

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

KARINA TREVISAN RODRIGUES

**Investigação do refluxo vésico-ureteral por
abordagens metabolômicas alvo e global
em urina utilizando como plataformas
analíticas CE-MS, CESI-MS, RPLC-MS e
HILIC-MS**

Versão corrigida da Tese defendida

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

28/08/2017

KARINA TREVISAN RODRIGUES

**Investigação do refluxo vésico-ureteral por
abordagens metabolômicas alvo e global
em urina utilizando como plataformas
analíticas CE-MS, CESI-MS, RPLC-MS e
HILIC-MS**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências (Química)*

Orientador a: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

R696i Rodrigues, Karina Trevisan
Investigação do refluxo vésico-ureteral por
abordagens metabolômicas alvo e global em urina
utilizando como plataformas analíticas CE-MS, CESI-
MS, RPLC-MS e HILIC-MS / Karina Trevisan Rodrigues.
- São Paulo, 2017.
146 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.
Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi

1. refluxo vésico-ureteral. 2. metabolômica. 3.
aminoácidos. 4. CE-MS. 5. LC-MS. I. T. II. Tavares,
Marina Franco Maggi, orientador.

Ao meu pai (eternamente no meu coração) e à minha mãe, aqueles que sempre me apoiaram e muito ensinaram.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as conquistas alcançadas e por me guiar no melhor caminho.

À minha mãe Nurimar, por todo amor, ensinamento e dedicação e por estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando; e ao meu pai Claudemir, que sempre me incentivou e tanto amou, mas que infelizmente nos deixou antes do término deste trabalho. Tenho a certeza que de onde estiver, ele está me dando forças para nunca desistir dos meus objetivos e sonhos.

Ao meu irmão Rodrigo, pelo companheirismo de sempre, pelo amor, compressão e apoio e à minha cunhada Nathália, pelo apoio e paciência. Ao meu sobrinho Miguel que veio para trazer mais amor e alegria nas nossas vidas. E à minha irmã Nicolý, pelo amor, amizade e apoio de sempre.

À toda minha família, por sempre torcer pelo meu trabalho e acreditar na minha capacidade.

Ao meu namorado Rik, por sempre me apoiar, por acreditar em mim, pelo amor e companheirismo, especialmente nos momentos mais difíceis dessa longa jornada.

À Profa. Dra. Marina F. M. Tavares, pela orientação, amizade e todas as oportunidades durante todos esses anos de trabalho, pelos conselhos e ensinamentos.

À Profa. Dra. Ann Van Schepdael, por abrir as portas do seu grupo de pesquisa e por me acolher tão bem. *Dank u wel!*

Ao Prof. Dr. Oleg Mayboroda e ao Prof. Dr. Rawi Ramautar pela parceria e cooperação no desenvolvimento de uma parte desse trabalho.

Ao Prof. Dr. João P. S. Farah, que está sempre pronto para nos ensinar e ajudar. Obrigada pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao Prof. Claudimir Lucio do Lago, por me permitir trabalhar em seu laboratório e usar o Darth Vader no início desse projeto.

Ao pessoal do Grupo Fleury por abrirem as portas do IPD e por me acolherem tão bem. Especialmente ao Dr. Valdemir Carvalho, à Dra. Karina Cardozo e à Jéssica Salgueiro, pela oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho no IPD, pelos ensinamentos sobre cromatografia e espectrometria de massas, pelo apoio, pelas conversas produtivas e amizade. À Luciana e Adriana pela amizade, ajuda, pelas conversas e apoio durante o meu período no IPD. Meu doutorado não teria sido o mesmo sem vocês. Muito obrigada!

Ao Daniel, uma das pessoas mais essenciais no desenvolvimento dos trabalhos do grupo de pesquisa da Prof. Marina. Obrigada pela amizade, pelas longas horas de conversa e por toda ajuda neste e em tantos outros trabalhos.

Aos professores, técnicos e colegas do laboratório de análises farmacêuticas da Universidade de Leuven (KUL) na Bélgica, pela ajuda, ensinamentos, por me auxiliar na adaptação ao laboratório e pelas conversas.

Aos colegas do laboratório Ana Rosa, Andréa, Carol, Fabio, Gisele, Loraine, Maicon e Pedro, pelas conversas produtivas, ajuda e convivência.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 2012/09822-0), pela concessão da bolsa BEPE (Processo 2014/18789-2), e auxílios financeiros na forma de reserva técnica.

À CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro de projetos de pesquisa do laboratório.

E a todas as pessoas, que de alguma forma auxiliaram na conclusão desse trabalho.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o
que deveria ser, mas não sou o que era antes”.*

(Martin Luther King)

RESUMO

Rodrigues, K.T **Investigação do refluxo vésico-ureteral por abordagens metabolômicas alvo e global em urina utilizando como plataformas analíticas CE-MS, CESI-MS, RPLC-MS e HILIC-MS.** 2017. 146p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O refluxo vésico-ureteral (RVU) é uma das condições urológicas comumente diagnosticada entre crianças. Altos graus dessa condição podem causar cicatrização renal, insuficiência renal e hipertensão arterial. A uretrocistografia miccional é o método mais comumente utilizado para o diagnóstico, no entanto, esse procedimento envolve sedação, cateterismo vesical e expõe a criança a uma quantidade significativa de radiação. A investigação metabolômica pode fornecer novos entendimentos sobre a doença e visa a descoberta de metabólitos específicos associados a ela. Assim, existe um potencial considerável para a implementação de perfil metabólico em análises clínicas. Dessa forma, buscou-se estabelecer uma alternativa não invasiva para identificar crianças com o RVU através da metabolômica.

Para a investigação metabolômica alvo um método por eletroforese capilar acoplada ao espectrômetro de massas (CE-MS) com analisador do tipo *ion trap* foi desenvolvido e validado para a determinação de 27 aminoácidos em urina. Os parâmetros experimentais relacionados às configurações da interface CE-MS, eletrólito (BGE) e espectrômetro de massas (MS) foram otimizados, proporcionando uma boa separação dos 27 aminoácidos, incluindo os isômeros L-leucina, L-isoleucina e L-alloisoleucina, em menos de 30 min. O líquido auxiliar (SHL) foi composto de 0,5% (v/v) ácido fórmico em 60% (v/v) água/metanol à uma vazão de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. O BGE consistiu de 0,80 mol L⁻¹ de ácido fórmico e 15% (v/v) de metanol. Um procedimento de *stacking* por pH foi implementado para aumentar a

detectabilidade (uma solução de NH_4OH a 12,5% (v/v) foi injetada a 0,5 psi/9 s antes das amostras). O método foi validado de acordo com os protocolos FDA e ICH, exibindo parâmetros aceitáveis. A quantificação bem sucedida dos aminoácidos em amostras de urina de um estudo piloto do RVU foi alcançada. A avaliação estatística dos resultados mostrou que alguns dos aminoácidos avaliados podem carregar informações que possibilitam discriminar as amostras de urina entre os grupos teste e controle.

Para a análise metabolômica global urinária, métodos por RPLC-MS e HILIC-MS foram otimizados. Cinco colunas com diferentes propriedades foram investigadas para RPLC e quatro colunas para HILIC; adicionalmente, foram investigados a influência dos aditivos e pH da fase móvel. As condições ótimas foram determinadas avaliando o formato de pico, a relação sinal-ruído, o tempo de retenção, o número de *molecular features* detectados e sua distribuição durante o gradiente de eluição. A melhor condição obtida para RPLC utiliza a coluna CSH C18 e fase móvel composta por 0,1% (v/v) ácido fórmico em água (A) e 0,1% (v/v) ácido fórmico em acetonitrila (B). Para HILIC, o melhor desempenho foi obtido com a coluna zwitteriônica ZIC-HILIC e fase móvel composta por 10 mmol L⁻¹ acetato de amônio pH 6,8 (B) e 95% (v/v) acetonitrila e 5% 200 mmol L⁻¹ acetato de amônio pH 6,8 (A).

As amostras de urina dos grupos controle e teste foram submetidas à análise metabolômica global por RPLC-MS usando o método otimizado e por CESI-MS. Os resultados indicaram que diversas rotas metabólicas podem ter sido alteradas pelo RVU. Alteração dos níveis de carnitinas e acilcarnitinas, aminoácidos e derivados, purinas e outros foi observada. Ainda, a presença de acilcarnitinas na urina podem indicar danos mitocondriais e a diminuição de triptofano e aumento do ácido quinurênico indicam uma alteração no metabolismo do triptofano.

Palavras-chave: Refluxo vésico-ureteral, metabolômica, aminoácidos, CE-MS, LC-MS

ABSTRACT

Rodrigues, K.T **Investigation of vesicoureteral reflux by target and untargeted metabolomic approaches in urine using CE-MS, CESI-MS, RPLC-MS and HILIC-MS as analytical platforms.** 2017. 146p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Vesicoureteral reflux (VUR) is one of the most commonly urologic conditions diagnosed among children. A high degree of this condition can cause kidney scarring, kidney failure and high blood pressure. Voiding cystourethrography is the standard method for diagnosis; however, this procedure involves sedation, bladder catheterization and exposes the child to a significant amount of radiation. Metabolomics has provided new insights about the disease and aims to discover specific metabolites associated with it. Thus, there is a considerable potential for the implementation of metabolic profile in clinical analyses. Thus, we attempted to establish a noninvasive alternative to identify children with VUR through metabolomics approach.

For target metabolomics, a CE-MS method was developed and validated for the separation and quantitative analysis of 27 amino acids in urine. Experimental parameters related to the CE-MS interface (based on co-axial sheath liquid, SHL), background electrolyte (BGE) and mass spectrometer (MS) settings were optimized providing a good separation of 27 amino acids, including the isomers L-leucine, L-isoleucine and L-alloisoleucine, in less than 30 min. The SHL was composed of 0.50% (v/v) formic acid in 60% (v/v) methanol-water delivered at a flow rate of 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. The BGE consisted of 0.80 mol L⁻¹ formic acid and 15% (v/v) methanol. A pH stacking procedure was implemented to enhance sensitivity (a 12.5% (v/v) NH₄OH solution was injected at 0.5 psi/9 s prior to samples). The proposed method was thoroughly validated according to FDA and ICH protocols exhibiting acceptable parameters. A

successful quantification of amino acids in urine samples from the VUR cohort was achieved. The statistical evaluation of the results showed that some of the amino acids may carry information for the discrimination of the urine samples between the test and control groups.

For untargeted metabolomics analysis, methods by RPLC-MS and HILIC-MS were optimized. Five columns with different properties were investigated for RPLC and four columns for HILIC; additionally, the influence of additives and pH of the mobile phase were investigated. The optimum conditions were determined assessing the peak shape, signal-to-noise ratio, retention time, number of molecular features detected and their distribution during the elution gradient. The best condition obtained for RPLC uses CSH C₁₈ column and mobile phase composed by 0.1% (v/v) formic acid in water (A) and 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile (B). For HILIC, the best performance was obtained with the zwitterionic ZIC-HILIC column and mobile phase composed by 10 mmol L⁻¹ ammonium acetate pH 6.8 (B) and 95% (v/v) acetonitrile and 5% (v/v) 200 mmol L⁻¹ ammonium acetate pH 6.8 (A).

Urine samples from the control and test groups were submitted to global metabolomics analysis by RPLC-MS using the optimized method and by CESI-MS. The results indicated that several metabolic pathways may have been altered by VUR. Changes of carnitine and acylcarnitine levels, amino acids and derivatives, purines and others was observed. Furthermore, the presence of acylcarnitines in the urine may indicate mitochondrial damage and the decrease of tryptophan and increase of the kynurenic acid indicate a change in the metabolism of tryptophan.

Keywords: vesicoureteral reflux, metabolomics, amino acids, CE-MS, LC-MS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala – Alanina

Arg - Arginina

Asn - Asparagina

Asp – Ácido Aspártico

ANOVA - Análise de Variância (do inglês, Analysis of Variance)

β Ala – Beta-alanina

bw - Largura de banda (do inglês, band width)

Car - Carnosina

CE - Eletroforese Capilar (do inglês, Capillary Electrophoresis)

CESI – Eletroforese Capilar de interface sem Líquido Auxiliar (do inglês, Capillary Electrophoresis Sheathless Interface)

Cit – Citrulina

Cys – Cisteína

CV - Coeficiente de Variação

ESI – Ionização por Electrospray (do inglês, Electrospray Ionization)

Gly – Glicina

Gln - Glutamina

Glu – Ácido glutâmico

IT - *Ion Trap*

fwhm - Largura de pico à meia altura (do inglês, full width at half maximum)

F - Coeficiente de Fisher

GC - Cromatografia Gasosa (do inglês, Gas Chromatography)

¹H NMR - Ressonância Magnética Nuclear de Próton (do inglês, Proton Nuclear Magnetic Resonance)

HILIC - Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (do inglês, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)

HMDB - *Human Metabolome Database*

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LC - Cromatografia Líquida (do inglês, Liquid Chromatography)

minfrac - Fração Mínima de Amostras (do inglês, minimum fraction)

MS - Espectrometria de Massas (do inglês, Mass Spectrometry)

m/z - Relação massa/carga

mzwid - Largura de Sobreposição de Faixas de *m/z* (do inglês, width of overlapping *m/z* slices)

His - Histidina

⁴Hyp - 4-Hidroxiprolina

Ile - Isoleucina

Leu - Leucina

Lys - Lisina

Met - Metionina

OPLS-DA - Análise Discriminante por Projeção em Estruturas Latentes Ortogonal (do inglês, Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis)

PCA - Análise de Componentes Principais (do inglês, Principal Component Analysis)

Phe - Fenilalanina

PI - Padrão Interno

PLS-DA - Análise Discriminante por Método de Mínimos Quadrados Parciais

(do inglês, Partial Least Squares Discriminant Analysis)

Pro - Prolina

Q^2 - Previsibilidade do Modelo

QC - Controle de Qualidade (do inglês, Quality Control)

R^2 - Variância Explicada

RPLC - Cromatografia Líquida em Fase Reversa (do inglês, Reversed Phase Liquid Chromatography)

RVU - Refluxo Vésico Ureteral

Ser - Serina

snthresh - Relação sinal/ruído

Thr - Treonina

TIC - Cromatograma de íons totais (do inglês, Total Ion Chromatogram)

TOF - Tempo de Voo (do inglês, Time-of-Flight)

Trp - Triptofano

Tyr - Tirosina

UV-Vis - Ultravioleta Visível

ITU - Infecção do trato urinário

VIP - Importância da Variável na Projeção (do inglês, Variable Importance Projection)

Lista de Figuras

1.1.	Esquema apresentando os graus do refluxo vésico-ureteral. Grau I: refluxo somente para o ureter; Grau II: refluxo até o rim, sem causar dilatação renal ou ureteral; Grau III: refluxo até o rim, causando pouca dilatação renal; Grau IV: refluxo até o rim, causando moderada dilatação renal; Grau V: refluxo até o rim, causando intensa dilatação renal e tortuosidade dos ureteres.....	21
1.2.	Conexão da metabolômica com as demais ômicas. O metaboloma interage e reflete a atividade do genoma, transcriptoma, e proteoma	25
1.3.	Diagrama de um típico fluxo de trabalho em metabolômica.....	29
4.1.	Eletroferograma do pico base (BPE, do inglês base peak electropherogram) da análise de uma mistura de padrões de aminoácidos e eletroferograma de íon extraído (EIE, do inglês extracted ion electropherogram) de cada um dos aminoácidos com o método de CE-MS. Condições: capilar de sílica fundida (85 cm comprimento total, 50 µm diâmetro interno); BGE composto por 0,80 mol L ⁻¹ ácido fórmico contendo 15% (v/v) MeOH; tensão aplicada de +30 kV; injeção hidrodinâmica da amostra: 0,6 psi por 20 s com stacking mediado por pH (injeção de 12,5% (v/v)NH ₄ OH a 0,5 psi por 9 s antes da injeção da amostra); temperatura do capilar 20 °C. Concentrações: aminoácidos foram injetados em um intervalo de 60 a 600 µmol L ⁻¹ . Metionina sulfona na concentração de 50 µmol L ⁻¹ foi usado como padrão interno. SHL composto por 0,5% (v/v) ácido fórmico em 60% (v/v) metanol-água e entregue a uma vazão de fluxo de 5,0 µL min ⁻¹ . No espectrômetro de massas, a vazão do gás secante foi ajustada à 5,0 L min ⁻¹ e a temperatura à 200 °C, com um tempo de acumulação de 15 ms. Legendas: 1, fragmento de Orn; 2, fragmento de Phe; 3, isóbaros Ile/Leu/alle; 4, fragmento de Met; 5, fragmento de 4Hyp. As intensidades dos sinais são descritas no lado esquerdo de cada EIE e BPE.....	72
4.2.	Eletroferograma do pico base (BPE) de uma amostra de urina controle (A) uma amostra teste (com RVU) (B) e eletroferogramas dos íons extraídos (EIE) para cada um dos aminoácidos detectados nessas amostras usando o método de CE-MS otimizado. Condições: idem em Figura 4.1	79
4.3.	Gráfico de scores do modelo de PCA das concentrações de aminoácidos quantificados em urina do grupo controle e teste com valores de R ² = 0,429 e Q ² = -0,0747. O símbolo ■ representa as amostras do grupo testes e ▲ amostras do grupo controle	83
4.4.	Gráfico de <i>loadings</i> de PCA das concentrações de aminoácidos quantificadas nas amostras de urina dos grupos teste e controle	84
4.5.	Gráfico de scores PLS-DA concentrações de aminoácidos quantificadas nas amostras de urina dos grupos teste e controle com valores de R ² = 0,363 e Q ² = 0,153. O símbolo ■ representa as amostras do grupo testes e ▲ amostras do grupo controle	85
4.6.	Gráficos Q-Q gerados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk	88
4.7.	Classificação individual de cada metabólito testado para as diferentes condições e colunas testadas por RPLC-MS. Legenda: verde: ótimo, amarelo: aceitável e vermelho: não aceitável	95

4.8.	Cromatogramas do íon extraído de A) separação dos isômeros isoleucina e leucina, B) separação da cistina, Glu e Asp. Pico azul: cistina, rosa: Glu e marrom: Asp	95
4.9.	Soma da pontuação total obtida para cada condição e coluna testada por RPLC-MS. Pontos atribuídos com base nos parâmetros: S/N, formato de pico e tempo de retenção	97
4.10.	Número de <i>molecular features</i> detectados na mistura de amostras de urina por RPLC-MS	99
4.11.	A) Porcentagem de <i>molecular features</i> a cada intervalo de 1 minuto e B) Distribuição de todos <i>molecular features</i> detectados durante a análise cromatográfica para as colunas PFP e CSH na condição ácida	101
4.12.	Cromatograma de pico base de (A) mistura da amostra de urina e (B) mistura dos 31 padrões de metabólitos por RPLC-MS com a coluna CSH em pH 2,8. composta por (A) água e (B) acetonitrila, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico como aditivo. Gradiente linear, começando em 5% da fase B e chegando a 95% de B em 12 minutos. Vazão de 0,4 mL min ⁻¹ e coluna mantida a 45 °C.....	103
4.13.	Classificação individual de cada metabólito testado para as diferentes condições e colunas testadas por HILIC-MS. Legenda: verde: ótimo, amarelo: aceitável e vermelho: não aceitável	108
4.14.	Soma da pontuação total obtida para cada condição e coluna testada por HILIC-MS. Pontos atribuídos com base nos parâmetros: S/N, formato de pico e tempo de retenção	109
4.15.	Número de <i>molecular features</i> detectados na mistura de amostras de urina analisadas por HILIC-MS	110
4.16.	Distribuição de todos <i>molecular features</i> detectados durante a análise por HILIC-MS para todas as condições avaliadas.....	112
4.17.	Cromatograma de pico base de (A) mistura da amostra de urina e (B) mistura de padrões dos 31 metabólitos por HILIC-MS com a coluna ZIC-HILIC, pH 6,8. Composição da fase (A) 95% (v/v) acetonitrila e 5% (v/v) 200 mmol/L acetato de amônio e (B) 50% (v/v) acetonitrila, 50% 100 mmol L ⁻¹ formiato de amônio. Gradiente: 0-3 min, 1% (B), 3-17 min, 90% (B); 17,0-17,1, 1% (B), 17-21 min, 1% (B). Vazão 0,4 mL min ⁻¹ , coluna mantida a 40°C.....	113
4.18.	Gráficos de scores de PCA para as amostras de urina dos grupos testes e controle analisadas por A) CESI-MS com R ² = 0,764 e Q ² = 0,804 e B) RPLC-MS com R ² = 0,748 e Q ² = 0,0767. ■ amostras teste, ▲ amostras controle e ♦ QC	116
4.19.	Gráficos de scores de PLS-DA com predição de QC para as amostras de urina dos grupos testes e controle analisadas por A) CESI-MS com R ² = 0,974 e Q ² = 0,760 e B) RPLC-MS com R ² = 0,992 e Q ² = 0,850. ■ amostras teste, ▲ amostras controle e ♦ QC	117
4.20.	Gráficos de scores de PLS-DA sem QC para as amostras de urina dos grupos testes e controle analisadas por A) CESI-MS com R ² = 0,977 e Q ² = 0,751 e B) RPLC-MS com R ² = 0,989 e Q ² = 0,858. ■ amostras teste, ▲ amostras controle	117
4.21.	Gráfico da validação do modelo de PLS-DA pelo teste de permutação (100 permutações) de R ² e Q ²	118

