De Ciências Exatas Departamento De Química, 2011.
- DJOUMBOU FEUNANG, Y., EISNER, R., KNOX, C., CHEPELEV, L., HASTINGS, J., OWEN, G., & WISHART, D. S. **ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy**. *Journal of cheminformatics*, v. 8, p. 1-20, 2016.
- DRAGUSHA, S., SHIBATA, T., YIN, S., FUJITA, J. Y., KABASHIMA, T., & KAI, M. **Selective, sensitive and fluorometric determination of urinary cytosine with 4-**

trifluoromethylbenzamidoxime and N, N-dimethylformamide. *Clinica Chimica Acta*, v. 429, p. 123-128, 2014.

DURANTE, W. **Targeting arginine in COVID-19-induced immunopathology and vasculopathy.** *Metabolites*, v. 12, n. 3, p. 240, 2022.

EL-ANEED, A., COHEN, A., & BANOUB, J. **Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers.** *Applied spectroscopy reviews*, v. 44, n. 3, p. 210-230, 2009.

FERLITA, S., YEGIAZARYAN, A., NOORI, N., LAL, G., NGUYEN, T., TO, K., & VENKETARAMAN, V. **Type 2 diabetes mellitus and altered immune system leading to susceptibility to pathogens, especially Mycobacterium tuberculosis.** *Journal of clinical medicine*, v. 8, n. 12, p. 2219, 2019.

FILONENKO, V., & GOUT, I. **Discovery and functional characterisation of protein CoAlation and the antioxidant function of coenzyme A.** *BBA Advances*, p. 100075, 2023.

FIGLIORE, A., & MURRAY, P. J. **Tryptophan and indole metabolism in immune regulation.** *Current opinion in immunology*, v. 70, p. 7-14, 2021.

FRANCI, G., PALOMBA, L., FALANGA, A., ZANNELLA, C., D'ORIANO, V., RINALDI, L., & GALDIERO, M. **Influenza virus infections: clinical update, molecular biology, and therapeutic options.** In: *The microbiology of respiratory system infections*. Academic Press, 2016. p. 1-32.

FRASER, D. D., SLESSAREV, M., MARTIN, C. M., DALEY, M., PATEL, M. A., MILLER, M. R., ... & CEPINSKAS, G. **Metabolomics profiling of critically ill coronavirus disease 2019 patients: identification of diagnostic and prognostic biomarkers.** *Critical Care Explorations*, v. 2, n. 10, 2020.

FUDA, H., LEE, Y. C., SHIMIZU, C., JAVITT, N. B., & STROTT, C. A. **Mutational analysis of human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1 isoforms reveals that exon 1B of the SULT2B1 gene produces cholesterol sulfotransferase, whereas exon 1A yields pregnenolone sulfotransferase.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 39, p. 36161-36166, 2002.

FUNG, T. C., OLSON, C. A., & HSIAO, E. Y. **Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease.** *Nature neuroscience*, v. 20, n. 2, p. 145-155, 2017.

GARZA, K. Y., SILVA, A. A. R., ROSA, J. R., KEATING, M. F., POVILAITIS, S. C., SPRADLIN, M., ... & PORCARI, A. M. **Rapid Screening of COVID-19 Disease Directly from Clinical Nasopharyngeal Swabs using the MasSpec Pen Technology.** medRxiv, 2021.

GHOSN, J., PIROTH, L., EPAULARD, O., LE TURNIER, P., MENTRÉ, F., BACHELET, D., & LAOUÉANAN, C. **Persistent COVID-19 symptoms are highly prevalent 6 months after hospitalization: results from a large prospective cohort.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 27, n. 7, p. 1041. e1-1041. e4, 2021.

GIERA, M., SPILKER, M. E., & SIUZDAK, G. **Metabolomics: The Superglue of Omics. Fields and Applications:** *Metabolomics & Lipidomics*, v. 2, 2018.

GLISH, G. L., & VACHET, R. W. **The basics of mass spectrometry in the twenty-first century.** *Nature reviews drug discovery*, v. 2, n. 2, p. 140-150, 2003.

GONZALEZ C.V., MARTÍNEZ, E.M., & DEL BOSQUE-PLATA, L. **The potential of metabolomics in biomedical applications.** *Metabolites*, v. 12, n. 2, p. 194, 2022.

GOODACRE, R., BROADHURST, D., SMILDE, A. K., KRISTAL, B. S., BAKER, J. D., BEGER, R., & WULFERT, F. **Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics.** *Metabolomics*, v. 3, p. 231-241, 2007.

GOUVEIA, D., GRENGA, L., GAILLARD, J. C., GALLAIS, F., BELLANGER, L., PIBLE, O., & ARMENGAUD, J. **Shortlisting SARS-CoV-2 peptides for targeted studies from experimental data-dependent acquisition tandem mass spectrometry data.** *Proteomics*, v. 20, n. 14, p. 2000107, 2020.

GU, X., AL DUBAYEE, M., ALSHAHRANI, A., MASOOD, A., BENABDELKAMEL, H., ZAHRA, M., & ALJADA, A. **Distinctive metabolomics patterns associated with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus.** *Frontiers in molecular biosciences*, v. 7, p. 609806, 2020.