- 4.22. Gráficos de scores de OPLS-DA para as amostras de urina dos grupos testes e controle analisadas por A) CESI-MS com $R^2 = 0,995$ e $Q^2 = 0,635$ e B) RPLC-MS com $R^2 = 0,989$ e $Q^2 = 0,619$. ■ amostras teste, ▲ amostras controle 120
- 4.23. Diagrama de Venn ilustrando o número de metabólitos identificados em cada técnica analítica e em ambas 121

Lista de Tabelas

1.1.	Plataformas analíticas usadas na análise metabolômicas	30
3.1.	Concentrações das soluções estoques dos aminoácidos e concentração final adicionada a mistura de urina para a otimização do método	50
3.2.	Concentrações detalhadas ($\mu\text{mol L}^{-1}$) de cada aminoácido empregado na construção da curva analítica	53
3.3.	Informações das amostras de urina coletadas na Bélgica	54
3.4.	Especificações das colunas avaliadas	57
3.5.	Composições das fases móveis avaliadas	58
3.6.	Lista de padrões utilizados na otimização dos métodos cromatográficos	59
4.1.	Otimização dos parâmetros de CE-MS, faixas testadas e valores ótimos	68
4.2.	Resultados de linearidade, LD e LQ para o método de CE-MS proposto	75
4.3.	Resultados dos testes de recuperação e repetibilidade para o método de CE-MS proposto	77
4.4.	Concentrações dos aminoácidos nas amostras de urina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	80
4.5.	Resultados para os testes Kolmogorov–Smirnov e Shapiro-Wilk	86
4.6.	P-valores calculados pelo método Mann Whitney U e teste t de Student	88
4.7.	Variáveis identificadas através de testes t realizados no MetaboAnalyst	89
4.8.	CV-ANOVA para o modelo PLS-DA para análises por CESI-MS	119
4.9.	CV-ANOVA para o modelo PLS-DA para análises por RPLC-MS	119
4.10.	Metabólitos identificados com significância estatística e suas características obtidas no estudo metabolômico global por CESI-MS e RPLC-MS para a classificação de RVU	122

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1 Refluxo Vésico Ureteral.....	21
2 Metabolômica.....	24
3 Metabolômica e técnicas analíticas	30
3.1 NMR	32
3.2 GC-MS	33
3.3 LC-MS	34
3.4 CE-MS.....	35
4 Tratamento de Dados	37
4.1 Pré-processamento.....	37
4.2 Análise de dados	39
5 RVU e as ciências ômicas	40
6 Análise de aminoácidos em urina.....	41
OBJETIVOS.....	44
1 Objetivos Gerais.....	45
2 Objetivos Específicos	45
PARTE EXPERIMENTAL	46
1 Reagentes e materiais.....	47
2 Otimização de método para a determinação aminoácidos por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas	48
2.1 Instrumentação e condições.....	48
2.2 Preparo da amostra de urina	49
2.3 Otimização do método.....	51
2.4 Validação.....	52
3 Análise quantitativa de aminoácidos em urina e avaliação estatística	53
4 Otimização de colunas e fase móvel para RPLC e HILIC-MS	56

4.1	Instrumentação e condições.....	56
4.2	Colunas e composição da fase móvel	57
4.3	Padrões de metabólitos	58
4.4	Avaliação dos dados.....	60
5	Análises metabolômicas por RPLC-MS E CESI-MS.....	62
5.1	Método e condições	62
5.2	Tratamento dos dados	63
RESULTADOS E DISCUSSÕES		66
1	Determinação de aminoácidos em urina por CE-MS	67
1.1	Otimização do método.....	67
1.1.1	Parâmetros da interface	68
1.1.2	Parâmetros de CE.....	70
1.1.3	Parâmetros de MS.....	73
1.2	Validação do método	74
1.3	Análise quantitativa de aminoácidos nas amostras de urina.....	78
1.4	Análise estatística e interpretação dos resultados	82
2	Otimização do método RPLC e HILIC	90
2.1	RPLC	91
2.2	HILIC	104
3	Investigação metabolômica por CESI-MS e RPLC-MS.....	114
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS		128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....		132

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 Refluxo Vésico Ureteral

O refluxo vésico-ureteral (RVU) é uma das doenças urológicas mais comumente diagnosticada em crianças. É definida como o retrocesso do fluxo urinário da bexiga para o trato urinário superior, e em alguns casos para os rins e está frequentemente associada à infecção do trato urinário (ITU) (1-3). O RVU pode ser causado por uma insuficiência anatômica da junção ureterovesical ou devido a uma obstrução infravesical. Estima-se que de 0,4% a 1,8% da população infantil sofre de RVU sem a apresentação de sintomas. Porém, a prevalência da doença cresce para 16% em crianças com hidronefrose pré-natal detectada, de 27-46% em irmãos de crianças anteriormente diagnosticadas com RVU, e para 30-40% em crianças que apresentam infecção no trato urinário, sendo que, entre os recém-nascidos, é mais recorrente nos meninos; no entanto, após o primeiro ano de vida, meninas apresentam mais o problema que os meninos (4-7).

A importância da doença se deve ao fato de que o retrocesso do fluxo da urina da bexiga para o trato urinário pode transportar bactérias para o trato urinário superior, possivelmente predispondo essas crianças a ITU febril, a qual pode resultar em parênquima renal permanente. Por fim, o dano renal resulta em nefropatia de refluxo, que pode vir a causar hipertensão e decréscimo da função renal. O RVU é considerada uma das três condições mais importantes relacionadas a danos aos rins, juntamente com ITU e incontinência urinária (8-10).

Quanto à sua classificação, o refluxo se divide em RVU primário e secundário. O RVU primário é caracterizado por uma anomalia congênita do orifício urético e da junção vésico ureteral, decorrente do comprimento curto do ureter, levando a um

mecanismo valvular incompetente. O RVU secundário é consequente de patologias da bexiga, na qual a anormalidade causa uma elevação da pressão de saída da bexiga, cuja doença pode estar associada à obstrução ureteral ou doença neuromuscular, como bexiga neurogênica e disfunção vesical (1,3,8).

Devido à alta incidência de RVU em crianças com ITU, a sua detecção torna-se necessária assim que haja ocorrência de febres e infecções. Além disso, a severidade do RVU é dependente do grau da condição (Figura 1.1). Para isso, a imagem do trato urinário é considerada essencial, dada a necessidade de diagnóstico rápidos. Os métodos padrões de imagens utilizados para o diagnóstico incluem ultrassonografia do sistema renal e bexiga, uretrocistografia miccional (UCM), cistografia (CI) de medicina nuclear ou isotópica do sistema renal, além de métodos ultrassônicos (2,3).

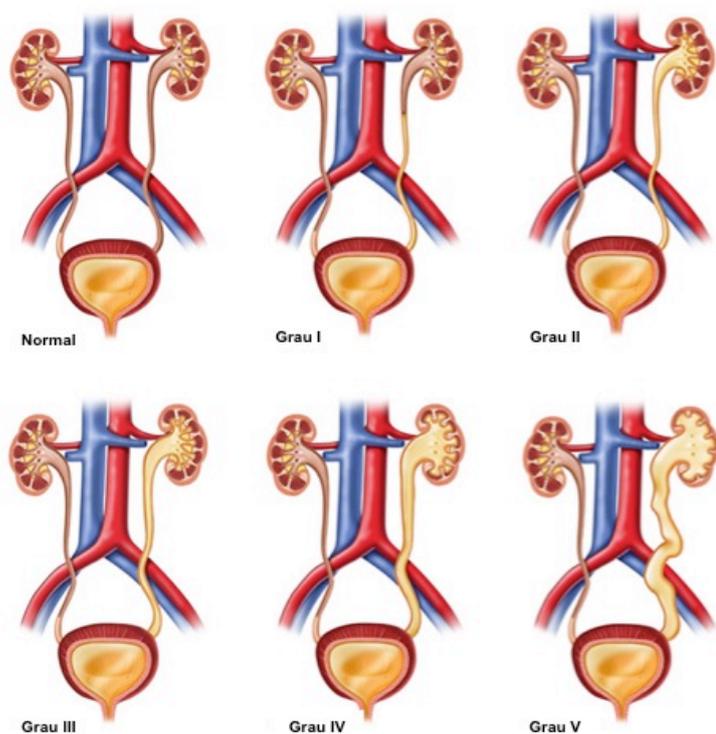


Figura 1.1. Esquema apresentando os graus do refluxo vésico-ureteral. **Grau I:** refluxo somente para o ureter; **Grau II:** refluxo até o rim, sem causar dilatação renal ou ureteral; **Grau III:** refluxo até o rim, causando pouca dilatação renal; **Grau IV:** refluxo até o rim, causando moderada dilatação renal; **Grau V:** refluxo até o rim, causando intensa dilatação renal e tortuosidade dos ureteres.

A UCM é a escolha padrão como técnica para a detecção de refluxo e estudos de acompanhamento, especialmente em casos iniciais. A UCM fornece a anatomia com precisão e possibilita a identificação do grau da doença. Embora o desenvolvimento de meios de contraste estabilizados tenha colocado os métodos ultrassonográficos em nível comparável de desempenho, esses métodos são raramente usados na prática clínica. Contudo, os diagnósticos utilizando UCM trazem várias preocupações, visto que o procedimento envolve sedação, cateterismo vesical, além de expor a criança a uma quantidade significativa de radiação, pois monitora o refluxo da urina da bexiga para os rins por raio-X ou imagens de cintilação (9,11,12). Além disso, este diagnóstico expõe 100 vezes mais à radiação do que o diagnóstico por CI, e necessita de ser realizado fora do período infeccioso e em vigência com antibióticos, além de obrigar o paciente a permanecer numa posição desfavorável (posição de supino). Assim, este é considerado um procedimento muito invasivo e incômodo (13). O diagnóstico realizado por CI reduz apreciavelmente a exposição à radiação, mas não permite a gradação adequada do refluxo, não é tão sensível e não permite a avaliação de detalhes anatômicos da bexiga e da uretra (14). Newman (15) demandou que parassem de utilizar UCM como exame de rotina para diagnósticos, após a primeira ocorrência de ITU, visto que, das 76 crianças submetidas a diagnóstico por UCM, apenas uma foi identificada com a necessidade de correção cirúrgica para tratamento de RVU.

Diversos estudos realizados mostraram que o RVU foi observado apenas entre 30% e 40% das crianças que apresentavam ITU, e adicionalmente, apenas 1,3% a 21,0% das crianças que sofriam pela primeira vez de ITU foram diagnosticadas com alto grau de RVU (15-17). Assim, a maioria das crianças foi examinada utilizando métodos invasivos sem a real necessidade. Porém, existem grandes consequências do não

diagnóstico de RVU em pacientes com graus mais severos da doença, de maneira que se torna importante a realização de testes para diagnóstico de RVU sempre que haja ocorrência de ITU. Com isso, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos não invasivo para um pré-diagnóstico de RVU, sem a necessidade do uso de métodos invasivos.

2 Metabolômica

É de amplo conhecimento que diagnósticos clínicos, prognósticos e seleção de tratamento estão demandando mais e mais de ferramentas capazes de ajudar na determinação e classificação de doenças, e no entendimento de alterações individuais (18). Com isso, nos últimos anos, estudos movidos pela ciências “ômicas” vêm fornecendo uma nova lógica para explicar as inúmeras causas de uma determinada doença e as possíveis conexões entre os estados de uma doença (19). A metabolômica, a área das ciências “ômicas” mais jovem, tornou-se uma ferramenta bastante poderosa para estudos relacionados a diagnósticos clínicos, e vem sendo extensivamente estudada nos últimos anos.

A metabolômica fornece uma estrutura revolucionária para a caracterização de um indivíduo em nível molecular, muitas vezes necessário para descobertas que podem ser importantes para o desenvolvimento de uma medicina personalizada. Adicionalmente, a metabolômica pode fornecer uma visão única sobre o impacto funcional ocasionado pela expressão gênica (Figura 1.2) (20,21).

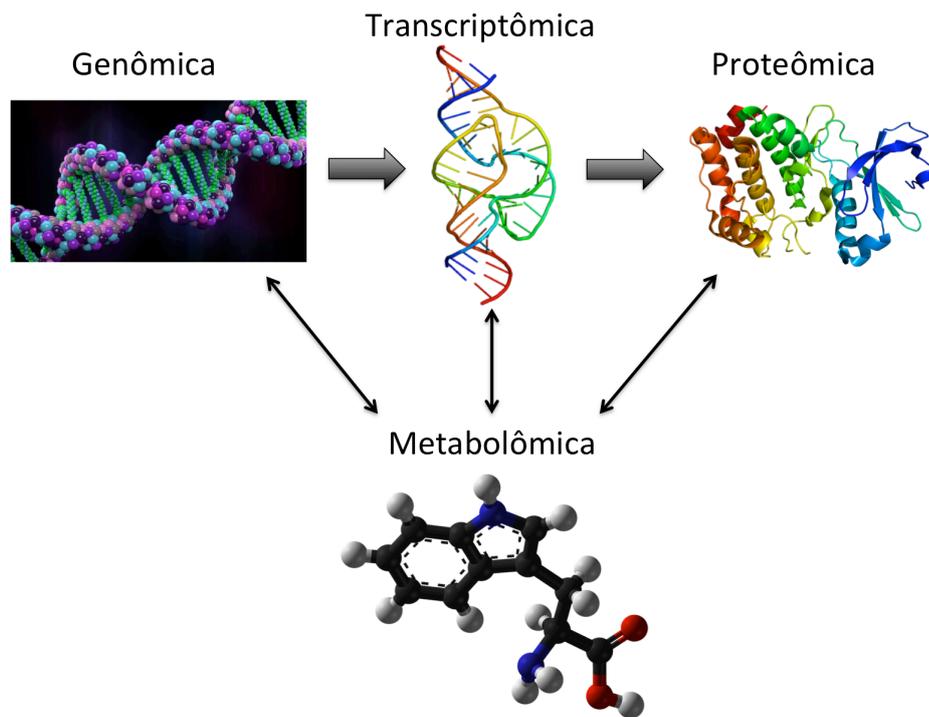


Figura 1.2. Conexão da metabolômica com as demais ômicas. O metaboloma interage e reflete a atividade do genoma, transcriptoma, e proteoma.

O metaboloma pode ser definido pela coleção de todos os metabólitos encontrados numa célula ou organismo que participam de reações metabólicas essenciais para o crescimento, manutenção e correto funcionamento deste organismo (22). Os metabólitos são fundamentais para o sistema biológico. Eles são intermediários e produtos do metabolismo e podem ser considerados como assinaturas diretas de uma atividade bioquímica, além de constituírem outras espécies e estruturas bioquímicas, como proteínas (aminoácidos), DNA e RNA (nucleotídeos) e paredes celulares (lipídeos) (23,24). Os metabólitos possuem diversas funções biológicas e estão envolvidos em muitos processos bioquímicos: glicólise, metabolismo de aminoácidos, ciclo da ureia e metabolismo de lipídio são alguns exemplos (25). Adicionalmente, eles também são responsáveis pelo fornecimento de diversas funções necessárias para a vida humana, como ATP para liberação de energia. Visto que os

metabólitos representam o produto molecular final de qualquer processo biológico, todas as alterações que possam contribuir para o fenótipo de um organismo serão provavelmente reveladas por eles (26). Enquanto a genômica tem habilidade de fornecer informações sobre a genética de uma pessoa, a metabolômica é capaz de fornecer uma leitura completa da saúde de um indivíduo, através da capacidade de revelar como um gene interage com o meio ambiente (27). Além disso, a análise metabolômica apresenta a possibilidade de identificar possíveis biomarcadores para a detecção e prognóstico de doenças, além da determinação da eficácia e segurança de intervenções farmacêuticas. Os metabólitos exercem uma função vital no sistema biológico para o entendimento de funções genéticas e enzimáticas desconhecidas podendo, ainda, revelar mecanismos moleculares ocultos na ação de fármacos, nas mudanças alimentares, nas intervenções através de atividades físicas e também pelos impactos psicossociais ocasionados pelo ambiente no qual o indivíduo vive (27).

Os metabólitos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química, possuem massa molecular < 1500 Da, e variam entre compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, como por exemplo metabólitos de maior polaridade e baixa massa molecular (como alguns aminoácidos) e compostos apolares e de alta massa molecular (assim como lipídios) (28).

Diferentes termos relacionados ao estudo do metaboloma são encontrados na literatura. Fiehn definiu que metabolômica é a análise global, com identificação e quantificação, de todos os metabólitos presentes em um sistema biológico (29); já metabonômica foi definida por Nicholson como a análise quantitativa da resposta metabólica de um sistema biológico a estímulos patofisiológicos ou modificação genética (30). No entanto, atualmente esses termos são indistintamente utilizados,

sendo que os procedimentos analíticos e de modelamento são os mesmos (31). Existem ainda outros termos, comumente empregados para descrever os diversos tipos de estudos dentro da área de metabolômica. Perfil metabólico (do inglês *metabolic profiling*) é voltado para identificação e quantificação de um grupo pré-definido de metabólitos em uma amostra biológica, que podem pertencer a mesma classe química ou à uma rota metabólica específica. A Impressão digital metabólica (do inglês *metabolic fingerprinting*) foca na rápida análise global através de técnicas de alta performance com o objetivo de classificar a amostra por reconhecimento de padrão (26).

Diferentes estratégias podem ser utilizadas em metabolômica dependendo de qual é o objetivo da investigação: análise metabolômica alvo e análise metabolômica global (do inglês *targeted and untargeted metabolomics*). A análise metabolômica global tem como objetivo a detecção da maior quantidade possível de metabólitos em um amostra biológica, enquanto que a análise metabolômica alvo tem como foco a análise de um ou alguns metabólito específicos que sejam bioquimicamente relevantes à hipótese estudada (32,33).

Independente das diversas terminologias encontradas na literatura, neste trabalho optou-se por abordar e utilizar o termo análise metabolômica global considerando que ela tem como objetivo a inspeção qualitativa do maior número possível de metabólitos de diferentes classes, avaliados por plataformas analíticas múltiplas, ortogonais e complementares, visando à classificação das amostras e identificação dos metabólitos discriminadores. Também será abordado e estudado o perfil metabólico, para análise de um grupo pré-definido de metabólitos, com base numa classe de compostos (nesse caso, aminoácidos).

Usualmente, o estudo metabolômico segue um fluxo de trabalho que vai desde as relevantes questões biológicas, design de experimentos, coleta, armazenamento e tratamento de amostra, seleção, otimização das técnicas de análise e aquisição de dados, e pré-processamento desses dados, seguido pela análise via métodos quimiométricos dos dados pré-processados, identificação de compostos significativos, interpretação biológica, validação de resultados e elaboração de novas hipóteses (34). Um diagrama de um típico fluxo de trabalho em metabolômica é brevemente descrito na figura 1.3

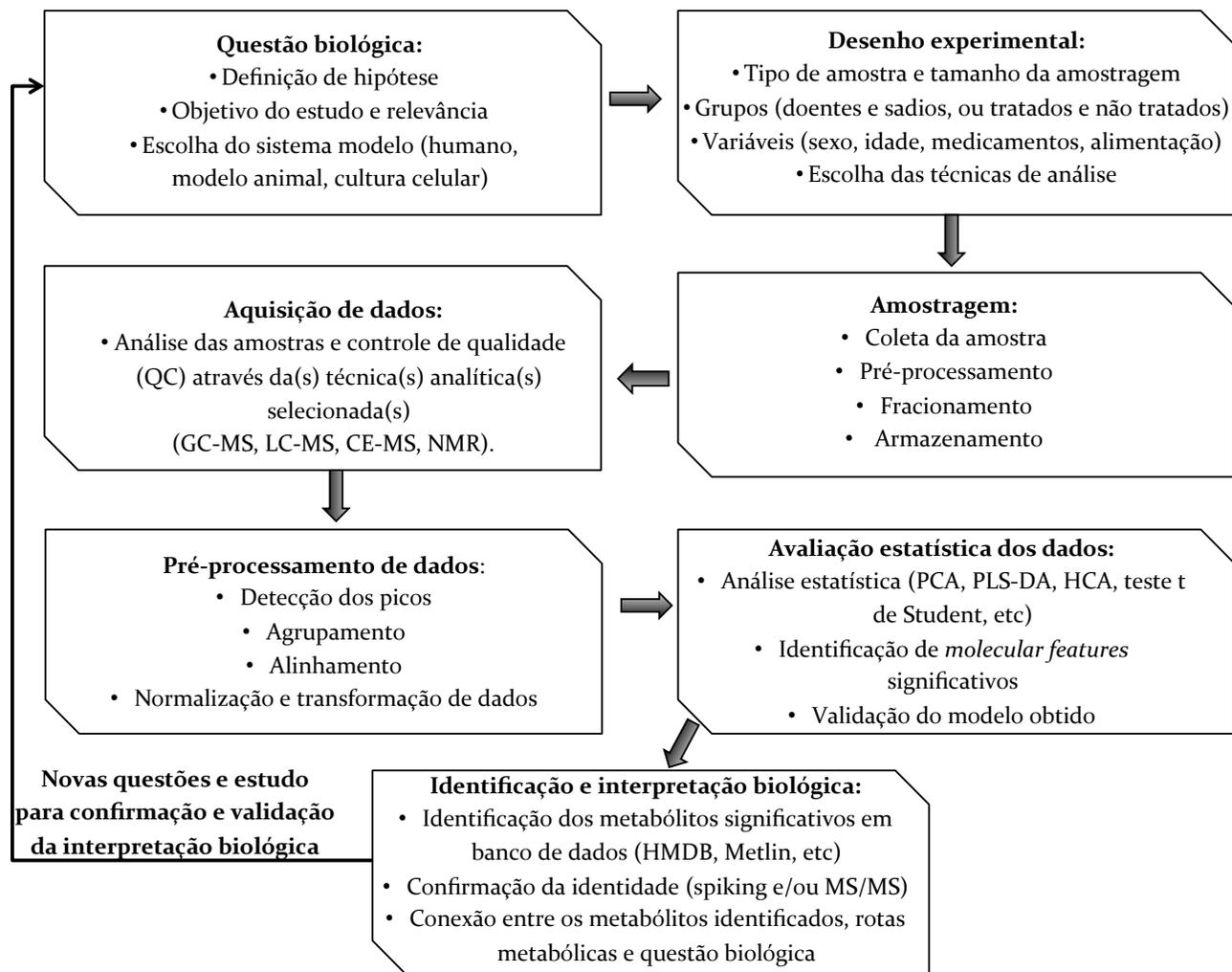


Figura 1.3. Diagrama de um típico fluxo de trabalho em metabolômica

3 Metabolômica e técnicas analíticas

Apesar do grande crescimento da metabolômica nos últimos anos, ela ainda enfrenta um grande desafio. A grande quantidade de metabólitos presente no organismo humano e as diferentes propriedades físicas e químicas e concentrações entre eles faz com que identificação do completo metaboloma seja uma tarefa muito difícil (35). A estimativa mais recente reporta a presença de 40153 metabólitos no metabolismo humano (36). Embora diferentes técnicas possam ser empregadas para a análise de metabólitos, as plataformas analíticas mais comumente utilizadas para análises metabolômica são espectrometria de massas (MS, do inglês mass spectrometry), usualmente acoplada à cromatografia gasosa (GC, do inglês gas chromatography), cromatografia líquida (LC, do inglês liquid chromatography), eletroforese capilar (CE, do inglês capillary electrophoresis), e ressonância magnética nuclear de prótons (^1H NMR, do inglês proton nuclear magnetic resonance) à uma dimensão (1D) (37). Porém, é importante citar que não é possível determinar todos os metabólitos presentes no metaboloma humano usando apenas uma plataforma analítica, e mesmo a combinação de várias técnicas analíticas não possibilita a cobertura de todo o metaboloma (38). Todas as plataformas empregadas em metabolômica apresentam vantagens e desvantagens e, uma vez que não existe uma técnica perfeita para a análise de todos os metabólitos, o ideal é o uso de um conjunto de técnicas para obter uma maior abrangência de metabólitos. Uma breve descrição sobre NMR e MS acoplada a diferentes técnicas de separação na análise metabolômica é apresentada na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Plataformas analíticas usadas em análises metabolômicas

Técnica analítica	Vantagens	Desvantagens
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> Diversos softwares de livre acesso para processamento de dados Disponibilidade de banco de dados <ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilidade Repetibilidade Resolução Análise de compostos voláteis 	<ul style="list-style-type: none"> Destrutiva Complicado e extensivo preparo de amostra/derivatização Não apropriada para moléculas não voláteis ou termicamente instáveis <ul style="list-style-type: none"> Baixa frequência analítica
LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> Diversos softwares de livre acesso para processamento de dados <ul style="list-style-type: none"> Sensibilidade Resolução Repetibilidade Preparo de amostra mais simplificado Diversas possibilidades de separação (colunas, fases móvel) e detecção 	<ul style="list-style-type: none"> Destrutiva Identificação depende de uso de padrões ou análise por MS/MS <ul style="list-style-type: none"> Baixa frequência analítica
CE-MS	<ul style="list-style-type: none"> Grande cobertura de metabólitos <ul style="list-style-type: none"> Alta resolução Rapidez Simplificado preparo de amostra Determinação de metabólitos mais polares (como aminoácidos) de forma mais simplificada. 	<ul style="list-style-type: none"> Destrutiva Poucos softwares de livre acesso para o processamento de dados <ul style="list-style-type: none"> Menor sensibilidade Baixa robustez Uso de líquido auxiliar para acoplamento CE-MS, causando diluição da amostra.
¹H NMR	<ul style="list-style-type: none"> Não necessita de métodos de separação ou purificação Detecta tanto compostos hidrofílicos como lipofílicos <ul style="list-style-type: none"> Reprodutível Rápido e robusto Não destrutiva 	<ul style="list-style-type: none"> Baixa sensibilidade Processamento dos dados mais complicado <ul style="list-style-type: none"> Complexidade espectral

3.1 NMR

A NMR é uma das técnicas de determinação estrutural mais utilizadas em muitas áreas da ciência, e há mais de duas décadas vem sendo amplamente aplicada em diversas áreas para estudos metabolômicos (35). Ela pode ser utilizada para a análise de qualquer amostra que contenha núcleos que possuam spin, sendo ^1H NMR a mais aplicada em análise de fluídos biológicos (39).

A NMR tem como vantagem a rapidez de análise, um grande número de compostos que pode ser por detectado em curto tempo de análise. Ao contrário de MS, a NMR não requer prévia separação ou derivatização para analisar amostras complexas. (20,39,40). A NMR apresenta ainda a vantagem de ser uma técnica não destrutiva, o que significa que a mesma amostra pode ser posteriormente utilizada para análises usando outras técnicas (35). Devido à alta abundância de núcleos ^1H em metabólitos, ^1H -NMR vem sendo amplamente usada para a metabolômica de fluídos biológicos, como urina e plasma. Em um espectro de ^1H -NMR, cada sinal corresponde a um composto em particular (41). Entretanto, a técnica apresenta algumas desvantagens como baixa sensibilidade, baixa resolução espectral e a necessidade de um grande volume de amostra, além de ser uma técnica de alto custo (25).

Apesar de todas as vantagens oferecidas por NMR, a cobertura metabólica e limite de detecção oferecidos por MS são superiores (42,43).

3.2 GC-MS

A GC se destaca por ser a primeira técnica de separação usada em metabolômica, e se mantém atualmente como uma das técnicas mais amplamente utilizadas (44). A separação por GC ocorre pela vaporização dos analitos presentes na amostra injetada, geralmente através da aplicação de um gradiente de temperatura enquanto a fase móvel, um gás inerte (usualmente hélio), percorre a fase estacionária (coluna) transportando os analitos. A separação ocorre devido às diferenças nos pontos de ebulição e polaridade (45,46).

Comparada a outras técnicas acopladas a MS, a GC apresenta como vantagens a alta sensibilidade e um excelente poder de resolução, sendo que o uso de GC bidimensional oferece a possibilidade de uma resolução ainda maior (20). Adicionalmente, o extenso e reprodutível perfil de fragmentação gerado por GC faz com que a identificação de metabólitos seja mais simplificada. Uma outra facilidade e benefício de GC-MS é a existência de bibliotecas espectrais para a identificação de metabólitos de uma forma mais rápida e simples (47). No entanto, a técnica também apresenta algumas limitações. Apenas compostos termicamente estáveis e com alta pressão de vapor pode ser analisados por GC-MS. Caso as amostras em estudos contenham uma complexa mistura de compostos, um extensivo e complicado preparo de amostra se torna necessário para garantir que os compostos sejam propriamente volatilizados e analisados por GC. Adicionalmente, uma maior variabilidade é observada em análises metabolômicas por GC se comparada com LC, principalmente devido ao processo de derivatização (23,47).

3.3 LC-MS

A LC-MS é uma técnica analítica de alta eficácia em metabolômica pois, diferentemente de GC, LC apresenta a capacidade de analisar um maior número de compostos sem a necessidade de derivatização ou longos preparos de amostra (46,47). Métodos de LC para metabolômica geralmente requerem tempos de análises curtos e são capazes de detectar uma ampla faixa de compostos, tornando-se uma técnica ideal para análises metabolômicas global (48).

Devido às diversas possibilidades de métodos, a LC é capaz de separar diferentes classes de compostos e com diferentes propriedades, desde compostos hidrofílicos a hidrofóbicos, por exemplo (49). O método empregado por LC é dependente do tipo de amostra analisada e dos compostos presentes nessa mistura. As propriedades químicas desses compostos irão determinar o tipo de coluna e de fase móvel que deve ser empregado (47). No entanto, LC-MS também apresenta algumas desvantagens, como a supressão iônica, que ocorre devido à coeluição de compostos, o que ocorre principalmente devido à eluição de muitos metabólitos no volume morto (49).

Os estudos metabolômicos por LC-MS inicialmente reportados eram baseados em fase reversa (RP, do inglês reversed phase) usando colunas C₁₈ com partículas de 3,5 µm (50). Atualmente, colunas com partículas menores que 2 µm têm sido as mais utilizadas. O uso de RP oferece diversas vantagens: alto poder de separação, sensibilidade, disponibilidade de diversos tipos de colunas, são algumas delas (51,52). Ainda que a RP possibilite a determinação de um amplo número de metabólitos, compostos mais polares ou iônicos são dificilmente retidos e, na maioria dos casos eluem juntamente com o volume morto. Entretanto, métodos empregando

pareamento iônico foram desenvolvidos possibilitando a análise desses compostos (53–55). Além disso, o surgimento da cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC, do inglês hydrophilic interaction liquid chromatography) aumentou ainda mais a possibilidade de analisar metabólitos hidrofílicos, e vem sendo bastante aplicada em metabolômica (56–58).

As diversas vantagens, como preparo de amostra mais simplificado para análise de fluidos biológicos, além de maior acessibilidade (visto que equipamentos de LC são bastante comuns em laboratório bioanalíticos), faz de LC-MS uma técnica mais atrativa e, por isso, ela vem sendo extensivamente utilizada em metabolômica. Atualmente, é uma das técnicas mais importantes e de principal escolha para análise global e de perfil metabólico (45).

3.4 CE-MS

O acoplamento de CE à MS já provou ser uma poderosa técnica devido à alta eficiência e seletividade de separação da CE e a detecção seletiva do MS, possibilitando a determinação de inúmeros metabólitos, muitos dos quais, no organismo humano são polares e iônicos (59). A análise desses compostos por CE é mais favorável se comparada com as demais técnicas, pois a separação desses compostos se baseia intrinsecamente na mobilidade eletroforética do analitos, a qual é dependente da razão massa/carga, enquanto nos outros casos uma interação com as fases estacionárias e/ou móvel é necessária (51,60).

Outras vantagens de CE são a rapidez de análise, alta eficiência, versatilidade, custo relativamente menor se comparado com as demais técnicas, além de requerer menores volumes de amostras e reagentes (59). Assim como LC, CE requer um simplificado preparo de amostra ou nenhum preparo de amostra, como em urina. O modo de separação mais utilizado em metabolômica é a eletroforese capilar de zona, qual é normalmente referida apenas como CE .

Apesar das inúmeras vantagens, CE não está entre as técnicas mais utilizadas em metabolômica (27). A baixa sensibilidade, problemas de repetibilidade devido à variação nos tempos de migração, robustez e o emprego de um líquido auxiliar (SHL, do inglês sheath liquid) para um adequado acoplamento de CE-MS, podem ser atribuídos como principais motivos (61). Soluções para alguns desses problemas vem sendo estudadas ao longo dos últimos anos. O desenvolvimento da interface sem líquido auxiliar (*sheathless*) pode ser citado como um dos avanços relacionados ao problema de sensibilidade, fornecendo uma melhora na sensibilidade na magnitude de duas ordens quando comparada com a interface clássica usada em CE-MS (62). Melhoras referente a robustez de CE-MS ainda precisam ser investigadas, aumentando assim a viabilidade e o valor da técnica em metabolômica (60). Apesar das desvantagens citadas, o uso de CE-MS como uma alternativa ou como técnica complementar para a análise de metabólitos continua sendo importante para o aumento da cobertura de metabólitos (63).

4 Tratamento de Dados

O tratamento de dados é um grande desafio em investigações metabolômicas. As técnicas analíticas utilizadas em análises metabolômicas geram uma grande quantidade de dados complexos, os quais dificilmente podem ser analisados sem que um pré-processamento seja realizado. A qualidade do processamento dos dados é um passo crucial e exerce um grande impacto na qualidade da análise estatística, e conseqüentemente na identificação e quantificação dos metabólitos, podendo resultar em interpretações biológicas equivocadas (64,65). Por isso, torna-se necessário e de extrema importância o uso de ferramentas que possibilitem o apropriado processamento desses dados.

No geral, o tratamento de dados em metabolômica pode ser dividido em dois passos principais: pré-processamento e análise de dados, o que inclui a análise estatística.

4.1 Pré-processamento

O pré-processamento de dados é o primeiro passo para o tratamento dos dados obtidos por análise metabolômicas, e tem como objetivo a extração de todas as informações importantes dos dados brutos e resumi-los em um única tabela, a matriz de dados (66). O pré-processamento é um passo muito importante em estudos metabolômicos e deve ser minuciosamente executado, uma vez que pode afetar a precisão e reprodutibilidade dos resultados obtidos, comprometendo a integridade do

estudo realizado. O passo é realizado em algumas etapas e tem como objetivo preparar os dados brutos obtidos para a etapa de análise de dados (tratamento estatístico) (65).

Diferentes processos constituem o pré-processamento de dados, como detecção de pico, alinhamento, agrupamento e normalização (67). O objetivo do pré-processamento é diminuir a quantidade de dados inicialmente gerados para um formato no qual a análise estatística seja mais fácil, eficiente e robusta, além de otimizar a matriz resultante dos picos identificados. Existem diversos softwares e ferramentas para o pré-processamento de dados provenientes de análises por técnicas de separação acopladas à espectrometria de massas, com diferentes métodos de análises e algoritmos. Existem uma série de softwares, como: XCMS (68), XCMS online (69), MetaboAnalyst (70), Mass Profiler Professional (Agilent Technologies), Mzmine (71), Progenesis QI (Nonlinear Dynamics, Waters Corporation), MetAlign (72) Compound Discoverer (Thermo Fisher Scientific), entre outros. Nesse trabalho, optou-se por utilizar o XCMS, um dos métodos mais utilizados em metabolômica.

O XCMS é um software de livre acesso, que pode ser executado na plataforma R ou online (68,69). O XCMS foi inicialmente desenvolvido para o pré-processamento de dados de LC-MS, mas com adequadas modificações nos comandos utilizados, é possível utilizá-lo para o pré-processamento de dados provenientes de outras técnicas analíticas, como GC-MS e CE-MS. O pré-processamento através do XCMS é realizado aplicando-se diferentes algoritmos e é basicamente realizado em três importantes passos: (1) detecção de picos: identificação de picos em cada uma das amostras analisadas; (2) alinhamento do tempo de retenção: combinação de picos que apresentam tempos de retenções similares entre as diversas amostras analisadas, e utilização dessas combinações para o alinhamento do tempo de retenção; (3)

preenchimento de picos: preenchimento dos picos não identificados inicialmente pelo *peak detection*, esse passo é executado através da integração dos dados brutos em um tempo de retenção apropriado. Por último é realizada normalização e escalonamento dos dados, as quais têm como objetivo a correção de variações nas intensidades dos picos (34,65,73).

4.2 Análise de dados

A análise dos dados é o passo seguinte à obtenção da matriz de dados, a qual inclui diferentes tipos de análise estatística e exploração dos dados. Os métodos e termos frequentemente utilizados incluem: análise dos componentes principais (PCA, do inglês, Principal Component Analysis), um método não supervisionado, que converte dados de alta dimensão em menores dimensões através da projeção desses dados em um subespaço dimensional, mantendo ao mesmo tempo a maior variância possível em relação aos dados originais; análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês Partial Least Squares Discriminant Analysis), um método supervisionado usado para otimizar a separação entre diferentes grupos, através da conexão das matrizes de dados X (intensidades) e Y (grupos, classes), e a análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA, do inglês orthogonal partial least squares discriminant analysis) que é uma extensão do PLS e usa informações na matriz Y para decompor a matriz X em blocos de variação estruturada correlacionada à ortogonal Y (73-75). Adicionalmente, testes estatísticos univariados também são empregados para a discriminação de metabólitos individuais.

ANOVA (análise de variância) e Kruskal-Wallis para múltiplas classes (≥ 3), e Mann-Whitney U e t de Student para duas classes, são alguns exemplos de testes usualmente aplicados em metabolômica (73).

Existem diversas ferramentas disponíveis para a análise de dados de metabolômica. Nos últimos anos novas ferramentas vem sendo constantemente desenvolvidas devido ao crescimento de metabolômica e à necessidade de ferramentas que auxiliem na geração de resultados mais confiáveis e de qualidade (76).

5 RVU e as ciências ômicas

O RVU é uma doença que não foi muito investigada através das ciências ômicas. O primeiro estudo reportado em 2008, investigou a relação de mapas peptídicos urinários e RVU usando CE-MS com o objetivo de desenvolver um novo método diagnóstico não-invasivo. Usando diferentes ferramentas para tratamento dos dados, o autor reportou a identificação de imunoglobulina G como possível candidato a biomarcador para RVU. Ele ainda relatou que foram encontradas correlações entre os mapas peptídicos de RVU e controles. No entanto, ele cita que a existência de um biomarcador ainda é incerta, e recomenda que maiores investigações sejam realizadas (77). Em 2012, Mischak et al reportaram um estudo usando a proteômica e CE-MS como ferramenta para a identificação de possíveis biomarcadores para RVU. Urina de 18 pacientes com RVU primário (grau IV ou V) e 19 pacientes sem RVU foram analisadas. Nove peptídeos urinários foram identificados, os quais estavam regulados diferentemente, e um classificador para RVU foi gerado com base nesses peptídeos.