GUNTUR, V. P., NEMKOV, T., DE BOER, E., MOHNING, M. P., BARAGHOSHI, D., CENDALI, F. I., & D'ALESSANDRO, A. **Signatures of mitochondrial dysfunction and impaired fatty acid metabolism in plasma of patients with post-acute sequelae of COVID-19 (PASC).** *Metabolites*, v. 12, n. 11, p. 1026, 2022.

- GUNTUR, V. P., NEMKOV, T., DE BOER, E., MOHNING, M. P., BARAGHOSHI, D., CENDALI, F. I., & D'ALESSANDRO, A. **Signatures of mitochondrial dysfunction and impaired fatty acid metabolism in plasma of patients with post-acute sequelae of COVID-19 (PASC).** *Metabolites*, v. 12, n. 11, p. 1026, 2022.
- GUO, W., LI, M., DONG, Y., ZHOU, H., ZHANG, Z., TIAN, C., & HU, D. **Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19.** *Diabetes/metabolism research and reviews*, v. 36, n. 7, p. e3319, 2020.
- GUPTA, R., HUSSAIN, A., & MISRA, A. **Diabetes and COVID-19: evidence, current status and unanswered research questions.** *European journal of clinical nutrition*, v. 74, n. 6, p. 864-870, 2020.
- GVOZDJAKOVA, A., KLAUCO, F., KUCHARSKA, J., & SUMBALOVA, Z. **Is mitochondrial bioenergetics and coenzyme Q10 the target of a virus causing COVID-19?** *Bratislavske lekarske listy*, v. 121, n. 11, p. 775-778, 2020.
- HAFNER, P., BONATI, U., ERNE, B., SCHMID, M., RUBINO, D., POHLMAN, U., & FISCHER, D. Improved muscle function in Duchenne muscular dystrophy through L-arginine and metformin: an investigator-initiated, open-label, single-center, proof-of-concept-study. *PLoS one*, v. 11, n. 1, p. e0147634, 2016.
- HALL, J. **Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica.** Elsevier Health Sciences, 2021.
- HAO, Y., ZHANG, Z., FENG, G., CHEN, M., WAN, Q., LIN, J., & CHEN, S. Distinct lipid metabolic dysregulation in asymptomatic COVID-19. *Iscience*, v. 24, n. 9, 2021.
- HASAN, M. R., SULEIMAN, M., & PEREZ-LOPEZ, A. Metabolomics in the Diagnosis and Prognosis of COVID-19. *Frontiers in Genetics*, v. 12, p. 721556, 2021.
- HE, X., LAU, E. H., WU, P., DENG, X., WANG, J., HAO, X., & LEUNG, G. M. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature medicine*, v. 26, n. 5, p. 672-675, 2020.
- HENEGHAN, C., BRASSEY, J., & JEFFERSON, T. **SARS-CoV-2 viral load and the severity of COVID-19.** 2020.

- HOFFMANN, E., & STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. John Wiley & Sons, 2007.
- HU, F., GUO, Y., LIN, J., ZENG, Y., WANG, J., LI, M., & CONG, L. **Association of serum uric acid levels with COVID-19 severity**. *BMC Endocrine Disorders*, v. 21, n. 1, p. 97, 2021.
- HUANG, C. Y., YAO, W. F., WU, W. G., LU, Y. L., WAN, H., & WANG, W. **Endogenous CSE/H2S system mediates TNF- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes**. *Cell biochemistry and function*, v. 31, n. 6, p. 468-475, 2013.
- HUMES, S. T., IOVINE, N., PRINS, C., GARRETT, T. J., LEDNICKY, J. A., COKER, E. S., & SABO-ATTWOOD, T. **Association between lipid profiles and viral respiratory infections in human sputum samples**. *Respiratory Research*, v. 23, n. 1, p. 1-13, 2022.
- HUNG, I. F., LAU, S. K., WOO, P. C., & YUEN, K. Y. **Viral loads in clinical specimens and SARS manifestations**. *Hong Kong Med J*, v. 15, n. Suppl 9, p. 20-22, 2009.
- IBÁÑEZ, C., SIMÓ, C., BARUPAL, D. K., FIEHN, O., KIVIPELTO, M., CEDAZO-MÍNGUEZ, A., & CIFUENTES, A. **A new metabolomic workflow for early detection of Alzheimer's disease**. *Journal of Chromatography A*, v. 1302, p. 65-71, 2013.
- ISER, B. P. M., SLIVA, I., RAYMUNDO, V. T., POLETO, M. B., SCHUELTER-TREVISOL, F., & BOBINSKI, F. **Definição de caso suspeito da COVID-19: uma revisão narrativa dos sinais e sintomas mais frequentes entre os casos confirmados**. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 29, p. e2020233, 2020.
- IWASAKI, A., & PUTRINO, D. **Why we need a deeper understanding of the pathophysiology of long COVID**. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 23, n. 4, p. 393-395, 2023.
- JANIUK, K., JABŁOŃSKA, E., & GARLEY, M. **Significance of NETs formation in COVID-19**. *Cells*, v. 10, n. 1, p. 151, 2021.
- JOHNSON, C. H., IVANISEVIC, J., & SIUZDAK, G. **Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms**. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 17, n. 7, p. 451-459, 2016.
- JOHNSON, R. J. **Why focus on uric acid?**. *Current medical research and opinion*, v. 31, n. sup2, p. 3-7, 2015.