Uma subsequente avaliação cega foi realizada em 17 pacientes com RVU grau IV ou V e 19 pacientes sem RVU com 88% de sensibilidade e 79% de especificidade, sendo que cinco dos nove biomarcadores urinários foram sequenciados com sucesso. Esse estudo comprova que existem possíveis biomarcadores capazes de discriminar RVU, no entanto, esses resultados não foram validados até o presente momento (78). O único estudo em metabolômica foi reportado em 2012, em que se estudou o perfil metabólico de RVU através da determinação quantitativa de aminoácidos via CE com detecção UV/vis. O objetivo foi de buscar uma via alternativa aos exames diagnósticos invasivos, os quais são empregados para diagnóstico de RVU. Foi possível a quantificação de apenas quatro dos vinte aminoácidos investigados, que foram usados para a análise estatística. Apesar de os resultados apresentarem valores estatísticos satisfatórios e poder de predição, a separação dos grupos controles e RVU não foi obtida. A autora sugere que isso se deve à baixa quantidade de aminoácidos quantificados, e sugere que um estudo mais aprofundado poderá ser capaz de identificar um biomarcador para a doença (79). Esses estudos reforçaram a ideia de uma possível correlação entre proteínas e metabólitos com RVU, e estimularam investigar a metabolômica como uma nova abordagem para identificação de possíveis metabólitos que caracterizem RVU, como para a alternativa aos exames de diagnósticos invasivos.

6 Análise de aminoácidos em urina

Os aminoácidos constituem uma importante classe de compostos químicos desempenhando papéis essenciais em diversas áreas da ciência, incluindo nutrição humana, alimentos, síntese de medicamentos e cosméticos, e metabolômica para citar

alguns. Em análises clínicas, a determinação de aminoácidos em urina, plasma ou outro fluido biológico pode ajudar no diagnóstico e no monitoramento de doenças (80–82). Aminoácidos possuem uma grande relevância em síntese molecular, pois eles são precursores de diversas reações. Adicionalmente, eles são responsáveis pelo regulamento de rotas metabólicas chave e processos que são essenciais para a saúde, desenvolvimento, reprodução e homeostase de qualquer organismo (83). Vários estudos na literatura já mostraram possíveis correlações entre aminoácidos e determinada doença, destacando a importância desses compostos para aumentar o conhecimento bioquímico e resolver diferentes problemas na medicina (84–87).

Os rins estão constantemente filtrando, degradando e reabsorvendo pequenas moléculas, e a urina é um dos principais transportadores de compostos hidrofílicos residuais, incluindo aminoácidos. A faixa de reabsorção de aminoácidos pelos tubos renais é de 97% a 99%. Adicionalmente, o rim é o órgão de maior responsabilidade para a eliminação de glutamina e prolina provenientes do sangue arterial (88). Visto que a urina pode carregar muita informação sobre aminoácidos, o uso de urina como amostra para um estudo clínico parece bastante adequado. Além disso, a urina possui algumas vantagens em relação a outros fluidos biológicos. Pode ser coletada facilmente de forma não invasiva, não requer um complexo preparo de amostra, além de poder ser coletada a qualquer hora do dia.

A LC-MS tem sido frequentemente aplicada para a determinação de aminoácidos, no entanto, métodos reportando a determinação quantitativa de aminoácidos em urina ainda não estão completamente estabelecidos. Métodos usando colunas com diferentes composições químicas, derivatização e pareamento iônico têm sido empregados; no entanto, alguns desses métodos cromatográficos não fornecem

apropriada retenção para todos os aminoácidos, e efeitos de supressão iônica podem afetar a precisão da quantificação e a sensibilidade do método. (89–91). A GC-MS é uma técnica alternativa para a análise de aminoácidos, mas visto que esses compostos não são voláteis, métodos de GC-MS requerem extensos procedimentos de derivatização, os quais podem causar perdas da amostra, comprometendo a informação adquirida (44). A eletroforese capilar (CE) provou ser um técnica analítica muito útil e de grande valor para análise clínica (92). Como já citado, a eletroforese capilar acoplada ao espectrômetro de massa com ionização por *electrospray* (CE-MS) é uma ferramenta bastante atrativa para a determinação de pequenos compostos iônicos ou ionizáveis em amostras biológicas. (93). Visto que a CE oferece um alto poder de separação e a MS possui a habilidade de fornecer a informação estrutural de um composto, o acoplamento melhora a confiabilidade da análise sem a necessidade de pré-tratamento de amostra complicados e extensos, derivatização ou o uso de um analisador específico para aminoácidos. A possibilidade de analisar aminoácidos em urina já foi demonstrada por diversos autores (81,94–97). No geral, boas separações e sólidos desenvolvimentos de método têm sido reportados. No entanto, nesse trabalho, tem-se como objetivo melhorar a resolução da separação dos isômeros L-leucina, L-isoleucina, e L-alloisoleucina, além da investigação de aminoácidos adicionais e ainda demonstrar a possibilidade da quantificação desses aminoácidos em urina usando um MS do tipo Ion Trap como sistema de detecção.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

1 Objetivos Gerais

Investigação do refluxo vésico-ureteral, por meio de abordagens metabolômicas alvo e global por CE-MS, CESI-MS, RPLC-MS e HILIC-MS, visando um diagnóstico alternativo.

2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e otimizar um método para determinação quantitativa de aminoácidos em urina de crianças, usando CE-IT-MS.
- Analisar quantitativamente, por CE-IT-MS, uma série de aminoácidos em amostras de urina de crianças saudáveis e de crianças com RVU, e comparar as diferenças através de tratamento estatísticos.
- Análise das amostras de urina dos grupos controle e teste (RVU) por RPLC-MS.
- Análise das amostras de urina dos grupos controle e teste (RVU) por CESI-TOF-MS.
- Tratamento dos dados da análise metabolômica global com a finalidade de encontrar e identificar possíveis metabólitos discriminantes para o diagnóstico precoce de RVU.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

1 Reagentes e materiais

Reagentes de grau LC-MS foram empregados no preparo dos eletrólitos (BGE) e líquido auxiliar (SHL), exceto solução 25% hidróxido de amônio obtido da Acros Organics (Geel, Belgium). Metanol e isopropanol foram obtidas da Biosolve BV (The Netherlands) para experimentos de CE-MS e de Sigma-Aldrich (U.S.A.) para experimentos de LC-MS. A acetonitrila, ácido fórmico, ácido acético, formiato de amônio, acetato de amônio foram obtidas da Sigma-Aldrich (U.S.A.). Todas as soluções padrão aquosas, assim como fase móvel, eletrólito e líquido auxiliar foram preparados utilizando água ultrapura (sistema de purificação, Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.)

Os padrões utilizados foram todos de grau analítico e as respectivas soluções empregadas foram preparadas na concentração de 50 mmol L⁻¹ contendo 0,10 ou 0,20 mol L⁻¹ HCl para as análises e filtradas com seringa com filtro de membrana 0,2 µm (Dassel, Germany) por CE-MS na concentração de 10 mmol L⁻¹ contendo mmol L⁻¹ HCl ou 0,10 mmol L⁻¹ NaOH para análises por LC-MS.

Vortex 3 (Ika Works, U.S.A), Vortex Genie 2T (VWR, The Netherlands), banho de ultrassom Elmasonic P (Germany), pHmetro Metrohm 691 e 827 (Herisau, Switzerland) microcentrífugas Mini Spin plus, 5424 e 5702 (Eppendorf™, U.S.A) foram utilizados neste trabalho.

2 Otimização de método para a determinação aminoácidos por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas

2.1 Instrumentação e condições

Os experimentos de CE-MS foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (Beckman P/ACE MDQ) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo *ion trap* (Bruker HCT esquire 3000 plus) através de uma interface com líquido auxiliar (SHL) coaxial (Agilent) configurada para uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). O controle do equipamento de CE foi feito pelo software 32 Karat 8,0 (Beckman), enquanto o controle do espectrômetro de massas e aquisição de dados foi adquirido pelo Esquire Control™ e a avaliação dos dados com ESI Compass DataAnalysis 4,1 (Bruker) e Skyline 3,7 (98), software de livre acesso (<http://proteome.gs.washington.edu/software/skyline>).

O SHL composto por 0,5% (v/v) ácido fórmico em 60% (v/v) metanol-água foi introduzido através de um bomba-seringa (KD Scientific) a uma vazão de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. O ESI foi operado no modo positivo aplicando-se uma tensão no capilar de 4,5 kV. Outros parâmetros de MS incluem faixa de *scan* de 50-275 *m/z*, gás secante a uma vazão de 5 L min^{-1} , temperatura de 200 °C e um tempo de acumulação de íons de 15 ms. Capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, U.S.A.) com um diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 85 cm foram usados em todos os experimentos. Novos capilares foram condicionados por pelo menos 20 min através da aplicação de pressão de 20 psi com 1 mol L^{-1} NaOH, seguido de 20 min com água deionizada e 20

min com o BGE (0,80 mol L⁻¹ ácido fórmico contendo 15% metanol). O condicionamento do capilar foi sempre conduzido com a extremidade do capilar fora da fonte do MS. Antes de iniciar os trabalhos diários, o capilar foi condicionado por pressão (20 psi) com 0,1 mol L⁻¹ NaOH por 3 minutos, água deionizada por 4 min e BGE por 5 min. Entre cada análise, o capilar foi lavado com BGE por 3 minutos e no final dos dias, o capilar foi lavado por pressão (20 psi) com água deionizada por 3 min e ar por 4 min. As amostras foram introduzidas no sistema por injeção hidrodinâmica, primeiramente pela injeção de uma solução de 12,5% (v/v) NH₄OH por 9 s a 0,5 psi, seguido pela injeção da amostra por 20 s a 0,6 psi. Os seguintes parâmetros de CE foram avaliados na otimização do método: tensão aplicada e temperatura do capilar.

2.2 Preparo da amostra de urina

Para otimização do método, foi preparada uma mistura de cinco amostras de urina coletadas de crianças saudáveis a partir da adição de 1 mL de cada amostra de urina em um tubo falcon. Essa mistura foi separada em alíquotas de 2 mL e mantida a -80 °C. Previamente ao uso, uma alíquota foi descongelada e centrifugada a 14000 g por 15 min. Uma mistura dos padrões dos 27 aminoácidos em estudos (allo-isoleucina (Allo), alanina (Ala), arginina (Arg), aspartato (Asp), asparagina (Asn), beta-alanina (βala), carnosina (Carn), citrulina (Cit), cisteína (Cys), GABA, glutamato (Glu), glutamina (Gln), glicina (Gly), 4-Hidroxiprolina (Hyp), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), ornitina (Orn), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e valina (Val)) foi adicionada na

faixa de concentração de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$, assim como metionina sulfona, usada como padrão interno, na concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As concentrações detalhadas de cada aminoácido adicionado à mistura de urina está descrita na Tabela 3.1. A diluição final da mistura de urina usada na otimização do método foi de 3:1 (v/v).

Tabela 3.1. Concentrações das soluções estoques dos aminoácidos e concentração final adicionada a mistura de urina para a otimização do método

Aminoácido	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração final na mistura de urina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Ala	2856	600,0
α Ile	286,0	60,00
Arg	286,0	60,00
Asn	714,0	150,0
Asp	1428	300,0
β Ala	2856	600,0
Car	286,0	60,00
Cit	714,0	150,0
Cys	2856	600,0
GABA	1428	300,0
Glu	714,0	150,0
Gln	714,0	150,0
Gly	2856	600,0
γ Hyp	714,0	150,0
His	286,0	60,00
Ile	286,0	60,00
Leu	286,0	60,00
Lys	286,0	60,00
Met	714,0	150,0
Orn	714,0	150,0
Phe	714,0	150,0

Pro	286,0	60,00
Ser	1428	300,0
Thr	1428	300,0
Trp	286,0	60,00
Tyr	286,0	60,00
Val	714,0	150,0

2.3 Otimização do método

A otimização da interface, composição do BGE e parâmetros de MS foram realizados usando a mistura de urina descrita na seção 2.2, O método foi otimizado na seguinte ordem: interface de CE-MS interface, parâmetros de CE começando pela otimização do eletrólito de corrida (BGE) e por último os parâmetros de MS foram otimizados. Condições ótimas de separação foram obtidas usando um SHL composto de 0,5% (v/v) ácido fórmico em 60% (v/v) metanol-água entregues à uma vazão de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. Nitrogênio foi usado como gás nebulizador e inicialmente estabelecido à 8 psi. Os seguintes parâmetros de MS foram aplicados: gás secante à uma vazão de 5 L min^{-1} e temperatura à 200 °C. Os parâmetros de CE foram: tensão de 25 kV, temperatura do capilar 20 °C, injeção hidrodinâmica a 0,6 psi por 20 s com prévio stacking mediado por pH através da injeção NH_4OH a 12,5% (v/v) a 0,5 psi por 9 s. A composição do BGE foi 0,8 mol L^{-1} ácido fórmico com 15% (v/v) metanol.

2.4 Validação

A linearidade foi estabelecida usando uma série de padrões de calibração (5 níveis de concentração) por analito. A tabela 3.2. mostra a concentração detalhada das cinco soluções padrões de calibração para cada aminoácido estudado. O LD foi calculado baseado no erro padrão do sinal (σ) e na inclinação (S) da curva analítica para cada analito, como sendo $3,3 \times \sigma/S$. O LQ foi calculado como sendo $10 \times \sigma/S$, de acordo com a ICH (99). A precisão foi avaliada através da análise repetida da mistura da amostras de urina dos cinco voluntários com a adição de uma mistura das soluções padrões de aminoácidos no nível de concentração intermediário.

Tabela 3.2. Concentrações detalhadas ($\mu\text{mol L}^{-1}$) de cada aminoácido empregado na construção da curva analítica

Aminoácido	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Ala	200	400	600	800	1000
Alle	20,0	40,0	60,0	80,0	100
Arg	20,0	40,0	60,0	80,0	100
Asn	50,0	100	150	200	250
Asp	100	200	300	400	500
βAla	200	400	600	800	1000
Car	20,0	40,0	60,0	80,0	100
Cit	50,0	100	150	200	250
Cys	200	400	600	800	1000
GABA	100	200	300	400	500
Glu	50,0	100	150	200	250
Gln	50,0	100	150	200	250
Gly	200	400	600	800	1000
4Hyp	50,0	100	150	200	250

Aminoácido	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
His	20,0	40,0	60,0	80,0	100
Ile	20,0	40,0	60,0	80,0	100
Leu	20,0	40,0	60,0	80,0	100
Lys	20,0	40,0	60,0	80,0	100
Met	50,0	100	150	200	250
Orn	50,0	100	150	200	250
Phe	50,0	100	150	200	250
Pro	20,0	40,0	60,0	80,0	100
Ser	100	200	300	400	500
Thr	100	200	300	400	500
Trp	20,0	40,0	60,0	80,0	100
Tyr	20,0	40,0	60,0	80,0	100
Val	50,0	100	150	200	250

3 Análise quantitativa de aminoácidos em urina e avaliação estatística

Para a análise quantitativa dos aminoácidos, amostras de urina de crianças com e sem RVU (testes e controles) foram coletadas no Departamento de Pediatria Nefrológica do Hospital Universitário de Leuven (UZ Leuven) em colaboração com a Profa. Dra. Djalila Mekahli. As informações detalhadas de cada amostra estão descritas na Tabela 3.3. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do UZ Leuven, Bélgica (referência: S57431 (M11389)). Imediatamente após a coleta, cada amostra foi centrifugada a 14000 *g* por 15 min para remover quaisquer “*debris*” (partículas) celulares presentes na amostras. O sobrenadante de cada amostra foi então dividido em alíquotas e armazenados a -80 °C até o momento do uso. Antes da injeção e análise

no equipamento de CE-MS, uma alíquota de 2 mL cada amostra foi descongelada e diluída em água ultrapura contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico. A adição de ácido nas amostras tem como finalidade garantir que procedimento de pré-concentração (stacking mediado por pH) seja efetivo. Além disso, em todas as amostras, metionina sulfona foi adicionada como padrão interno. A diluição final das amostras foi de 3:1.

Tabela 3.3. Informações das amostras de urina coletadas na Bélgica

Identificação	Tipo	Gênero	Idade (meses)	Grau RVU
1	Controle	F	129	-
2	Controle	F	40	-
3	Controle	M	65	-
4	Teste	F	55	I
5	Controle	M	120	-
6	Controle	M	183	-
7	Controle	F	103	-
8	Controle	F	92	-
9	Controle	M	89	-
10	Controle	M	80	-
11	Controle	M	168	-
12	Controle	F	159	-
13	Controle	M	20	-
14	Controle	F	94	-
15	Controle	M	150	-
16	Controle	F	34	-
17	Teste	F	76	II
18	Controle	M	83	-
19	Controle	F	120	-
20	Teste	M	8	V
21	Teste	M	7	V

Identificação	Tipo	Gênero	Idade (meses)	Grau RVU
22	Controle	M	3	-
23	Controle	M	142	-
24	Teste	M	15	II
25	Teste	M	31	I
26	Teste	M	faltante	I-III
27	Teste	F	42	I
28	Teste	F	80	II
29	Teste	F	4	II-V
30	Teste	M	172	III
31	Teste	M	18	V
32	Teste	M	9	V
33	Controle	M	24	-
34	Teste	F	22	III
35	Teste	F	60	II
36	Teste	M	123	IV-V
37	Teste	M	49	V
38	Teste	F	128	III-V
39	Teste	F	94	II
40	Teste	M	93	II-III
41	Teste	M	59	V
42	Teste	F	58	II-III
43	Teste	M	35	V
44	Controle	F	9	-

A tabela dos resultados das concentrações de aminoácidos encontrados nas amostras de urina foram estatisticamente avaliados a fim de visualizar e descobrir correlações entre as concentrações obtidas e os grupos em estudo. Ferramentas estatísticas, tais como análise de componentes principais (PCA), análise discriminante

com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e teste t, foram empregadas usando a plataforma online de livre acesso, MetaboAnalyst (70).

4 Otimização de colunas e fase móvel para RPLC e HILIC-MS

4.1 Instrumentação e condições

Para a otimização dos métodos cromatográficos, foi utilizado RP-MS e HILIC-MS. Todos os experimentos de LC-MS foram realizados no laboratório de pesquisa e desenvolvimento do Grupo Fleury em parceria com o Dr. Valdemir M. Carvalho, Dra. Karina H. M. Cardozo e MSc. Jéssica S. Salgueiro. A otimização dos métodos foi feita utilizando um sistema cromatográfico a líquido de ultra performance (UPLC, do inglês Ultra Performance Liquid Chromatography) (ACQUITY UPLC I-Class, Waters Corporation), equipado com uma bomba binária e injetor automático, contendo uma interface ortogonal do tipo electrospray, utilizada para acoplar o sistema ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo *time-of-flight* (QTOF) (Synapt G1, Waters Corporation). O QTOF-MS foi operado em ambos os modos, positivo e negativo. As condições ótimas de análise foram: temperatura da fonte 120 °C, temperatura do gás de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás do cone 50 L h⁻¹ e do gás de dessolvatação 750 L h⁻¹; a tensão do capilar foi de 3 kV ESI+, tensão do cone de amostragem e extração 17 V e 4,0V, respectivamente. Os dados foram adquiridos no modo contínuo e faixa de scan 70 a 750 Da. Para garantir maior precisão de massas durante a aquisição dos dados no MS, um “*lock-mass*” (padrão de referência) de leucina enkephalin (*m/z* 556,2767 no modo positivo) na concentração de 50 ng L⁻¹ foi utilizado através de uma interface

lockspray à uma vazão de 100 µl min⁻¹. As amostras e padrões em estudo foram mantidas no amostrador a 4° C e injetadas em triplicatas. Um volume de 10 µL de cada solução foi injetado nas colunas em estudo. As condições cromatográficas foram otimizadas com o objetivo de obter a maior cobertura de metabólitos, melhor seletividade, separação e eficiência. Diversas colunas de RP e HILIC foram estudadas em conjunto com diversas composições de fase móvel, as quais estão detalhadas na seção 4.2. Ambos o espectrômetro de massas e o cromatógrafo são controlados pelo software MassLynx™ (Waters Corporation).

4.2 Colunas e composição da fase móvel

Colunas de RP e HILIC com diferentes composições químicas foram avaliadas; complementarmente, a composição e o pH das fases-móveis (condições ácidas e básicas) também foram testadas. As colunas e condições estudadas estão descritas nas Tabelas 3.4. e 3.5.

Tabela 3.4. Especificações das colunas avaliadas

Nome	Marca	Comprimento (mm)	Tamanho da partícula (µm)	Faixa de pH
BEH C18	Waters	50 x 2,1	1,7	1 - 12
CSH C18	Waters	100 x 2,1	1,7	1 - 11
Kinetex EVO C18	Phenomenex	100 x 2,1	1,7	1 - 12
Kinetex PFP	Phenomenex	100 x 2,1	1,7	1,5 - 8,5
Zorbax Bonus RP RRHD	Agilent	100 x 2,1	1,8	2 - 9
BEH Amida	Waters	100 x 2,1	1,7	2-11
BEH HILIC	Waters	50 x 2,1	1,7	1 - 9
ZIC-HILIC	Merck	100 x 2,1	3,5	3 - 8
ZIC-cHILIC	Merck	100 x 2,1	3	3 - 8

Tabela 3.5. Composições das fases móveis avaliadas

Condição	Fase móvel A	Fase móvel B	Tempo de análise (min)	Temp. (°C)	Modo
I	10 mmol L ⁻¹ Acetato de Amônio pH 8,2 (ajustado com NH ₄ OH)	5% H ₂ O, 95% (v/v) acetonitrila 10 mmol/L Acetato de Amônio	12	45	Fase Reversa
II	0,10% Ácido fórmico (v/v)	acetonitrila com 0,10% ácido fórmico (v/v)	12	45	Fase Reversa
III	95:5 (v/v), acetonitrila: 200 mmol L ⁻¹ acetato de amônio	50:50% (v/v) acetonitrila:100 mmol L ⁻¹ acetato de amônio pH = 6,8	21	40	HILIC
IV	95:5 (v/v), acetonitrila: 200 mmol L ⁻¹ formiato de amônio	50% (v/v) acetonitrila, 50% 100 mmol L ⁻¹ formiato de amônio, pH 3,2	21	40	HILIC

4.3 Padrões de metabólitos

Para a otimização do método, soluções estoque dos padrões de metabólitos usados foram preparados na concentração de 1 mmol L⁻¹ em água ultrapura contendo 0.1 mmol/L de HCl ou NaOH, e armazenados a -20 °C. A partir das soluções padrão, preparou-se duas misturas, contendo 40 metabólitos em cada. Para a otimização da fase reversa, 50 µL de cada solução estoque foram adicionados a um tubo falcon e então completou-se com água ultrapura até o volume de 5 mL. Para a HILIC, a mesma diluição foi utilizada, porém completou-se o volume usando uma mistura contendo 80% (v/v) acetonitrila em água. A lista dos padrões utilizados estão detalhados na tabela 3.6.

Tabela 3.6. Lista de padrões utilizados na otimização dos métodos cromatográficos

Nome do composto	Fórmula molecular	Massa molecular monoisotópica (g mol⁻¹)
4-Hidroxi prolina	C ₅ H ₉ NO ₃	131,0582
Adenosina difosfato (ADP)	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	427,0294
AMP Cíclica	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ P	329,0525
Arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174,1168
Asparagina	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132,0535
Ácido aspártico	C ₄ H ₇ NO ₄	133,0375
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244,0882
Ácido cólico	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408,2876
Acido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	192,0270
Creatinina	C ₄ H ₇ N ₃ O	113,0589
Cistina	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S	240,0239
Epinefrina	C ₉ H ₁₃ NO ₃	183,0895
Ácido fólico	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441,1397
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,0634
Glicose-6-fosfato	C ₆ H ₁₁ O ₉ P	258,0152
Ácido glutâmico	C ₅ H ₉ NO ₄	147,0532
Glutamina	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146,0691
Guanina	C ₅ H ₅ N ₅ O	151,0494
Guanosina	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	283,0917
Hipoxantina	C ₅ H ₄ N ₄ O	136,0385
Inosina monofosfato (IMP)	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₈ P	348,0471
Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,0634
Carnitina	C ₇ H ₁₅ NO ₃	161,1052
Citrulina	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	175,0957
Leucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,0946
Ácido lipóico	C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂	206,0435
Ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	134,0215

Nome do composto	Fórmula molecular	Massa molecular monoisotópica (g mol ⁻¹)
Maltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342,1162
ornitina	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	132,0899
Ácido oxálico	C ₂ H ₂ O ₄	89,9953
Fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,0790
Fenilefrina	C ₉ H ₁₃ NO ₂	167,0946
Prolina	C ₅ H ₉ NO ₂	115,0633
Ácido succínico	C ₄ H ₆ O ₄	118,0266
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342,1162
Taurina	C ₂ H ₇ NO ₃ S	125,0147
Teofilina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180,0647
Tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181,0739
Ácido Úrico	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	168,0283
Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,0790
Xantina	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	152,0334

4.4 Avaliação dos dados

Os dados obtidos a partir das análises em triplicata das misturas de padrões usando diferentes colunas e fases móveis foram processadas usando Skyline 3.5 (<http://proteome.gs.washington.edu/software/skyline>) e MassLynx 4.1 (Waters Corporation) aplicando-se um erro de massas de ± 10 ppm. Os cromatogramas dos íons extraídos foram avaliados visualmente em relação ao formato de pico, tempo de retenção e sinal no MS. Baseados nessas observações, um sistema de qualitativo de classificação foi criado para estabelecer uma nota de avaliação para os metabólitos em cada uma das condições estudadas.

Os dados brutos obtidos a partir das análises da amostra de urina foram pré-tratados usando o pacote XCMS através do software de livre acesso R versão 3.2.5. Os arquivos dos dados obtidos em equipamentos da Waters Corporation possuem extensão “*raw*”; porém, para análise no XCMS, é necessário a converter os dados brutos para a extensão *.mzXML*. Para essa conversão, usou-se o software de livre acesso MSconvert (parte do ProteoWizard tools) (100,101). Primeiramente, os dados de cada uma das replicatas analisadas foram processadas no software livre de acesso R por meio do algoritmo “*matchedFilter*” do XCMS. Uma tabela contendo todos os *molecular features** identificados nas análises foi obtida e exportada para o Excel. Na sequência, os dados foram novamente processados pelo XCMS, processando-se simultaneamente os dados da triplicata. Esse processo foi realizado para todas as replicatas das condições e colunas estudadas. A extração dos *molecular features* foi realizada utilizando o algoritmo *matchedFilter* e agrupamento dos *features*. A correção do tempo de retenção foi realizado usando o método *peakgroups* (*family = symmetric, plotype = mdevden*), e posteriormente reagrupados (*bw = 5, mzwid=0,025*). No final, o comando *fillPeaks* foi utilizado para criar valores de intensidades de picos que não foram previamente identificados em algumas amostras, eliminando assim os *missing values* ou zeros. A tabela de dados foi analisada, contabilizando-se os *molecular features* detectados em todas as amostras da triplicata, e a média do coeficiente de variação (CV) da intensidade dos *molecular features* detectados foi calculada. Os resultados obtidos para as análises da amostra de urina também foram contabilizados no sistema de classificação acima mencionado.

* Os *molecular features* são definidos por um determinado intervalo de *m/z* relacionado a um intervalo de tempo de retenção/migração definido.

5 Análises metabolômicas por RPLC-MS E CESI-MS

5.1 Método e condições

As amostras de urina foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.4 desse capítulo. As amostras foram analisadas de forma randômica. Adicionalmente, a qualidade das análises foi monitorada utilizando uma amostra controle de qualidade (QC), preparada a partir da mistura de volumes iguais (10 µL) de cada amostra de urina em estudo (controles e testes) (102). Para a fase reversa, a amostra QC foi injetada três vezes antes da injeção da primeira amostra dos grupos controle ou teste e uma vez após cada cinco amostras. Ao final da sequência de amostras, o QC foi novamente analisado. A análise da reprodutibilidade dos dados obtidos dos QCs é realizado para “validar” os dados adquiridos em relação à estabilidade do sinal, tempo de retenção e massa. Para a análise por RPLC-MS, utilizou-se as condições cromatográficas otimizadas e descritas no item 4.1.

Os dados de MS foram adquiridos usando um espectrômetro de massas Q-Exactive™ do tipo Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) controlado pelo software Xcalibur 2.3. O ESI foi operado no modo positivo aplicando-se uma tensão de 3,0 kV. Nitrogênio foi empregado como gás auxiliar e gás de bainha com pressão de 10 e 50 psi, respectivamente; a temperatura do capilar foi de 300°C. Os dados foram adquiridos no modo *profile* usando os seguintes parâmetros: resolução de 70000 FWHM (full width half maximum), *automatic gain control* (AGC) 1.10^6 , tempo máximo de injeção 100 ms e full scan na faixa m/z 50-750.

As análises referentes ao estudo metabolômico por CESI-MS foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Oleg Mayboroda (LUMC, Leiden, the Netherlands) e Prof. Dr. Rawi Ramautar (Leiden University, Leiden, the Netherlands). Para esse estudo, utilizou-se as amostras coletados no Hospital Universitário em Leuven. As amostras foram transportadas em gelo seco e mantidas congeladas até a realização das análises. Previamente à injeção no CESI-MS, elas foram diluídas 10 vezes em água ultrapura. O QC foi preparado a partir da mistura de 10 µL de cada amostra de urina em estudo. Além do QC, uma mistura de padrões de metabólitos foi injetada durante a sequência, com a finalidade de controlar a performance analítica do equipamento e método utilizado. Todas as informações referente a parte experimental desse estudo estão descritos em trabalhos previamente publicados pelo Dr. Rawi Ramautar (62,103).

5.2 Tratamento dos dados

Assim como os dados gerados no LC-MS da Waters, os dados brutos gerados pelo LC-MS da Thermo possuem extensão *.raw* e precisam ser convertidos para *.mzXML*. Para essa conversão, utilizou-se o mesmo procedimento já citado no item 4.3. O pré-processamento no XCMS dos dados provenientes dos experimentos de RPLC seguiu as seguintes etapas: extração dos *molecular features* utilizando o algoritmo *centWave* (104) (ppm = 5, peakwidth = c(5,20), noise = 50000, prefilter=c(3,75000), snthresh=10, mzCenterFun = wMean, integrate = 2, mzdiff = -0.001) e agrupamento dos features (bw = 5, minfrac = 1, minsamp = 8). Na sequência, as diferenças de tempo de retenção entre as foram corrigidas usando o método *peakgroups* (family = symmetric,

plotype = mdevden); a seguir os *molecular features* foram agrupados novamente (bw = 5, minfrac = 1, minsamp = 8). No final, o comando fillPeaks é utilizado para criar valores de intensidades de picos que não foram previamente identificados em algumas amostras, eliminando assim os *missing values*. Os dados foram normalizados pela mediana através de um algoritmo desenvolvido no próprio R (105,106).

Todos os dados do MS provenientes das análises por CESI-MS foram recalibrados baseado na *m/z* de clusters de formiato de sódio. Esses dados foram então convertidos para a extensão *.mzXML* e em seguida alinhados usando o MS-Align2 (<http://www.ms-utils.org/msalign2/>), algoritmo para alinhamento eletroferogramas e/ou cromatogramas desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. Oleg Mayboroda (107). As demais etapas do pré-processamento foram realizadas com auxílio do pacote XCMS. Os comandos utilizados foram similares aos mencionados no texto acima, com exceção da etapa de alinhamento dos tempos de migração. Nesse caso, o alinhamento foi realizado anteriormente usando o MS-Align2 e não precisa ser repetido no XCMS. Assim como para RPLC, os dados de CESI gerados através do alinhamento e pré-processamento também foram normalizados pela mediana usando o mesmo algoritmo já mencionado.

Para ambos, CESI e RPLC, os dados normalizados foram submetidos à análise estatística usando o programa SIMCAP+12 (Umetrics, Umea, Suécia). Ferramentas de estatística multivariada, como PCA, PLS-DA (com predição de QCs) e OPLS-DA foram aplicadas com a finalidade de visualizar e descobrir correlações entre os dados obtidos e os grupos em estudo. Os dados foram log-transformados e escalonados por Pareto.

A validade e robustez dos modelos estatísticos gerados foram baseadas nos parâmetros $R^2(Y)$ e $Q^2(Y)$, teste de permutações e análise de variância dos resíduos da validação cruzada (CV-ANOVA, do inglês cross-validation analysis of variance)(108). A seleção

dos *molecular features* discriminantes foi feita baseando-se nos valores de *Variable Importance in Projection* (VIP) gerados no PLS-DA. *Molecular features* com valores de $VIP > 1$ foram selecionados para a próxima etapa da análise metabolômica. Esses valores descrevem a estimativa quantitativa do poder de discriminação de cada variável. Com a finalidade de obter uma maior significância estatística, os dados normalizados também foram estatisticamente avaliados usando a plataforma online de livre acesso MetaboAnalyst (70).

A identificação dos *molecular features* discriminantes foi realizada através da busca dos m/z nos seguintes banco de dados: HMDB, <http://www.hmdb.ca/>; KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>; METLIN, <http://metlin.scripps.edu/>; MassBank, <http://www.massbank.jp/>; Scripps Center for Mass Spectrometry (<http://masspec.scripps.edu/index.php>). O critério de busca aplicado foi: erro de massa máximo de 5 ppm, e $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ como possíveis adutos. As informações biológicas referente aos metabólitos identificados foram pesquisadas em banco de dados.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

1 Determinação de aminoácidos em urina por CE-MS

1.1 Otimização do método

Um método por CE-MS com a capacidade de oferecer separação dos componentes de uma amostra com resolução em linha de base diminui o efeito de supressão iônica, representando assim uma vantagem qualitativa e quantitativa. Para satisfazer certa demanda, o método analítico precisa ser otimizado para operar em condições com a capacidade de oferecer a melhor separação, seletividade e sensibilidade capazes de determinar baixas concentrações de aminoácidos em amostras biológicas. Nesse trabalho, um método para a separação de 27 aminoácidos por CE-MS foi otimizado em três blocos instrumentais: interface do CE-MS, parâmetros do CE e MS (109). A otimização foi realizada sequencialmente para cada bloco instrumental. As condições testadas, assim como, as condições ótimas obtidas estão detalhadas na Tabela 4.1. No início da otimização, o SHL era composto de 1,0% ácido fórmico em 50% metanol fornecido a uma vazão de 6,0 $\mu\text{L min}^{-1}$. Nitrogênio foi usado como gás de nebulização e configurado a 10 psi. Para os parâmetros de MS, a vazão do gás secante foi ajustada para 10 L min^{-1} e a temperatura do aquecedor configurada à 300 °C. Os parâmetros iniciais de CE foram: tensão aplicada 30 kV, temperatura do capilar à 25 °C, injeção hidrodinâmica a 0,50 psi por 10 s sem o uso de método de pré-concentração e 1 mol L^{-1} ácido fórmico foi usada como BGE.

Tabela 4.1. Otimização dos parâmetros de CE-MS, faixas testadas e valores ótimos

Bloco	Parâmetros	Faixa Testada	Ótimo
Interface	SHL componente orgânico	Metanol, isopropanol	Metanol
Interface	SHL concentração do componente orgânico	50-80% (v/v)	60% (v/v)
Interface	Aditivo do SHL	ác. fórmico, ác. acético, formiato de amônio	ác. fórmico
Interface	Concentração do aditivo do SHL	ác. fórmico 0,1-1,0% (v/v)	ác. fórmico 0,50% (v/v)
Interface	Fluxo do SHL	2,0-10 $\mu\text{L min}^{-1}$	5,0 $\mu\text{L min}^{-1}$
Interface	Pressão do gás nebulizante	8,0-12 psi	8,0 psi
CE	Concentração do BGE	0,25-2,0 mol L ⁻¹ ác. fórmico	0,80 mol L ⁻¹ ác. fórmico
CE	Aditivo orgânico	10-20% (v/v) acetonitrila e 10-20% (v/v) metanol	15% (v/v) metanol
CE	Tensão	20-30 kV	30 kV
CE	Pressão aplicada na separação	0-0,60 psi	0 psi
CE	Temperatura	15-25 °C	20 °C
CE	Tempo de injeção	7,0 a 25 s a 0,6 psi	20 s a 0,6 psi
MS	Vazão do gás secante	5,0-10 L min ⁻¹	5,0 L min ⁻¹
MS	Temperatura do gás secante	150-300 °C	200 °C
MS	Tempo de acumulação	10-300 ms	15 ms

1.1.1 Parâmetros da interface

EM CE-MS, a composição do SHL é um parâmetro muito importante a ser otimizado, pois apresenta direta influência na magnitude da razão sinal-ruído (S/N),

afetando assim o limite de detecção do método. Além disso, é muito importante certificar-se de uma apropriada conexão entre o CE e MS, garantindo assim que ambos spray e corrente sejam mantidos estáveis e constantes. A composição do SHL também pode influenciar a eficiência da ionização em CE-MS. Soluções metanol-água com adição de sais voláteis, ácidos ou bases, como ácido fórmico, acetato de amônio, ácido acético e formiato de amônio têm sido usados em estudos reportados na literatura e têm provado serem eficientes e apropriados SHL. (110–113). Nesse trabalho, usando uma concentração constante de 1,0% (v/v) ácido fórmico, o componente orgânico do SHL e sua concentração pôde ser selecionada e otimizada (Tabela 4.1.). A melhor razão sinal-ruído para os aminoácidos em estudo (amostra de urina fortificada) e melhor estabilidade do spray foram obtidos usando 60% (v/v) metanol-água contendo 1,0% (v/v) ácido fórmico como SHL. Outras melhorias foram realizadas testando três diferentes aditivos voláteis em diferentes intervalos de concentração. Foram testados 5,0 mmol L⁻¹ formiato de amônio, 0,10-1,0% (v/v) ácido fórmico, e 0,50% (v/v) como aditivos no SHL composto por 60% (v/v) metanol-água. Com a adição de 0,50% (v/v) ácido fórmico, foi observada uma melhor relação S/N, e este aditivo e concentração foram então selecionados. A vazão do SHL também exerce certa influência na magnitude da razão sinal-ruído, uma vez que uma vazão do fluxo maior pode levar a uma diluição de amostra maior na extremidade capilar, causando uma perda de sensibilidade (114). O efeito da vazão de SHL foi investigado no intervalo de 2,0 a 10 µL min⁻¹. Embora um aumento na sensibilidade tenha sido obtida usando baixas vazões, foi frequentemente observada uma queda na corrente e, adicionalmente, constatou-se que o spray não se mantinha estável. Além disso, diferentes perfis de separação entre análises sequenciais também foram observados. Uma vazão intermediária foi capaz de

fornecer uma condição mais estável sem queda de corrente, com spray estável e com um perfil de separação reprodutível. Baseado nas discussões acima apresentadas anteriormente, 0,5% ácido fórmico em 60% (v/v) metanol-água a uma vazão de fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ foram considerados como as condições ótimas do SHL para a separação e determinação dos aminoácidos em estudo.

Um estudo sobre os efeitos da vazão do gás nebulizador já foi reportado na literatura (115). Nesse trabalho, também foram investigados os efeitos da vazão do gás nebulizador na separação dos aminoácidos. Semelhante aos estudos previamente reportados, nenhuma mudança foi observada para pressões abaixo de 6 psi; no entanto, de 7 a 13 psi (pressão máxima testada) um acentuado aumento na mobilidade eletroforética foi observado para todos os aminoácidos, afetando assim a resolução da separação. Este efeito é provavelmente uma consequência de um efeito de sucção. Sendo assim, 8 psi foi determinado como valor ótimo, apresentando uma boa separação e bons tempos de separação.