- KAMAL, S., & LAPPIN, S. L. **Biochemistry, Catecholamine Degradation**. Annual review of biochemistry, 40(1), 465-500. 2019.
- KAMPF, G., VOSS, A., & SCHEITHAUER, S. **Inactivation of coronaviruses by heat**. Journal of hospital infection, v. 105, n. 2, p. 348-349, 2020.
- KATSAROU, A., GUDBJÖRNSDOTTIR, S., RAWSHANI, A., DABELEA, D., BONIFACIO, E., ANDERSON, B. J., & LERNMARK, A. **Type 1 diabetes mellitus**. Nature reviews Disease primers, v. 3, n. 1, p. 1-17, 2017.
- KATSIKI, N., & ATHYROS, V. **Serum uric acid: a mediator of cardio-reno-metabolic diseases**. Expert Review of Cardiovascular Therapy, v. 19, n. 12, p. 1127-1128, 2021.
- KAUPPI, A. M., EDIN, A., ZIEGLER, I., MÖLLING, P., SJÖSTEDT, A., GYLFE, Å., & JOHANSSON, A. **Metabolites in blood for prediction of bacteremic sepsis in the emergency room**. PloS one, v. 11, n. 1, p. e0147670, 2016.
- KHAMIS, M. M., ADAMKO, D. J., & EL-ANEED, A. **Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery**. Mass spectrometry reviews, v. 36, n. 2, p. 115-134, 2017.
- KIM, M., KIM, M., HAN, J. Y., LEE, S. H., JEE, S. H., & LEE, J. H. **The metabolites in peripheral blood mononuclear cells showed greater differences between patients with impaired fasting glucose or type 2 diabetes and healthy controls than those in plasma**. Diabetes and Vascular Disease Research, v. 14, n. 2, p. 130-138, 2017.
- KOLB, A. F., HEGYI, A., & SIDDELL, S. G. **Identification of residues critical for the human coronavirus 229E receptor function of human aminopeptidase N**. Journal of General Virology, v. 78, n. 11, p. 2795-2802, 1997.
- KONG, Y., FENG, Y. Q., LU, Y. T., FENG, S. S., HUANG, Z., WANG, Q. Y., & GUO, Y. **Predictive serum biomarkers of patients with cerebral infarction**. Neurological Research, v. 44, n. 4, p. 331-341, 2022.
- KUCHIPUDI, S. V., NELLI, R. K., GONTU, A., SATYAKUMAR, R., SURENDRAN NAIR, M., & SUBBIAH, M. **Sialic acid receptors: the key to solving the enigma of zoonotic virus spillover**. Viruses, v. 13, n. 2, p. 262, 2021.

- LA MARCA, G. **Mass spectrometry in clinical chemistry: the case of newborn screening.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 101, p. 174-182, 2014.
- LAIAKIS, E. C., HYDUKE, D. R., & FORNACE JR, A. J. **Comparison of mouse urinary metabolic profiles after exposure to the inflammatory stressors γ radiation and lipopolysaccharide.** Radiation research, v. 177, n. 2, p. 187-199, 2012.
- LANÇAS, F. **Espectrometria de massas: fundamentos, instrumentação e aplicações.** Campinas, SP: Editora Átomo. ISBN 978-8576703051, 2019.
- LANGLEY, R. J., TSALIK, E. L., VELKINBURGH, J. C. V., GLICKMAN, S. W., RICE, B. J., WANG, C., & KINGSMORE, S. F. **An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death in sepsis.** Science translational medicine, v. 5, n. 195, p. 195ra95-195ra95, 2013.
- LAZARI, L. C., GHILARDI, F. D. R., ROSA-FERNANDES, L., ASSIS, D. M., NICOLAU, J. C., SANTIAGO, V. F. & PALMISANO, G. **Prognostic accuracy of MALDI-TOF mass spectrometric analysis of plasma in COVID-19.** Life Science Alliance, v. 4, n. 8, 2021.
- LEE, L. C., LIONG, C. Y., & JEMAIN, A. A. **Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps.** Analyst, v. 143, n. 15, p. 3526-3539, 2018.
- LEE, M., CHO, Y., LEE, Y. H., KANG, E. S., CHA, B. S., & LEE, B. W. **β -hydroxybutyrate as a biomarker of β -cell function in new-onset type 2 diabetes and its association with treatment response at 6 months.** Diabetes & Metabolism, v. 49, n. 4, p. 101427, 2023.
- LEIGH, R., & PROUD, D. **Virus-induced modulation of lower airway diseases: pathogenesis and pharmacologic approaches to treatment.** Pharmacology & therapeutics, v. 148, p. 185-198, 2015.
- LEONARDI, R., & JACKOWSKI, S. **Biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A.** EcoSal Plus, v. 2, n. 2, 2007.
- LI, T., NING, N., LI, B., LUO, D., QIN, E., YU, W., & WANG, H. **Longitudinal metabolomics reveals ornithine cycle dysregulation correlates with inflammation and coagulation in COVID-19 severe patients.** Frontiers in Microbiology, v. 12, p. 723818, 2021.