1.1.2 Parâmetros de CE

Após o estabelecimento das condições ótimas para a interface e SHL, as condições de CE foram então otimizadas, começando pela otimização da composição do BGE. Em CE, a escolha do BGE afeta substancialmente o sistema de separação. Com a finalidade de obter a separação simultânea de todos os aminoácidos em investigação por CE-MS, tanto valores de pH baixos ou altos devem ser testados, uma vez que os pontos isoelétricos dos aminoácidos investigados variam entre 2,77 a 10,76. Estudos reportados na literatura para a separação de aminoácidos por CE-MS geralmente usam

0,80 mol L⁻¹ a 2,0 mol L⁻¹ ácido fórmico como BGE (81,94,95,116). Apesar de boas separações e eficientes ionizações serem reportadas, apenas um desses estudos apresentou separação em linha de base para o par de isômeros estruturais isoleucina e leucina. Para o método aqui apresentado, a composição do BGE foi investigada em termos de concentração de ácido fórmico e solvente orgânico, com a finalidade de promover uma adequada separação e eficiência de ionização para a maioria dos aminoácidos. Na sequência, as atenções foram concentradas na separação do trio de isômeros isoleucina, leucina e allo-isoleucina. Para BGEs com concentração de ácido fórmico abaixo de 0,50 mol L⁻¹, observou-se uma diminuição na mobilidade eletroforética de todos os aminoácidos, resultando numa separação insatisfatória. Foram obtidas boas separações, incluindo uma resolução parcial dos isômeros estruturais isoleucina, leucina e allo-isoleucina, com 0,80 mol L⁻¹ ácido fórmico como BGE. Para melhorar a resolução, modificadores orgânicos (acetonitrila e metanol) foram testados, com uma separação bem sucedida de 22 aminoácidos, incluindo uma separação em linha de base do trio de isômeros, quando 15% (v/v) de metanol foi utilizado como aditivo no BGE. A composição ótima do BGE foi então estabelecida como 0,80 mol L⁻¹ ácido fórmico contendo 15% (v/v) de metanol. Uma separação por CE-MS de uma mistura de padrões de aminoácido é representada na Figura 4.1.

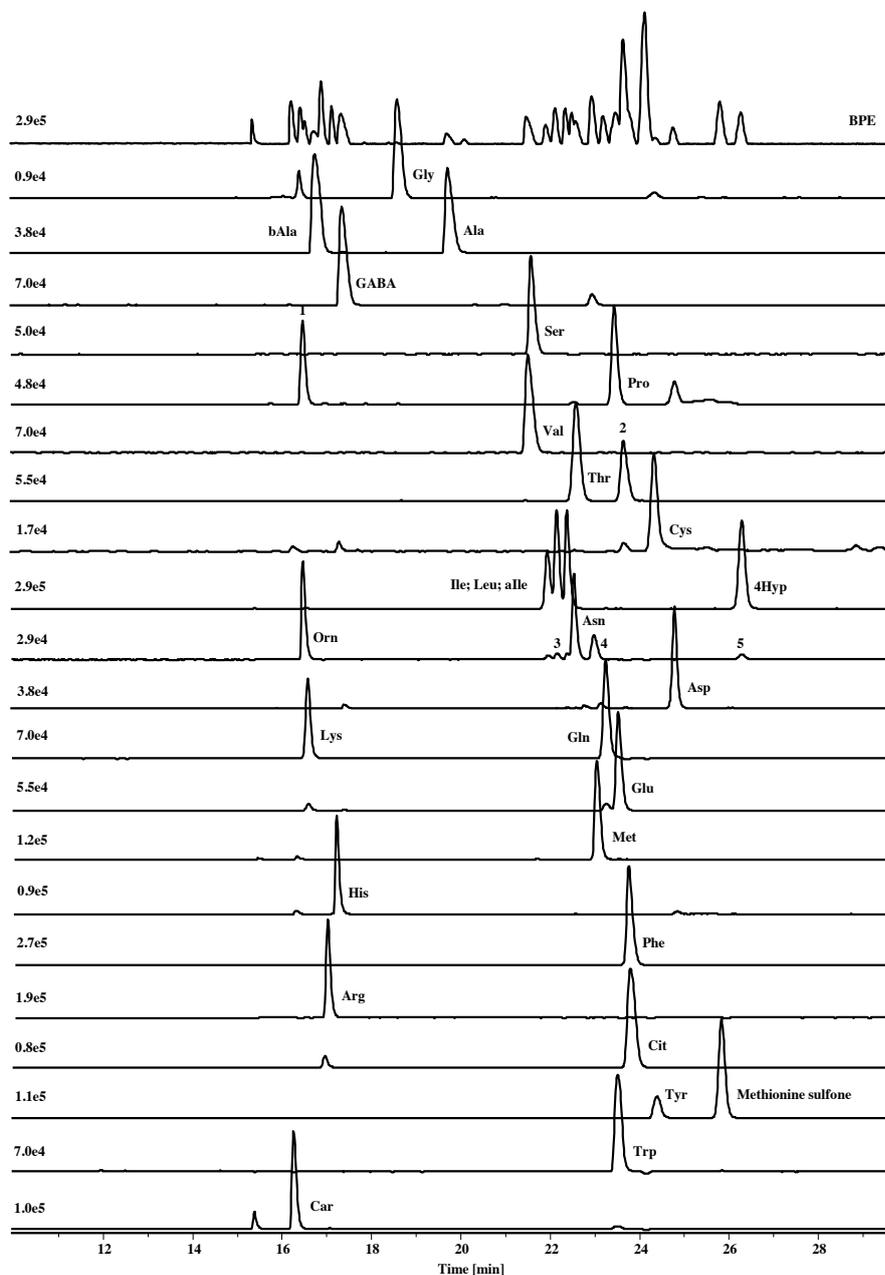


Figura 4.1. Eletroferograma do pico base (BPE, do inglês base peak electropherogram) da análise de uma mistura de padrões de aminoácidos e eletroferograma de íon extraído (EIE, do inglês extracted ion electropherogram) de cada um dos aminoácidos com o método de CE-MS. Condições: capilar de sílica fundida (85 cm comprimento total, 50 μm diâmetro interno); BGE composto por 0,80 mol L^{-1} ácido fórmico contendo 15% (v/v) MeOH; tensão aplicada de +30 kV; injeção hidrodinâmica da amostra: 0,6 psi por 20 s com stacking mediado por pH (injeção de 12,5% (v/v) NH_4OH a 0,5 psi por 9 s antes da injeção da amostra); temperatura do capilar 20 $^\circ\text{C}$. Concentrações: aminoácidos foram injetados em um intervalo de 60 a 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Metionina sulfona na concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi usado como padrão interno. SHL composto por 0,5% (v/v) ácido fórmico em 60% (v/v) metanol-água e entregue a uma vazão de fluxo de 5,0 $\mu\text{L min}^{-1}$. No espectrômetro de massas, a vazão do gás secante foi ajustada à 5,0 L min^{-1} e a temperatura à 200 $^\circ\text{C}$, com um tempo de acumulação de 15 ms. Legendas: 1, fragmento de Orn; 2, fragmento de Phe; 3, isóbaros Ile/Leu/alle; 4, fragmento de Met; 5, fragmento de 4Hyp. As intensidades dos sinais são descritas no lado esquerdo de cada EIE e BPE.

É de conhecimento geral que uma das razões pelas quais CE não possui boa sensibilidade está relacionada ao pequeno volume da amostra injetada, geralmente menos de um por cento do comprimento capilar pode ser preenchido com a amostra. Para compensar essa limitação, uma estratégia de pré-concentração foi testada, denominada stacking (empilhamento) mediado por pH, a qual já foi relatada como um método adequado para amostras de baixa concentração e alta força iônica, como a urina (117). Esta abordagem foi aplicada para todas as amostras analisadas pelo método proposto, na qual a injeção hidrodinâmica de uma solução de NH_4OH a 12,5% (v/v) (0,5 psi por 9 s) foi realizada antes de cada injeção da amostra. Eventualmente, para obter uma melhor focalização da zona da amostra, as amostras de urina foram acidificadas com 0,10% (v/v) de ácido fórmico.

A tensão aplicada e a temperatura do capilar também foram otimizadas. No entanto, não foram observadas alterações no perfil de separação ao estudar a temperatura capilar; sendo assim, foi decidido manter o sistema à temperatura ambiente, 20 °C. Ao aplicar diferentes tensões de separação, observaram-se mínimas mudanças nas mobilidades eletroforéticas; porém, não houve melhora significativa no perfil de separação, assim, foi selecionada +30 kV como a tensão de separação.

1.1.3 Parâmetros de MS

Para MS, a vazão e temperatura do gás secante, assim como o tempo de acumulação (ICC count time) foram estudados. Apesar de não terem sido encontrados muitos estudos detalhando a influência da vazão e temperatura do gás de secagem para separações por CE-MS, Huikko e colaboradores publicaram um estudo discutindo

o efeito desses parâmetros (115). Eles relataram nenhum efeito na qualidade de separação ou no sinal de MS enquanto investigavam a vazão ou a temperatura do gás secante. Nesse estudo aqui apresentado, comprovou-se a evidência apresentada por Huikko e colaboradores, uma vez que não foram observadas grandes mudanças no perfil de separação ou nas relações S/N e, desta forma, os parâmetros do gás secante foi estabelecido seguindo as recomendações do fabricante. O tempo de acumulação também foi otimizado para evitar a sobrecarga do detector de MS e, ao mesmo tempo, não comprometer a sensibilidade. Observou-se que um tempo de acumulação de 15 ms foi capaz de fornecer a melhor sensibilidade e formato de pico sem sobrecarregar o detector. Assim, as configurações finais para MS foram: vazão de gás secante a 5,0 L min⁻¹ e uma temperatura de 200 °C, com um tempo de acumulação de 15 ms.

1.2 Validação do método

A validação do método foi realizada conforme requerimentos definidos pelo guia da FDA (118). O guia de instruções para validação de métodos analíticos da ICH (99) também foi utilizado apesar do fato desse guia focar mais em métodos analíticos para produtos farmacêuticos ao invés de bioanálises. Linearidade, repetibilidade, em termos de tempo de migração e razão de área de pico, e limites de detecção e quantificação (LD e LQ) foram avaliados (Tabelas 4.2. e 4.3).

Tabela 4.2. Resultados de linearidade, LD e LQ para o método de CE-MS proposto.

Amino ácidos	<i>m/z</i>	Faixa concentração (μmol L ⁻¹)	Linearidade (<i>R</i> ² , <i>n</i> =5)	Erro de regressão	Inclinação	Intercepto	<i>F</i>	p-valor	LD μmol/L	LQ μmol/L
Ala	90,2	200-1000	0,999	0,0004	0,30±0,001	-0,002±0,0005	94922	0,16	5,7	17
alle	132,2	20-100	0,999	0,003	5,0±0,07	-0,005±0,004	4941,0	0,39	2,5	7,5
Arg	175,0	20-100	0,999	0,004	8,6±0,08	-0,01±0,004	11182	0,26	1,7	5,0
Asp	134,0	50-250	0,996	0,004	1,2±0,02	-0,003±0,005	3146,0	0,65	16	47
Asn	133,0	100-500	0,991	0,006	1,8±0,009	0,006±0,007	391,00	0,55	13	40
βAla	90,2	200-1000	0,993	0,003	0,38±0,006	0,0001±0,003	4467,0	0,98	27	80
Car	227,1	20-100	0,999	0,01	7,1±0,1	-0,01±0,01	4549,0	0,50	6,7	20
Cit	176,0	50-250	0,999	0,007	3,5±0,06	0,007±0,008	3224,0	0,52	7,7	23
Cys	122,0	200-1000	0,999	0,004	0,51±0,008	-0,02±0,004	3756,0	0,18	29	86
GABA	104,2	100-500	0,996	0,001	1,3±0,007	-0,004±0,001	28833	0,25	4,0	12
Glu	148,0	50-250	0,998	0,004	2,4±0,04	0,0008±0,005	3483,0	0,91	7,3	22
Gln	147,0	50-250	0,998	0,002	2,1±0,02	-0,005±0,002	19813	0,26	3,1	9,4
Gly	76,2	200-1000	0,998	0,0005	0,13±0,0009	-0,001±0,0006	21963	0,33	15	45
4Hyp	132,2	50-250	0,999	0,002	2,6±0,03	-0,01±0,003	9910,0	0,16	3,7	11
His	156,1	20-100	0,998	0,0008	4,9±0,02	0,005±0,0009	76690	0,11	0,63	1,9

Amino ácidos	<i>m/z</i>	Faixa concentração (µmol L ⁻¹)	Lineari- dade (R ² , n=5)	Erro de regressão	Inclinação	Intercepto	<i>F</i>	p-valor	LD µmol/L	LQ µmol/L
Ile	132,2	20-100	0,997	0,004	3,7±0,1	0,004±0,005	1342,0	0,57	4,7	14
Leu	132,2	20-100	0,996	0,007	4,9±0,2	0,005±0,009	790,00	0,70	6,3	19
Lys	147,0	20-100	0,999	0,002	3,8±0,04	0,001±0,003	8252,0	0,76	2,4	7,3
Met	150,1	50-250	0,999	0,005	3,1±0,05	-0,005±0,007	3754,0	0,60	7,3	22
Orn	133,0	50-250	0,999	0,002	1,9±0,04	-0,002±0,003	2980,0	0,64	4,8	15
Phe	166,1	50-250	0,996	0,001	7,3±0,01	-0,02±0,002	30682	0,074	0,6	2,4
Pro	116,0	20-100	0,999	0,008	5,0±0,04	0,01±0,01	16965	0,41	6,7	20
Ser	106,1	100-500	0,999	0,003	0,90±0,01	-0,004±0,003	5332,0	0,41	12	36
Thr	120,1	100-500	0,996	0,002	0,91±0,01	-0,001±0,003	7859,0	0,78	10	30
Trp	205,1	20-100	0,998	0,002	5,5±0,05	0,001±0,002	14975	0,66	1,4	4,3
Tyr	182,2	20-100	0,998	0,002	4,1±0,03	-0,007±0,002	14869	0,19	1,8	5,4
Val	118,1	50-250	0,997	0,004	3,8±0,04	-0,005±0,005	10523	0,51	4,3	13

As curvas analíticas para todos os AA foram lineares nas faixas de concentração testadas, com coeficientes de determinação (R^2) entre 0,9960 e 0,9997. Os limites de detecção para todos os AA variaram de 0,63 a 29 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os limites de quantificação variaram de 1,9 a 86 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Repetibilidade foi obtida para todos os aminoácidos com valores de coeficiente de variação (CV) ($n = 7$) para tempos de migração entre 0,55 e 1,7% CV e melhor que 5% de CV para razões de área do pico. Adicionalmente, para investigar a precisão do método proposto, concentrações em uma faixa de 60 a 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (dependendo de cada aminoácido) foram adicionadas em uma mistura das 44 amostras de urina do estudo do RVU, e as recuperações foram determinadas. As recuperações para quase todos os AA variaram de 92,0 a 123%, com exceção da Asn e Pro (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Resultados dos testes de recuperação e repetibilidade para o método de CE-MS proposto

Amino- ácidos	Concentração adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)	%CV do tempo de migração ($n = 7$)	%CV da razão de área do pico ($n = 7$)
Ala	600	113	1,3	4,4
alle	60	93,6	1,0	4,1
Arg	60	104	0,61	4,6
Asp	150	110	1,6	4,5
Asn	300	139	1,2	4,0
bAla	600	107	0,65	4,7
Car	60	92,0	0,59	4,3
Cit	150	119	1,5	4,5
Cys	600	108	1,5	5,0
GABA	300	111	0,74	4,6
Glu	150	95,6	1,4	4,9
Gln	150	119	1,4	4,4
Gly	600	92,2	0,84	3,5

Amino-ácidos	Concentração adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)	%CV do tempo de migração ($n = 7$)	%CV da razão de área do pico ($n = 7$)
4Hyp	150	108	1,7	2,2
His	60	110	0,55	4,9
Ile	60	122	1,3	4,4
Leu	60	108	1,2	3,3
Lys	60	104	0,57	4,8
Met	150	96,8	1,3	4,6
Orn	150	112	0,64	4,8
Phe	150	92,0	1,4	4,9
Pro	60	127	1,4	4,7
Ser	300	101	1,1	4,2
Thr	300	123	1,2	4,3
Trp	60	111	1,4	3,4
Tyr	60	114	1,5	4,0
Val	150	108	1,4	3,6

1.3 Análise quantitativa de aminoácidos nas amostras de urina

Após validação do método desenvolvido por CE-MS para a análise de aminoácidos em urina, o mesmo foi aplicado para a análise de aminoácidos urinários como parte do estudo metabólico piloto de refluxo vésico ureteral (RVU). Todas as 44 amostras coletadas foram analisadas, sendo 22 amostras controles (coletadas de criança sem RVU) e 22 amostras testes (coletadas de crianças com RVU), usando o método proposto. Na Figura 4.2, é possível visualizar os eletroferogramas de pico base e de íon extraído para duas das amostras do grupo estudado, uma controle (Figura 4.2A) e uma teste (Figura 4.2B).

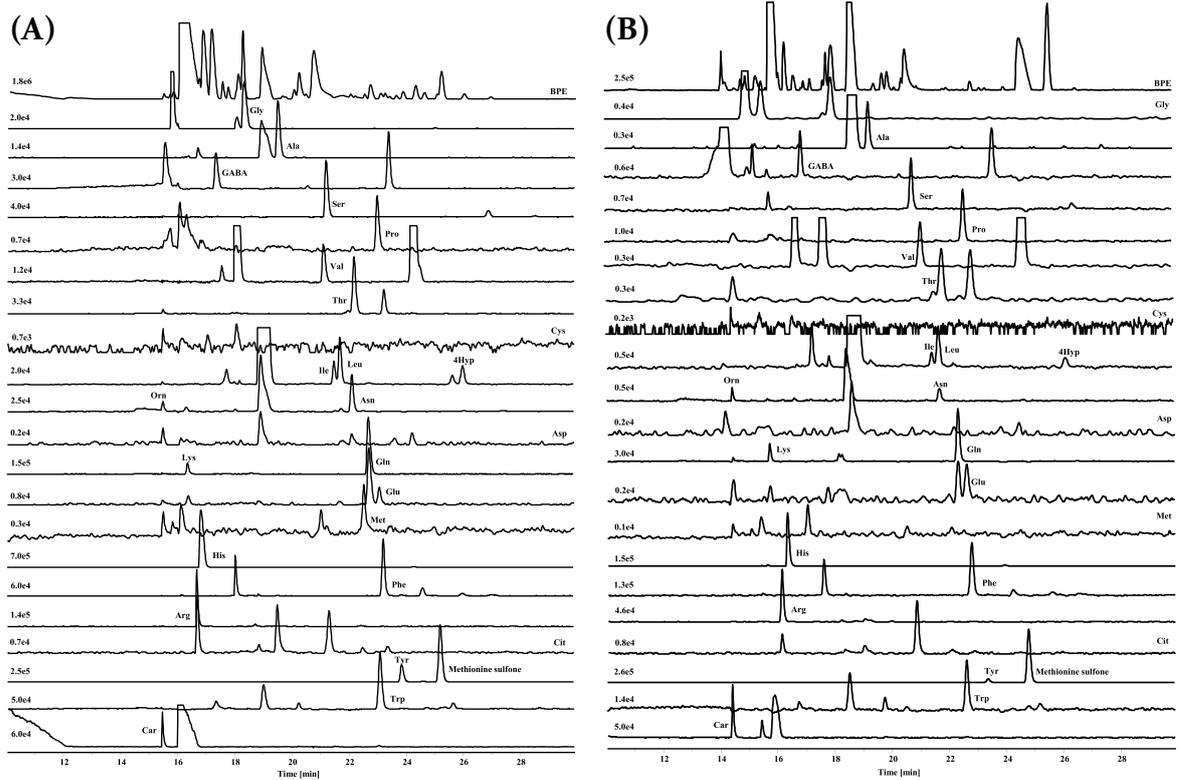


Figura 4.2. Eletroferograma do pico base (BPE) de uma amostra de urina controle (A) uma amostra teste (com RVU) (B) e eletroferogramas dos íons extraídos (EIE) para cada um dos aminoácidos detectados nessas amostras usando o método de CE-MS otimizado. Condições: idem em Figura 4.1.