- LI, W. **Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays.** Journal of bioinformatics and computational biology, v. 10, n. 06, p. 1231003, 2012.
- LIEPINSH, E., MAKRECKA-KUKA, M., MAKAROVA, E., VOLSKA, K., VILKS, K., SEVOSTJANOVŠ, E., & DAMBROVA, M. **Acute and long-term administration of palmitoylcarnitine induces muscle-specific insulin resistance in mice.** BioFactors, v. 43, n. 5, p. 718-730, 2017.
- LIM, J. M., KIM, G., & LEVINE, R. L. **Methionine in proteins: it's not just for protein initiation anymore.** Neurochemical research, v. 44, p. 247-257, 2019.
- LIPPI, G., SIMUNDIC, A. M., & PLEBANI, M. **Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19).** Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), v. 58, n. 7, p. 1070-1076, 2020.
- LIU, L., OUYANG, J., & BAEYENS, W. R. **Separation of purine and pyrimidine bases by ion chromatography with direct conductivity detection.** Journal of Chromatography A, v. 1193, n. 1-2, p. 104-108, 2008.
- LLACUNA, L., & MACH, N. **Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer.** Revista Española de Nutrición Humana y Dietética, v. 16, n. 1, p. 16-24, 2012.
- LUNDSTEDT, T., SEIFERT, E., ABRAMO, L., THELIN, B., NYSTRÖM, Å., PETTERSEN, J., & BERGMAN, R. **Experimental design and optimization. Chemometrics and intelligent laboratory systems,** v. 42, n. 1-2, p. 3-40, 1998.
- LYNCH, C. J., & ADAMS, S. H. **Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance.** Nature Reviews Endocrinology, v. 10, n. 12, p. 723-736, 2014.
- MADDALONI, E., & BUZZETTI, R. **Covid-19 and diabetes mellitus: unveiling the interaction of two pandemics.** Diabetes/metabolism research and reviews, v. 36, n. 7, p. e33213321, 2020.
- MAKRECKA, M., KUKA, J., VOLSKA, K., ANTONE, U., SEVOSTJANOVŠ, E., CIRULE, H., & LIEPINSH, E. **Long-chain acylcarnitine content determines the pattern of energy metabolism in cardiac mitochondria.** Molecular and cellular biochemistry, v. 395, p. 1-10, 2014.

- MAKRECKA-KUKA, M., SEVOSTJANOV, E., VILKS, K., VOLSKA, K., ANTONE, U., KUKA, J., & LIEPINSH, E. **Plasma acylcarnitine concentrations reflect the acylcarnitine profile in cardiac tissues.** *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 17528, 2017.
- MALANDRINO, M. I., FUCHO, R., WEBER, M., CALDERON-DOMINGUEZ, M., MIR, J. F., VALCARCEL, L., & HERRERO, L. **Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 308, n. 9, p. E756-E769, 2015.
- MATSUYAMA, T., YOSHINAGA, S. K., SHIBUE, K., & MAK, T. W. **Comorbidity-associated glutamine deficiency is a predisposition to severe COVID-19.** *Cell Death & Differentiation*, v. 28, n. 12, p. 3199-3213, 2021.
- MCCANN, M. R., GEORGE DE LA ROSA, M. V., ROSANIA, G. R., & STRINGER, K. A. **L-carnitine and acylcarnitines: mitochondrial biomarkers for precision medicine.** *Metabolites*, v. 11, n. 1, p. 51, 2021.
- MCCOIN, C. S., KNOTTS, T. A., & ADAMS, S. H. **Acylcarnitines—old actors auditioning for new roles in metabolic physiology.** *Nature Reviews Endocrinology*, v. 11, n. 10, p. 617-625, 2015.
- MCCULLOUGH, P. A., KELLY, R. J., RUOCCO, G., LERMA, E., TUMLIN, J., WHEELAN, K. R., ... & RISCH, H. A. **Pathophysiological basis and rationale for early outpatient treatment of SARS-CoV-2 (COVID-19) infection.** *The American journal of medicine*, v. 134, n. 1, p. 16-22, 2021.
- MIERZIAK, J., BURGBERGER, M., & WOJTASIK, W. **3-hydroxybutyrate as a metabolite and a signal molecule regulating processes of living organisms.** *Biomolecules*, v. 11, n. 3, p. 402, 2021.
- MILANETTI, E., MIOTTO, M., DI RIENZO, L., NAGARAJ, M., MONTI, M., GOLBEK, T. W., & RUOCCO, G. **In-silico evidence for a two receptor based strategy of SARS-CoV-2.** *Frontiers in molecular biosciences*, v. 8, p. 690655, 2021.
- MILLS, G. C., SCHMALSTIEG, F. C., NEWKIRK, K. E., & GOLDBLUM, R. M. **Cytosine and orotic acid in urine of immunodeficient children.** *Clinical chemistry*, v. 25, n. 3, p. 419-424, 1979.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública. Especial: doença pelo coronavírus 2019. Bol Epidemiol 07, 2020.

MOFFETT, J. R., & NAMBOODIRI, M. A. **Tryptophan and the immune response**. Immunology and cell biology, v. 81, n. 4, p. 247-265, 2003.

MORNIROLI, D., GIANNÌ, M. L., CONSALES, A., PIETRASANTA, C., & MOSCA, F. **Human sialome and coronavirus disease-2019 (COVID-19) pandemic: an understated correlation?**. Frontiers in immunology, v. 11, p. 1480, 2020.

MOSKOVITZ, J., & SMITH, A. **Methionine sulfoxide and the methionine sulfoxide reductase system as modulators of signal transduction pathways: a review**. Amino Acids, v. 53, n. 7, p. 1011-1020, 2021.