Foi possível quantificar nas amostras analisadas 20 dos 27 aminoácidos estudados, com exceção da *alle*, β Ala, Ala, Asp, Cit, Cys e Gly. As concentrações dos aminoácidos nas amostras estudadas foram determinadas com o auxílio de metionina sulfona como padrão interno. As concentrações obtidas para cada aminoácido estão listadas na Tabela 4.4. Em geral, obteve-se uma boa precisão para a maioria dos aminoácidos, como pôde ser observado na Tabela 3.3, indicando que o método proposto, que usa um simples espectrômetro de massas do tipo Ion Trap, pode gerar resultados confiáveis na quantificação de aminoácidos em urina. Maiores discussões e a análise estatística dos dados obtidos focando um estudo metabolômico, estão descritos e detalhados no próximo item desse capítulo.

Tabela 4.4. Concentrações dos aminoácidos nas amostras de urina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

Amostra	GABA	Ser	Pro	Val	Thr	Orn	Asn	Lys	Gln	Glu	Met	His	Phe	Arg	Trp	Thr	Car	4HPro	Ile	Leu
1	28,7	186,4	n.d	7,58	94,5	n.d	62,7	245,07	129,79	9,22	2,6	403,0	17,88	23,01	66,4	14,2	7,47	n.d	1,39	4,5
2	406,0	383,91	4.10 ¹	206,3	331,11	187,23	373,85	71,29	194,8	173,50	192,4	81,859	188,5	75,72	76,6	71,98	73,53	189,0	67,79	73,65
3	205,71	n.d	21,09	15,88	143,32	n.d	79,72	31,4	583,08	34,3	7,9	542,2	77,41	91,56	209,87	61,87	16,2	11,07	10,1	25,41
4	86,3	165,85	14,9	15,04	20,91	n.d	31,20	12,3	8.10 ¹	14,0	n.d	125,30	15,37	23,79	304,3	7,74	40,92	n.d	2,4	4,8
5	11,51	86,7	3,96	7,89	52,5	n.d	34,5	12,5	111,59	6,5	314,2	23,55	42,8	31,0	57,89	5,49	10,7	1.10 ¹	3,16	7,45
6	179,0	96,93	n.d	6,2	294,7	7,82	224,4	48,1	11.10 ²	54,3	n.d	1513,02	209,92	116,0	529,29	138,6	276,8	2.10 ¹	16,5	31,57
7	165,58	386,3	17,61	37,28	106,1	n.d	79,63	29,52	379,09	49,76	5,53	576,7	86,5	86,2	226,0	38,8	6,6	n.d	8,1	24,1
8	32,5	55,21	n.d	6,8	28,4	n.d	22,2	13,43	85,29	9,81	n.d	202,3	30,6	11,40	70,5	11,77	7,23	n.d	2,2	6,7
9	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	13,20	25,12	n.d	n.d	59,85	7,24	1.10 ¹	23,84	4,3	1.10 ¹	n.d	0,743	1,69
10	13,31	124,8	n.d	6,6	46,7	n.d	46,5	12,7	102,2	7,83	n.d	231,89	16,8	14,5	53,42	9,0	28,8	n.d	2,7	6,5
11	66,1	64,5	n.d	3,84	10,4	7,8	n.d	2,3	38,7	5,75	n.d	73,88	4,5	2,9	9,92	3,29	7,83	n.d	0,81	1,55
12	7,10	22,1	2,2	2,5	5,14	n.d	3,82	1,27	1.10 ¹	1,50	n.d	6,9	1,94	2,9	5,71	0,88	4,8	n.d	0,375	0,745
13	203,52	192,1	5,81	27,33	10.10 ¹	n.d	85,16	33,84	293,78	14,4	4,2	529,17	97,89	37,36	263,60	38,4	74,8	8,3	9,86	25,92
14	37,0	409,68	35,34	21,35	184,2	n.d	13,12	58,2	475,48	35,56	1.10 ¹	805,60	62,5	100,4	205,88	34,0	30,9	5,80	11,81	31,59
15	125,28	180	18,8	11,29	56,3	11,26	32,41	31,42	183,74	14,3	4,1	361,170	38,3	38,2	94,4	15,71	49,19	5,13	4,0	9,86
16	96,3	306,9	32,2	21,04	65,7	n.d	52,8	24,9	168,5	14,9	1,95	227,71	20,6	26,1	47,30	11,32	n.d	4,2	2,7	6,8
17	18,3	41	n.d	3,80	12,3	n.d	16,87	4,0	38,2	8,1	n.d	40,6	5,96	1.10 ¹	10,91	2,9	3,78	n.d	0,750	2,1
18	479,75	871,25	190,9	48,5	495,73	n.d	997,8	5,67	1209,41	89,05	9,60	2158,5	153,01	149,28	489,59	90,2	13,48	37,85	18,5	34,9
19	28,7	93,44	5,69	5,90	23,75	n.d	18,6	6,5	66,6	9,62	n.d	97,69	7,33	5,45	17,49	3,25	6,9	n.d	2,1	3,84
20	43,94	353,81	35,55	19,20	88,76	12,1	7.10 ¹	24,9	265,83	17,17	2,4	274,2	21,15	54,4	59,54	14,1	109,83	24,5	3,35	7,72
21	n.d	56,6	6,5	3,08	22,78	n.d	n.d	94,8	146,0	11,24	n.d	245,83	56,0	47,60	163,22	30,9	74,6	4,3	4,7	11,35
22	36,2	268,5	79,27	14,2	128,1	5,43	45,45	19,36	165,91	16,3	3,33	186,3	18,2	30,8	81,61	13,0	68,8	82,2	4,9	8,8
23	32,1	41,92	n.d	4,3	2.10 ¹	n.d	157,04	8,2	6.10 ¹	46,8	n.d	141,92	1.10 ¹	7,62	29,76	4,7	17,59	n.d	2,6	7,0
24	n.d	3716,1	8,1	19,70	1139,3	n.d	2185,8	673,65	2166,0	55,94	14,7	2450,0	274,9	114,5	1189,31	176,2	807,47	n.d	17,13	71,33

Amostra	GABA	Ser	Pro	Val	Thr	Orn	Asn	Lys	Gln	Glu	Met	His	Phe	Arg	Trp	Thr	Car	4HPro	Ile	Leu
25	19,65	69,23	11,95	7,06	35,20	n.d	55,73	17,79	99,17	13,15	n.d	199,61	25,10	23,60	58,9	12,6	13,36	n.d	2,2	5,42
26	n.d	6.10 ¹	n.d	n.d	71,83	n.d	77,29	768,8	444,6	32,1	n.d	2302,6	118,0	195,8	703,28	132,34	n.d	6,0	9,41	26,8
27	8,6	71,86	n.d	7,99	20,7	n.d	20,8	11,52	101,4	7,16	3,91	1.10 ²	17,71	14,2	29,84	8,77	3,20	n.d	2,5	7,65
28	n.d	56,2	n.d	4,7	18,5	n.d	22,0	33,20	182,4	14,5	4,5	260,2	55,93	113,54	144,4	29,0	118,1	4,5	5,48	13,81
29	2.10 ¹	214,9	26,5	8,7	60,1	7,20	36,9	30,2	334,54	28,2	n.d	392,36	47,03	44,8	147,97	34,5	151,37	41,39	4,6	11,69
30	48,4	166,4	8,1	8,9	81,06	n.d	34,9	12,2	191,17	5,94	2,5	311,23	246	30,5	95,79	19,68	31,39	4,34	4,3	9,59
31	19,52	42,5	15,12	5,26	15,49	n.d	15,21	4,4	38,9	2,8	n.d	56,8	6,80	9,92	22,8	5,08	3,53	2,077	0,95	2,0
32	30,5	22.10 ¹	19,53	15,24	58,8	11,39	47,70	25,62	105,72	14,8	2,6	171,68	25,71	11,44	64,7	13,97	15,64	9,09	3,90	6,9
33	n.d	124,3	9,78	21,05	88,3	n.d	64,2	12,6	226,5	12,1	4,4	445,52	86,6	20,4	224,1	41,44	7,37	n.d	7,20	23,29
34	507,10	361,85	195,21	34,4	904	n.d	71,54	22,7	463,05	128,0	7,80	377,49	94,4	207,28	288,3	46,1	86,4	35,76	19,92	27,84
35	n.d	59,35	n.d	2,2	12,8	n.d	21,27	4,9	28,5	9,96	n.d	37,17	5,38	5,65	19,0	4,1	2,3	n.d	1,16	2,8
36	n.d	62,2	n.d	3,86	9,56	n.d	19,68	29,02	105,37	12,8	n.d	124,3	31,44	207,50	121,78	37,53	15,63	2,9	3,24	5,91
37	n.d	82,0	55,88	13,61	57,39	n.d	72,3	23,40	80,5	56,4	2,7	157,81	21,58	86,4	57,56	11,26	15,53	23,35	10,9	21,50
38	n.d	49,44	10,3	4,9	61,19	n.d	47,42	16,5	206,1	24,5	9,15	193,45	31,79	36,1	79,58	18,6	27,73	9,13	6,5	13,74
39	21,24	71,18	n.d	8,9	23,13	n.d	15,86	14,1	35,86	6,8	n.d	92,8	8,1	7,03	24,8	3,11	11,71	n.d	1,85	320
40	n.d	8.10 ⁻¹	n.d	4,8	27,11	7,90	24,9	7,14	63,27	4,2	n.d	107,12	8,5	6,6	23,7	4,901	11,83	1,82	1,40	3,56
41	n.d	n.d	10,5	n.d	n.d	n.d	n.d	54,9	151,24	38,2	n.d	135,15	43,26	121,78	129,74	27,98	173,81	7,81	1,48	4,35
42	2.10 ¹	76,6	9,57	4,759	52,0	n.d	68,7	57,85	211,46	12,7	n.d	735,51	64,03	99,58	174,25	46,4	1069,8	3,43	7,96	15,0
43	665,92	325,8	115,97	35,33	101,83	n.d	75,76	42,6	280,5	39,17	4,6	240,1	4.10 ¹	74,6	151,91	22,9	14,8	22,6	7,97	19,0
44	9,40	8140	n.d	4,2	16,9	n.d	15,52	4,9	47,15	5,51	n.d	36,7	3,76	5,98	9,36	2,377	9,57	n.d	0,875	1,85

Legenda: n.d = não detectado (abaixo do LD, os quais estão descritos na parte de validação do método)

1.4 Análise estatística e interpretação dos resultados

A avaliação estatística das concentrações encontradas teve como objetivo a classificação das amostras em dois diferentes grupos, um de crianças sem RUV e outro de crianças com RUV. Para o tratamento estatístico considerou-se apenas aqueles aminoácidos que apresentaram medidas em mais de 60% das amostras analisadas. Previamente à análise estatística, os resultados das concentrações dos aminoácidos foram normalizados pela mediana. O propósito da normalização é assegurar uma comparação mais confiável entre os diferentes grupos estudados, pois os resultados da análise estatística estão diretamente relacionados com as concentrações dos aminoácidos quantificados nas amostras (119). No caso de urina, a normalização por creatinina é normalmente utilizada, pois a sua taxa de produção é constante e é excretada primeiramente por filtração glomerular sem ser reabsorvido no túbulo renal. No entanto, optou-se por não aplicar esse tipo de normalização, visto que a concentração de creatinina na urina pode ser influenciada por diversos fatores, como idade, gênero, massa muscular, dieta, função renal, e excreção de água (120). Após normalizados, os dados foram primeiramente inseridos no software SIMCA para análise estatística multivariada (PCA e PLS-DA) e posteriormente univariada (teste t de Student, teste de distribuição e normalidade).

A PCA é um algoritmo matemático não supervisionado que reduz a dimensionalidade dos dados, mantendo a maior parte da variância no conjunto de dados. A PCA permite modelar os dados e determinar quais os metabólitos que mais contribuem para a variância observada. Também permite a identificação de *outliers*

que possam contribuir para a distorção da variância de um componente específico. Devido à sua aplicabilidade na redução de dimensionalidade, visualização de dados, agrupamento e discriminação em grupo de amostra, a PCA é frequentemente usada como ponto de partida para a análise de dados, especialmente em estudos exploratórios (121). Assim, construiu-se um gráfico de *scores* de PCA para visualizar a existência de possíveis diferenças entre os grupos teste e controle, baseando-se nas concentrações dos aminoácidos investigados e quais são as variáveis que influenciam essas diferenças. Como pode ser visualizado na Figura 4.3, o gráfico de *scores* gerado não possibilitou a visualização da distinção entre os grupos investigados.

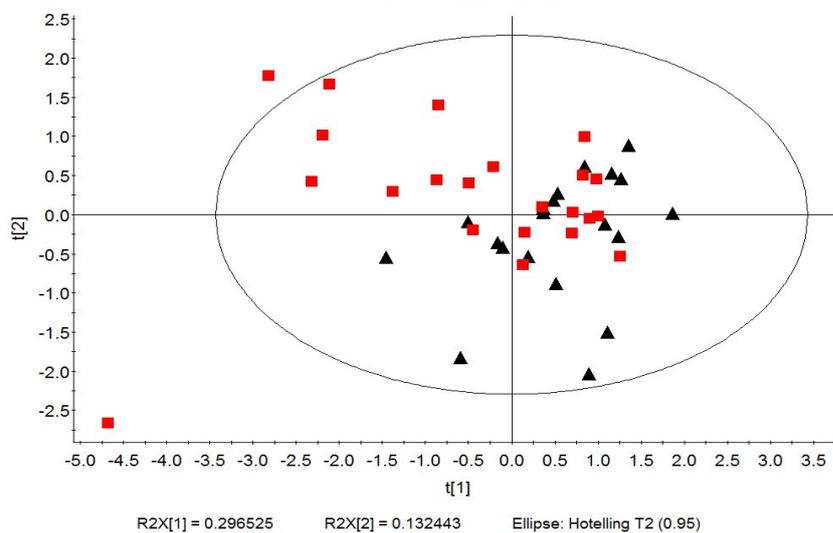


Figura 4.3. Gráfico de scores do modelo de PCA das concentrações de aminoácidos quantificados em urina do grupo controle e teste com valores de $R^2 = 0,429$ e $Q^2 = -0,0747$. Legenda: ■ amostras do grupo teste e ▲ amostras do grupo controle.

Para a obtenção de maiores informações, construiu-se um gráfico de *loading* em PCA, o qual pode ser visualizado na Figura 4.4. com o intuito de verificar qual das variáveis apresenta maior influência para a pequena separação entre os grupos controle e teste. Observa-se nesse gráfico que a Car apresenta a maior influência na variância

dos dados, com valor de *loading* em 0,8 na p2, seguida por Gaba com 0,7 na p1, A Ser também apresentou valores de *loadings* positivos em ambas p1 e p2, 0,21 e 0,23 respectivamente, assim como a valina com 0,41 na p1, Pode-se considerar que as demais variáveis possuem influência praticamente nula na variância dos dados, pois os valores de *loadings* são bem próximos ou menores que zero.

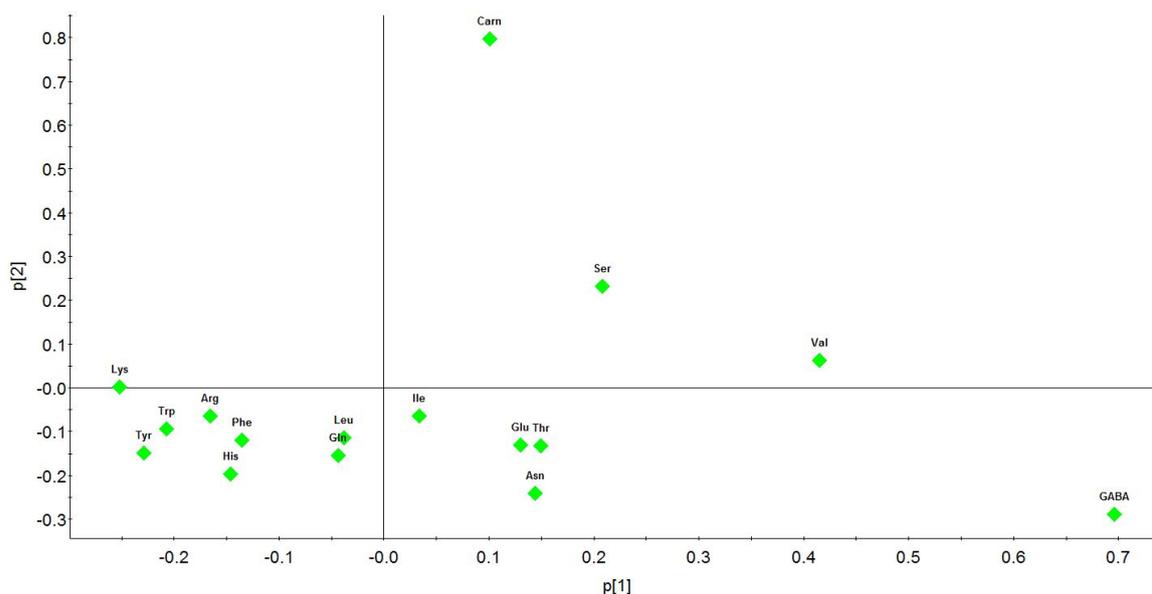


Figura. 4.4. Gráfico de *loadings* de PCA das concentrações de aminoácidos quantificadas nas amostras de urina dos grupos teste e controle.

Em seguida, um gráfico de PLS-DA foi construído com o objetivo de obter uma melhor avaliação e compreensão dos resultados. PLS-DA é uma análise estatística supervisionada e é realizada para melhorar a separação entre os grupos de observações através da rotação dos componentes de PCA, de modo que se obtenha uma separação máxima entre classes e ainda, para entender quais variáveis carregam a informação relacionada à separação das classes. O gráfico de *scores* do modelo de PLS-DA de todas as amostras foi construído para todas as concentrações determinadas e pode ser

visualizado na Figura 4.5. Assim como no modelo de PCA, observa-se que há uma separação parcial dos grupos, porém, com de R^2 e $Q^2 < 0,5$,

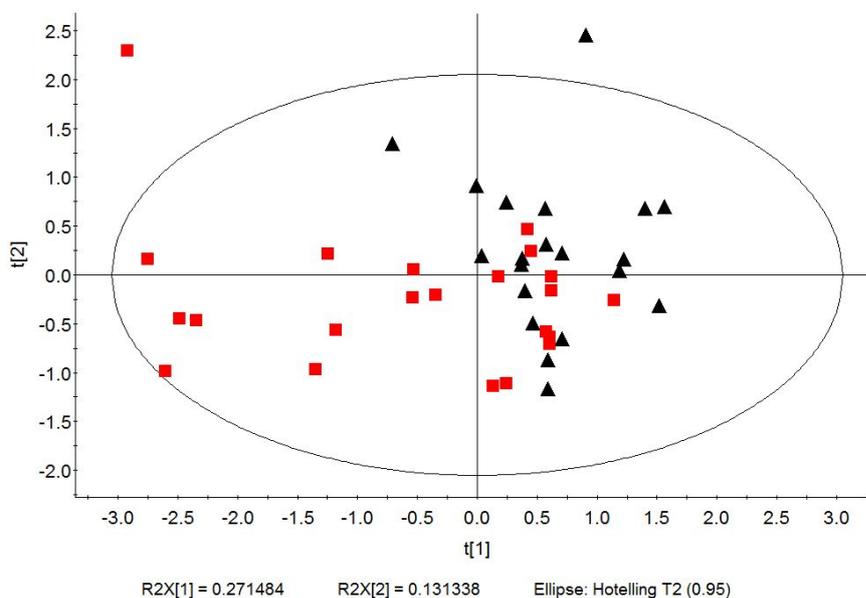


Figura 4.5. Gráfico de scores PLS-DA concentrações de aminoácidos quantificadas nas amostras de urina dos grupos teste e controle com valores de $R_2 = 0,363$ e $Q_2 = 0,153$. Legenda: ■ amostras do grupo testes e ▲ amostras do grupo controle.