MOURA, A. V., DE OLIVEIRA, D. C., SILVA, A. A. R., DA ROSA, J. R., GARCIA, P. H. D., SANCHES, P. H. G., & PORCARI, A. M. **Urine Metabolites Enable Fast Detection of COVID-19 Using Mass Spectrometry**. Metabolites, v. 12, n. 11, p. 1056, 2022.

NACHTIGALL, F. M., PEREIRA, A., TROFYMCHUK, O. S., & SANTOS, L. S. Author Correction: **Detection of SARS-CoV-2 in nasal swabs using MALDI-MS**. Nature Biotechnology, p. 1, 2020.

NERY, R. A., KAHLOW, B. S., SKARE, T. L., & TABUSHI, F. I. **Uric acid and tissue repair**. ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo), v. 28, p. 290-292, 2015.

NIDDK. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. **Your Kidneys & How They Work**. 2018. Disponível em: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/kidney-disease/kidneys-how-they-work>. Acesso em: 17 ago. 2023.

NIE, Q., XING, M., CHEN, H., HU, J., & NIE, S. **Metabolomics and lipidomics profiling reveals hypocholesterolemic and hypolipidemic effects of arabinoxylan on type 2 diabetic rats**. Journal of agricultural and food chemistry, v. 67, n. 38, p. 10614-10623, 2019.

NISOLI, E., FALCONE, S., TONELLO, C., COZZI, V., PALOMBA, L., FIORANI, M., & CLEMENTI, E. **Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 101, n. 47, p. 16507-16512, 2004.

NIZIOŁ, J., OSSOLIŃSKI, K., PŁAZA-ALTAMER, A., KOŁODZIEJ, A., OSSOLIŃSKA, A., OSSOLIŃSKI, T., & RUMAN, T. **Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry**. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 9802, 2023.

NYAMBUYA, T. M., DLUDLA, P. V., MXINWA, V., & NKAMBULE, B. B. **T-cell activation and cardiovascular risk in adults with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis**. *Clinical Immunology*, v. 210, p. 108313, 2020.

OLIVEIRA, J. E. P., & VENCIO, S. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020*. São Paulo: AC Farmacêutica, 2019.

PÁEZ-FRANCO, J. C., MARAVILLAS-MONTERO, J. L., MEJÍA-DOMÍNGUEZ, N. R., TORRES-RUIZ, J., TAMEZ-TORRES, K. M., PÉREZ-FRAGOSO, A., & ULLOA-AGUIRRE, A. **Metabolomics analysis identifies glutamic acid and cystine imbalances in COVID-19 patients without comorbid conditions**. Implications on redox homeostasis and COVID-19 pathophysiology. *Plos one*, v. 17, n. 9, p. e0274910, 2022.

PALLOTTI, F., BERGAMINI, C., LAMPERTI, C., & FATO, R. **The roles of coenzyme Q in disease: direct and indirect involvement in cellular functions**. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 1, p. 128, 2021.

PEREZ-RUIZ, F., ANIEL-QUIROGA, M. A., HERRERO-BEITES, A. M., CHINCHILLA, S. P., ERAUSKIN, G. G., & MERRIMAN, T. **Renal clearance of uric acid is linked to insulin resistance and lower excretion of sodium in gout patients**. *Rheumatology international*, v. 35, p. 1519-1524, 2015.

PETRLOVA, J., SAMSUDIN, F., BOND, P. J., & SCHMIDTCHEN, A. **SARS-CoV-2 spike protein aggregation is triggered by bacterial lipopolysaccharide**. *Febs Letters*, v. 596, n. 19, p. 2566-2575, 2022.

PETRUK, G., PUTHIA, M., PETRLOVA, J., SAMSUDIN, F., STRÖMDAHL, A. C., CERPS, S., & SCHMIDTCHEN, A. A. **SARS-CoV-2 spike protein binds to bacterial lipopolysaccharide and boosts proinflammatory activity**. *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 12, n. 12, p. 916-932, 2020.

- PIETROCOLA, F., GALLUZZI, L., BRAVO-SAN PEDRO, J. M., MADEO, F., & KROEMER, G. **Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger**. *Cell metabolism*, v. 21, n. 6, p. 805-821, 2015.
- PITITTO, B., DIAS, M., MOURA, F., LAMOUNIER, R., CALLIARI, S., & BERTOLUCI, M. **Metas no tratamento do diabetes**. *Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes*, v. 2022, p. 1-23, 2022.
- PLUMB, R. S., GETHINGS, L. A., RAINVILLE, P. D., ISAAC, G., TRENGOVE, R., KING, A. M., & WILSON, I. D. **Advances in high throughput LC/MS based metabolomics: A review**. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, p. 116954, 2023.
- POSS, A. M., MASCHEK, J. A., COX, J. E., HAUNER, B. J., HOPKINS, P. N., HUNT, S. C., & PLAYDON, M. C. **Machine learning reveals serum sphingolipids as cholesterol-independent biomarkers of coronary artery disease**. *The Journal of clinical investigation*, v. 130, n. 3, p. 1363-1376, 2020.
- PUSKARICH, M. A., EVANS, C. R., KARNOVSKY, A., DAS, A. K., JONES, A. E., & STRINGER, K. A. **Septic Shock Non-Survivors Have Persistently Elevated Acylcarnitines Following Carnitine Supplementation**. *Shock*, v. 49, n. 4, p. 412, 2018.
- RABBANI, N., CHITTARI, M. V., BODMER, C. W., ZEHNDER, D., CERIELLO, A., & THORNALLEY, P. J. **Increased glycation and oxidative damage to apolipoprotein B100 of LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes and effect of metformin**. *Diabetes*, v. 59, n. 4, p. 1038-1045, 2010.
- REES, C. A., ROSTAD, C. A., MANTUS, G., ANDERSON, E. J., CHAHROUDI, A., JAGGI, P., & MORRIS, C. R. **Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, n. 25, p. e2101708118, 2021.
- ROJAS-MORALES, P., TAPIA, E., & PEDRAZA-CHAVERRI, J. **β -Hydroxybutyrate: A signaling metabolite in starvation response?** *Cellular signalling*, v. 28, n. 8, p. 917-923, 2016.
- SAMPEDRO, A., RODRIGUEZ-GRANGER, J., CEBALLOS, J., & ALIAGA, L. **Pantothenic acid: an overview focused on medical aspects**. *European Scientific Journal*, v. 11, n. 21, 2015.
- SAMPRATHI, M., & JAYASHREE, M. **Biomarkers in COVID-19: an up-to-date review**. *Front Pediatr*. 2021; 8: 607647. 2020.

SAMSUDIN, F., RAGHUVAMSI, P., PETRUK, G., PUTHIA, M., PETRLOVA, J., MACARY, P., & SCHMIDTCHEN, A. **SARS-CoV-2 spike protein as a bacterial lipopolysaccharide delivery system in an overzealous inflammatory cascade.** *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 14, n. 9, p. mjac058, 2022.

SANDS, J. M., & LAYTON, H. E. **Advances in understanding the urine-concentrating mechanism.** *Annual review of physiology*, v. 76, p. 387-409, 2014.

SBD, Diabetes. **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes.** Diretrizes SBD, 2023.

Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/editorial/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SBODIO, J. I., SNYDER, S. H., & PAUL, B. D. **Regulators of the transsulfuration pathway.** *British journal of pharmacology*, v. 176, n. 4, p. 583-593, 2019.

SCHAUER, R., & KAMERLING, J. P. **Exploration of the sialic acid world.** *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, v. 75, p. 1-213, 2018.

SCHEPERS, E., BARRETO, D. V., LIABEU, S., GLORIEUX, G., ELOOT, S., BARRETO, F. C., & EUROPEAN UREMIC TOXIN WORK GROUP (EUTOX). (2011). **Symmetric dimethylarginine as a proinflammatory agent in chronic kidney disease.** *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 6, n. 10, p. 2374-2383, 2011.

SCHOONEMAN, M. G., VAZ, F. M., HOUTEN, S. M., & SOETERS, M. R. **Acylcarnitines: reflecting or inflicting insulin resistance?.** *Diabetes*, v. 62, n. 1, p. 1-8, 2013.

SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B., KOOI, M. E., HESSELINK, M. K. C., JENESON, J. A. L., BACKES, W. H., VAN ECHELD, C. J. A., & SCHRAUWEN, P. **Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects.** *Diabetologia*, v. 50, p. 113-120, 2007.

SCHRIMPE-RUTLEDGE, A. C., CODREANU, S. G., SHERROD, S. D., & MCLEAN, J. A. **Untargeted metabolomics strategies—challenges and emerging directions.** *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 27, n. 12, p. 1897-1905, 2016.

SCHWARZ, B., SHARMA, L., ROBERTS, L., PENG, X., BERMEJO, S., LEIGHTON, I., & YALE. **Cutting edge: Severe SARS-CoV-2 infection in humans is defined by a shift in the serum lipidome, resulting in dysregulation of eicosanoid immune mediators.** *The Journal of Immunology*, v. 206, n. 2, p. 329-334, 2022.

- SEGURA-PACHECO, B., & DUEÑAS-GONZALEZ, A. **Determination of 5-methyl-cytosine and cytosine in tumor DNA of cancer patients.** Electrophoresis, v. 26, n. 6, p. 1057-1062, 2005.
- SHANTAVASINKUL, P. C., MUEHLBAUER, M. J., BAIN, J. R., ILKAYEVA, O. R., CRAIG, D. M., NEWGARD, C. B., & TORQUATI, A. **Improvement in insulin resistance after gastric bypass surgery is correlated with a decline in plasma 2-hydroxybutyric acid.** Surgery for Obesity and Related Diseases, v. 14, n. 8, p. 1126-1132, 2018.
- SHI, D., YAN, R., LV, L., JIANG, H., LU, Y., SHENG, J., & LI, L. **The serum metabolome of COVID-19 patients is distinctive and predictive.** Metabolism, v. 118, p. 154739, 2021.
- SILVA, A. A. R. **COMPARAÇÃO DE ASSINATURAS LIPÍDICAS EM PLASMA E TECIDO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA INVESTIGADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.** Orientador: Andréia de Melo Porcari. 2020. Dissertação (Mestrado) - Universidade São Francisco, 2020. Disponível em: <https://shre.ink/kiev>. Acesso em: 1 fev. 2023.
- SILVA, R. R. D. **Anotação probabilística de perfis de metabólitos obtidos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.** 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SJÖGREN, M., MINTHON, L., PASSANT, U., BLENNOW, K., & WALLIN, A. **Decreased monoamine metabolites in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease.** Neurobiology of aging, v. 19, n. 5, p. 379-384, 1998.
- SLUPSKY, C. M., RANKIN, K. N., WAGNER, J., FU, H., CHANG, D., WELJIE, A. M., & MARRIE, T. J. **Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles.** Analytical chemistry, v. 79, n. 18, p. 6995-7004, 2007.
- SONEJA, A., DREWS, M., & MALINSKI, T. **Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing.** Pharmacological reports, v. 57, p. 108, 2005
- SONG, Y., TANG, L., HAN, J., GAO, Y., TANG, B., SHAO, M., & ZHANG, H. **Uric acid provides protective role in red blood cells by antioxidant defense: a hypothetical analysis.** Oxidative medicine and cellular longevity, v. 2019, 2019.

STILLWELL, W. **An introduction to biological membranes: composition, structure and function**. Elsevier, 2016.

SUHRE, K., SHIN, S. Y., PETERSEN, A. K., MOHNEY, R. P., MEREDITH, D., WÄGELE, B., & GIEGER, C. **Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research**. *Nature*, v. 477, n. 7362, p. 54-60, 2011.

SUMARRIVA, K., UPPAL, K., MA, C., HERREN, D. J., WANG, Y., CHOCRON, I. M. & BRANTLEY, M. A. **Arginine and carnitine metabolites are altered in diabetic retinopathy**. *Investigative ophthalmology & visual science*, v. 60, n. 8, p. 3119-3126, 2019.

SUN, H. J., XIONG, S. P., WANG, Z. C., NIE, X. W., & BIAN, J. S. **Hydrogen sulfide in diabetic complications revisited: the state of the art, challenges, and future directions**. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 38, n. 1-3, p. 18-44, 2023.

SUN, L., LIANG, L., GAO, X., ZHANG, H., YAO, P., HU, Y., & WU, J. **Early prediction of developing type 2 diabetes by plasma acylcarnitines: a population-based study**. *Diabetes care*, v. 39, n. 9, p. 1563-1570, 2016.

SUZUKI, S., KODERA, Y., SAITO, T., FUJIMOTO, K., MOMOZONO, A., HAYASHI, A., & SHICHIRI, M. **Methionine sulfoxides in serum proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress**. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 38299, 2016.

SWAIN, S. K., & JENA, P. P. **Clinical implications, and future perspective of COVID-19 pandemic-a review**. *Int J Adv Med*, v. 8, n. 2, p. 334-40, 2021.

TAHAMTAN, A., & ARDEBILI, A. **Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results**. *Expert review of molecular diagnostics*, v. 20, n. 5, p. 453-454, 2020.

THÉVENOT, E. A., ROUX, A., XU, Y., EZAN, E., & JUNOT, C. **Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses**. *Journal of proteome research*, v. 14, n. 8, p. 3322-3335, 2015.

THOMAS, T., STEFANONI, D., REISZ, J. A., NEMKOV, T., BERTOLONE, L., FRANCIS, R. O., & D'ALESSANDRO, A. **COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status**. *JCI insight*, v. 5, n. 14, 2020.

TORRETTA, E., GARZIANO, M., POLISENO, M., CAPITANIO, D., BIASIN, M., SANTANTONIO, T. A., & GELFI, C. **Severity of COVID-19 patients predicted by serum sphingolipids signature.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 19, p. 10198, 2021.

TURTON, N., HEATON, R. A., & HARGREAVES, I. P. **COVID-19 and the Assessment of Coenzyme Q10.** In: *Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications for COVID-19 Disease Diagnosis and Risk Stratification*. New York, NY: Springer US, p. 355-365, 2022.

VANCE, J. E., & TASSEVA, G. **Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1831, n. 3, p. 543-554, 2013.

VELAVAN, T. P., & MEYER, C. G. Mild versus severe COVID-19: laboratory markers. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 95, p. 304-307, 2020.

VELICHKO, A., HUYUT, M. T., BELYAEV, M., IZOTOV, Y., & KORZUN, D. **Machine learning sensors for diagnosis of COVID-19 disease using routine blood values for internet of things application.** *Sensors*, v. 22, n. 20, p. 7886, 2022.

VERAS, F. P., PONTELLI, M. C., SILVA, C. M., TOLLER-KAWAHISA, J. E., DE LIMA, M., NASCIMENTO, D. C., & CUNHA, F. Q. **SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology.** *Journal of Experimental Medicine*, v. 217, n. 12, p. e20201129, 2020.

VOET, D., VOET, J. G., & PRATT, C. W. **Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level.** John Wiley & Sons, 2016.

VYAVAHARE, S., KUMAR, S., CANTU, N., KOLHE, R., BOLLAG, W. B., MCGEE-LAWRENCE, M. E., & FULZELE, S. **Tryptophan-kynurenine pathway in COVID-19-dependent musculoskeletal pathology: a minireview.** *Mediators of Inflammation*, v. 2021, 2021.

WACHSMUTH, H. R., WENINGER, S. N., & DUCA, F. A. **Role of the gut-brain axis in energy and glucose metabolism.** *Experimental & Molecular Medicine*, v. 54, n. 4, p. 377-392, 2022.

WANT, E. J., MASSON, P., MICHPOULOS, F., WILSON, I. D., THEODORIDIS, G., PLUMB, R. S. & NICHOLSON, J. K. **Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS**. *Nature protocols*, v. 8, n. 1, p. 17-32, 2013.

WEI, H., PASMANN, W., RUBINGH, C., WOPEREIS, S., TIENSTRA, M., SCHROEN, J., & VAN DER GREEF, J. **Urine metabolomics combined with the personalized diagnosis guided by Chinese medicine reveals subtypes of pre-diabetes**. *Molecular BioSystems*, v. 8, n. 5, p. 1482-1491, 2012.

WESTERHUIS, J. A., HOEFSLOOT, H. C., SMIT, S., VIS, D. J., SMILDE, A. K., VAN VELZEN, E. J., ... & VAN DORSTEN, F. A. **Assessment of PLSDA cross validation**. *Metabolomics*, v. 4, p. 81-89, 2008.

WISHART, D. S., KNOX, C., GUO, A. C., EISNER, R., YOUNG, N., GAUTAM, B., ... & FORSYTHE, I. **HMDB: a knowledgebase for the human metabolome**. *Nucleic acids research*, v. 37, n. suppl_1, p. D603-D610, 2009.

WITTENBECHER, C., CUADRAT, R., JOHNSTON, L., EICHELMANN, F., JÄGER, S., KUXHAUS, O., & SCHULZE, M. B. **Dihydroceramide-and ceramide-profiling provides insights into human cardiometabolic disease etiology**. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 936, 2022.

WU, Y., PENG, Z., YAN, Y., HU, J., WANG, Y., WANG, X., WATTERSON, D., & SHI, Y. **Current knowledge of COVID-19: Advances, challenges and future perspectives**. *Biosafety and health*, v. 3, n. 04, p. 202-209, 2021.

WURTZ, P., TIAINEN, M., MÄKINEN, V. P., KANGAS, A. J., SOININEN, P., SALTEVO, J., & ALA-KORPELA, M. **Circulating metabolite predictors of glycemia in middle-aged men and women**. *Diabetes care*, v. 35, n. 8, p. 1749-1756, 2012.

XIA, J., & WISHART, D. S. **Metabolomic data processing, analysis, and interpretation using MetaboAnalyst**. *Current protocols in bioinformatics*, v. 34, n. 1, p. 14.10. 1-14.10. 48, 2011.

XIAO, J. F., ZHOU, B., & RESSOM, H. W. **Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics**. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 32, p. 1-14, 2012.

YAO, Y., CAO, J., WANG, Q., SHI, Q., LIU, K., LUO, Z. & HU, B. D-dimer as a biomarker for disease severity and mortality in COVID-19 patients: a case control study. **Journal of intensive care**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2020.

YIN, J., REN, W., YANG, G., DUAN, J., HUANG, X., FANG, R., & WU, G. **L-Cysteine metabolism and its nutritional implications**. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 1, p. 134-146, 2016.

ZARINI, S., BROZINICK, J. T., BERRY, K. A. Z., GARFIELD, A., PERREAULT, L., KEREGE, A., & BERGMAN, B. C. **Serum dihydroceramides correlate with insulin sensitivity in humans and decrease insulin sensitivity in vitro**. **Journal of Lipid Research**, v. 63, n. 10, 2022.

ZAZULA, R., MORAVEC, M., PEHAL, F., NEJTEK, T., PROTUŠ, M., & MÜLLER, M. **Myristic acid serum levels and their significance for diagnosis of systemic inflammatory response, sepsis, and bacteraemia**. **Journal of personalized medicine**, v. 11, n. 4, p. 306, 2021.

ZHANG, A., SUN, H., WU, X., & WANG, X. **Urine metabolomics**. **Clinica Chimica Acta**, v. 414, p. 65-69, 2012.

ZHANG, B., ZHOU, X., ZHU, C., SONG, Y., FENG, F., QIU, Y., & WANG, J. **Immune phenotyping based on the neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG level predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19**. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 157, 2020.

ZHAO, H., LIU, H., YANG, Y., & WANG, H. **The Role of H₂S Regulating NLRP3 Inflammasome in Diabetes**. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4818, 2022.

ZHAO, M., ZHU, Y., WANG, H., ZHANG, W., & MU, W. **Recent advances on N-acetylneuraminic acid: Physiological roles, applications, and biosynthesis**. **Synthetic and Systems Biotechnology**, 2023.

ZHAO, S., LIU, M. L., HUANG, B., ZHAO, F. R., LI, Y., CUI, X. T., & LIN, R. **Acetylcarnitine Is associated with cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus**. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 806819, 2021.

ZHENG, S., YU, M., LU, X., HUO, T., GE, L., YANG, J., & LI, F. **Urinary metabonomic study on biochemical changes in chronic unpredictable mild stress model of depression.**

Clinica Chimica Acta, v. 411, n. 3-4, p. 204-209, 2010.

ZHUAN, L. V., LIU, R., SU, K., GU, Y., FANG, L., FAN, Y., & FENG, X. **Acupuncture ameliorates breast cancer-related fatigue by regulating the gut microbiota-gut-brain axis.**

Frontiers in Endocrinology, v. 13, p. 921119, 2022.