A partir do modelo de PLS-DA pode-se visualizar que houve uma pequena separação entre os grupos controle e teste; porém, os parâmetros analíticos R^2 e Q^2 foram bem abaixo do esperado, comprometendo assim a qualidade e robustez do modelo.

Previamente a qualquer conclusão referente aos resultados obtidos pela análise multivariada, é importante verificar se não há o risco de rejeitar-se falsamente resultados que são verdadeiramente positivos, como não significativos. Por isso, decidiu-se testar o poder da análise estatística. O termo poder estatístico é a probabilidade de um teste estatístico rejeitar corretamente a hipótese nula e não tomar uma decisão falsa negativa. Uma hipótese nula é uma afirmação falsa (122,123). Testes

estatísticos podem ser feitos para decidir pela rejeição de uma hipótese nula a um determinado nível de confiança. Esses testes podem ser divididos em métodos paramétricos, que assumem uma probabilidade de distribuição simétrica (normal) dos dados e métodos não paramétricos, no qual os dados estão distribuídos assimetricamente. Esses dados são então tratados com uma perspectiva categórica (por ordem ou classificação) (122).

Dessa forma, teste Kolmogorov–Smirnov e Shapiro–Wilk foram realizados para testar a normalidade e distribuição das variáveis com nível de significância definido em 0,05, Ambos testes foram executados no XLStat (<https://www.xlstat.com/>), software estatístico integrado ao excel. Em seguida, testes t foram realizados usando a plataforma Metaboanalyst e XLStat. Os resultados desses testes estão compilados na tabela 4.5.

Tabela 4.5. Resultados para os testes Kolmogorov–Smirnov e Shapiro-Wilk

Aminoácido	Kolmogorov–Smirnov	Shapiro- Wilk
GABA	D = 0,450, p = 0,018	W = 0,666, p < 0,001
Ser	D= 0,227, p = 0,546	W = 0,963, p = 0,185
Val	D = 0,314, p = 0,199	W = 0,879, p = 0,004
Thr	D= 0,427, p = 0,030	W= 0,971, p = 0,369
Asn	D = 0,318, p = 0,184	W= 0,756, p < 0,001
Lys	D = 0,395, p = 0,050	W = 0,380, p < 0,001
Gln	D = 0,177, p = 0,820	W = 0,983 p = 0,779
Glu	D = 0,322, p = 0,171	W = 0,792, p < 0,001
His	D = 0,290, p = 0,271	W = 0,859, p < 0,001
Phe	D = 0,987, p = 0,122	W = 0,888, p < 0,001
Arg	D = 0,577, p = 0,008	W = 0,529, p < 0,001
Trp	D = 0,587, p = 0,223	W = 0,689, p < 0,001

Aminoácido	Kolmogorov–Smirnov	Shapiro- Wilk
Tyr	D = 0,245, p = 0,469	W = 0,833, p < 0,001
Car	D = 0,205, p = 0,697	W = 0,392, p < 0,001
Ile	D = 0,155, p = 0,926	W = 0,766, p < 0,001
Leu	D = 0,181, p = 0,793	W = 0,908, p < 0,001

A hipótese nula de ambos testes é que os dados são de uma população normalmente distribuída. Assim, se o valor de p for menor que o nível de confiança escolhido, nesse caso 0,05, a hipótese nula é rejeitada e há evidências de que os dados testados não são normalmente distribuídos. Porém, se o valor for maior do que 0,05, a hipótese nula não pode ser rejeitada, ou seja, considera-se que os dados são normalmente distribuídos (124). Contudo, o teste Shapiro-Wilk é tendencioso pelo tamanho da amostra. Dessa forma, é necessário verificar gráficos Q-Q para uma interpretação dos resultados mais confiável. De acordo com o teste Kolmogorov–Smirnov, pode-se verificar que a distribuição foi significativamente diferente de uma distribuição normal para os aminoácidos GABA, Thr, Lys e Arg, e rejeita-se a hipótese nula. Os resultados do teste Shapiro-Wilk indicam que com exceção dos aminoácidos Gln, Thr e Ser, todos os demais não são normalmente distribuídos e por isso a hipótese nula é rejeitada. Porém, ao analisar os gráficos Q-Q (Figura 4.6.), verificou-se que há evidência significativa de que os dados referente aos aminoácidos Val, His, Ile, Tyr e Phe seguem um distribuição normal.

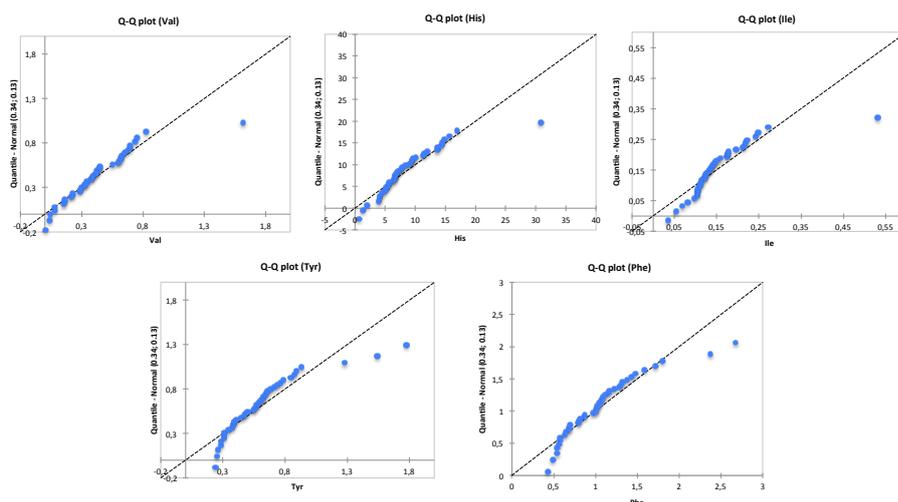


Figura 4.6. Gráficos Q-Q gerados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk.

A partir dos resultados dos testes de normalidade, considera-se os dados dos aminoácidos GABA, Thr, Lys, Glu, Asp, Arg, Trp, Carn e Leu devem ser tratados como dados não paramétricos. Então, para certificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações dos aminoácidos nas amostras controle e teste, foram empregados o teste t de Student (dados paramétricos) e Mann-Whitney U (dados não-paramétricos). Admitiu-se que há diferenças significativas entre os grupos quando os resultados gerados apresentaram p-valor <0,05 (probabilidade de significância). Os resultados podem ser verificados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. P-valores calculados pelo método Mann Whitney U e teste t de Student

Aminoácidos	Mann Whitney U/ teste t de Student
	p-valor
GABA	0,010 (MW)
Ser	0,291 (St)
Val	0,090 (St)
Thr	0,006 (MW)
Asn	0,417 (MW)

Aminoácidos	Mann Whitney U/ teste t de Student
	p-valor
Lys	0,042 (MW)
Gln	0,156 (MW)
Glu	0,713 (St)
His	0,539 (St)
Phe	0,337 (St)
Arg	0,005 (MW)
Trp	0,417 (MW)
Tyr	0,311 (St)
Car	0,299 (MW)
Ile	0,950 (MW)
Leu	0,445 (St)

MW – calculado com teste Mann Whitney U, St – calculado com teste t de Student

Para comparar e confirmar os resultados acima reportados, o p-valor também foi calculado usando a plataforma online MetaboAnalyst (Tabela 4.7.). Essa plataforma reporta apenas os resultados para as variáveis com significância estatística, determinados por ela. Os resultados podem ser conferidos abaixo.

Tabela 4.7. Variáveis identificadas através de testes t realizados no MetaboAnalyst

Aminoácidos	estatística t	p-valor	FDR
GABA	3,554	0,0010	0,016
Thr	2,921	0,0058	0,046

As análises estatísticas multivariadas não apresentaram resultados significativos para a discriminação dos grupos controle e teste baseando-se nas concentrações de aminoácidos. No entanto, pode ser que a diferenciação dos dados seja muito pequena para ser visualizada por PCA ou PLS-DA. Baseando-se nos testes univariados, acredita-

se que existem diferenças entre os níveis de alguns aminoácidos entre os grupos avaliadas, concluindo assim que esses dados carregam alguma informação para a possível discriminação de classes. O tamanho da amostragem pode ter influenciado nos resultados da análise multivariada, ou ainda as diferentes características entre os indivíduos de cada grupo, como idade, dieta e medicação.

Em seguida, uma abordagem do tipo metabolômica global foi aplicado para melhor avaliar a possibilidade de discriminar os grupo controle e teste, baseando-se nos aminoácidos e outros metabólitos.

2 Otimização do método RPLC e HILIC

O perfil metabólico de fluidos biológicos tornou-se fundamental para o monitoramento e descoberta de biomarcadores em doenças e no fornecimento de informações sobre a fisiologia humana. A escolha do tipo de fluido biológico para investigações clínicas é amplamente dependente do tipo de patologia estudada. Urina é frequentemente o fluido escolhido, especialmente para estudos que requerem grande quantidade de amostra (125,126). No entanto, a urina contém uma grande diversidade de metabólitos com diferentes características químicas e o uso de técnicas analíticas complementares, incluindo diferentes abordagens dentro de uma mesma técnica (como no caso de RPLC e HILIC), é recomendável para obter uma cobertura mais completa do metaboloma. A LC-MS vem sendo amplamente utilizada em estudos metabolômicos devido à sua robustez, rapidez e preparo de amostra simplificado (27,127). A RPLC tem sido comumente utilizada para análise de urina e tem sido

bastante aplicada para estudo metabolômico urinário (51,52). HILIC vem sendo muito aplicada em metabolômica, pois oferece informações complementares para a RPLC através da retenção dos metabólitos mais polares. Deste modo, é recomendado o uso de ambas as abordagens em investigações metabolômicas por LC. Contudo, um ponto de extrema importância é a escolha da composição química da fase estacionária de uma coluna. Quando uma coluna não é capaz de reter determinados metabólitos, diversos efeitos negativos como supressão iônica podem comprometer a robustez da análise. Adicionalmente, existe uma grande probabilidade desses metabólitos não serem identificados durante o processamento dos dados, influenciando significativamente a interpretação de toda a investigação realizada (128). Dessa forma, a otimização das condições cromatográficas é de extrema importância em análise metabolômica. Diversos trabalhos já foram reportados na literatura avaliando e comparando separações em HILIC e RPLC, e demonstrando a importância desse tipo de estudo para análise metabolômica (56,128–132). Com o objetivo de encontrar a melhor condição cromatográfica para a investigação do perfil metabolômico de urina, o desempenho de cinco colunas para HILIC e cinco colunas para RPLC, com diferentes substâncias químicas operadas a dois níveis diferentes de pH foi investigado.

2.1 RPLC

Embora a maioria das colunas disponíveis no mercado seja C₁₈ com base de sílica, a seletividade de compostos mais polares pode variar extensivamente dependendo da densidade das cadeias alquil (C₁₈), a acessibilidade do silanol, ou a presença de grupos ligantes entre a sílica e o grupo alquil. A presença de grupos

ligantes pode oferecer melhor retenção de compostos polares e ao mesmo tempo preservar as vantagens oferecidas por RPLC (133). Desenvolvimentos recentes na tecnologia RP C₁₈ oferecem oportunidades para melhorar a retenção de moléculas polares e, portanto, aumentar a cobertura de metabólitos na análise metabolômica. Analisamos a capacidade de cinco colunas para RPLC com propriedades diferenciadas, para melhor retenção de compostos polares: Kinetex EVO C₁₈, com tecnologia Core-Shell é caracterizada por garantir estabilidade em uma ampla faixa de pH (pH 1-12) e aumento da retenção de compostos básicos polares; Pentafluorophenyl (PFP), caracterizada por exibir interações do tipo ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo e aromática (π - π); BEH C₁₈ e CSH C₁₈, as quais devido à estabilidade química da tecnologia de partículas híbridas, possibilitam empregar uma faixa de pH mais ampla (pH 1-12), permitindo assim uma separação mais versátil e robusta para o desenvolvimento do método. A diferença entre CSH e BEH é que a primeira possui cargas de nível baixo na superfície da partícula, oferecendo maior eficiência em fases móveis de força iônica baixa e Zorbax RRHD Bonus-RP promete uma maior retenção e melhor formato de picos para compostos polares. Dessas colunas, a BEH é uma das mais utilizadas em análises metabolômicas urinárias (125,134,135). Todas as colunas para RPLC avaliadas possuem partículas sub 2 μ m, ou seja, são colunas para UHPLC.

Nesse estudo, o gradiente utilizado não foi inicialmente avaliado, sendo selecionado um gradiente linear, começando em 5% da fase B e chegando a 95% de B em 12 minutos. Esse gradiente foi aplicado para todas as condições e colunas estudadas. As composições das fases móveis foram mantidas o mais geral possível, usando acetato de amônio, formiato de amônio e ácido fórmico como aditivos. O objetivo é de desenvolver um sistema no qual uma ampla variedade de metabólitos

possa ser detectada e que ofereça boa relação S/N, formato de pico e tempos de retenção adequados. As colunas foram testadas em duas condições: ácida (pH 2,8) e básica (pH 8,2). Para pH 2,8, a fase móvel era composta por (A) água e (B) acetonitrila, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico como aditivo. Já para pH 8,2, fase (A) era composta por 10 mmol L⁻¹ acetato de amônio em água e (B) 95% (v/v) acetonitrila e 5% (v/v) 200 mmol L⁻¹ acetato de amônio, com pH ajustado usando solução de hidróxido de amônio. Acetonitrila foi escolhida como solvente orgânico ao invés de metanol, pois apresenta menor viscosidade e conseqüentemente uma menor queda de pressão ao longo da coluna é obtida, além de ser o solvente orgânico mais utilizado para análises metabolômicas por RPLC-MS.

As colunas foram avaliadas com uma mistura contendo 31 metabólitos, todos conhecidos por estarem presentes em urina (conforme relatado na parte experimental); ainda, uma mistura de amostras de urina também foi utilizada. Para avaliar a performance de cada coluna e da respectiva fase móvel, foi criado um sistema qualitativo de classificação para cada condição estudada. O uso de sistema de notas para avaliação do método tem como objetivo simplificar a seleção de condições cromatográficas, para a separação de um grande número de compostos, de uma maneira reprodutível e robusta. A otimização de métodos para análise metabolômica recorrendo ao uso de notas como forma de avaliação já foi reportada algumas vezes (128,129,136).

O sistema de classificação aqui apresentado foi baseado no tempo de retenção, formato do pico e relação sinal/ruído, de maneira semelhante à reportada por Contrepois (129). Três categorias foram criadas: “ótimo”, “aceitável” e “não aceitável”. O metabólito considerado como “ótimo” deve apresentar boa retenção na coluna,

rejeitando assim compostos com eluição no volume morto; o pico cromatográfico deve possuir um perfil estreito, sem nenhuma distorção, facilitando assim sua integração; e apresentar um sinal de MS intenso para ser extraído, possibilitando sua identificação com melhor exatidão. O metabólito foi considerado como “aceitável” caso apenas um dos parâmetros avaliados no critério do “ótimo” não estivesse de acordo. O metabólito foi classificado como “não aceitável”, quando mais de um parâmetro não estava de acordo, geralmente devido a picos alargados (ou apresentando desdobramentos) e baixa intensidade do sinal de MS. A avaliação dos parâmetros relacionados à mistura de metabólitos foi realizada pelo software de livre acesso Skyline (<https://skyline.ms/project/home/begin.view?>).

Em geral, a coluna CSH C18 e PFP operadas a pH 2,8 foram superiores para a separação dos 30 metabólitos testados para RPLC. Como pode ser observado na Figura 4.7., todos os metabólitos foram classificados como aceitáveis ou ótimos. No entanto, a coluna CSH demonstrou ser superior, pois um maior número de metabólitos foram classificados como ótimos, ou seja, melhores tempos de retenção, formatos de pico e S/N foram obtidos. A Figura 4.8 apresenta a comparação de formato de pico e/ou tempo de retenção de metabólitos entre as colunas testadas em pH 2,8. Além disso, a melhor resolução para os isômeros Leu e Ile (verificada com amostra de urina) foi obtida com essa coluna (Figura 4.8A), assim como resolução de linha de base entre os aminoácidos de caráter ácido, Asp e Glu, e a cistina (Figura 4.8B). Com a Zorbax é possível separar a cistina do par Asp e Glu; no entanto, esses dois aminoácidos não se separam entre si.

Metabólitos	pH 2,8					8,2				
	BEH	CSH	PFP	EVO	Zorbax	BEH	CSH	PFP	EVO	Zorbax
Hyp	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Amarelo
ADP	Vermelho	Verde	Verde	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Verde	Amarelo	Vermelho	Amarelo
AMP Cyclic	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo
Arg	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Verde	Amarelo	Vermelho
Asn	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo
Asp	Vermelho	Verde	Amarelo	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo
Biotina	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Ácido Cólico	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Creatinina	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Verde	Verde
Cistina	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo
Epinefrina	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Amarelo
Ácido Fólico	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde
Glu	Amarelo	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Verde
Gln	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo
Guanina	Amarelo	Verde	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo
Guanosina	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde
Hipoxantina	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde
Xantina	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde
IMP	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Carnitina	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho
Citrulina	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho
Leu	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Vermelho	Verde	Verde	Amarelo
Phe	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Vermelho
Fenilefrina	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Amarelo
Pro	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Taurina	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo
Teofilina	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Tyr	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Verde
Ácido Úrico	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Verde
Valina	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Amarelo

Figura 4.7. Classificação individual de cada metabólito testado para as diferentes condições e colunas testadas por RPLC-MS. Legenda: verde: ótimo, amarelo: aceitável e vermelho: não aceitável.

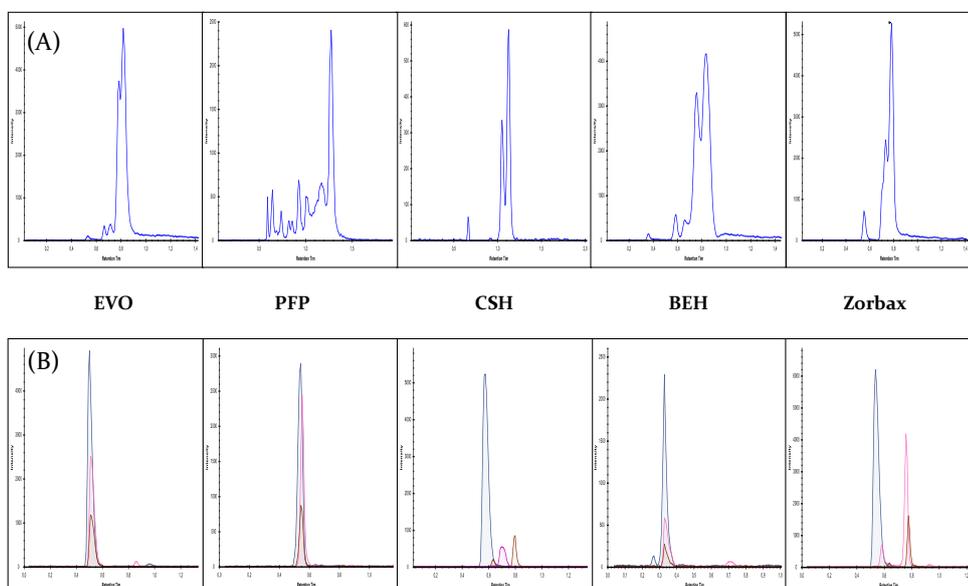


Figura 4.8. Cromatogramas do íon extraído de A) separação dos isômeros isoleucina e leucina, B) separação da cistina, Glu e Asp. Pico azul: cistina, rosa: Glu e marrom: Asp.

Para a confirmação e melhor visualização dos resultados acima discutidos, um sistema de pontuação foi criado, pontuando cada metabólito estudado com notas de 4 a 10 nas categorias tempo de retenção, S/N e formato de pico. As notas individuais de cada metabólito foram somadas para cada coluna testada e os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 4.9. Como pode se observar, a coluna CSH apresentou maior pontuação em comparação com a PFP e as demais colunas, confirmando a sua superioridade para a separação dos metabólitos testados. Embora a BEH C₁₈ seja uma das colunas mais utilizadas para análises metabolômicas por RPLC, ela ofereceu o pior resultado, especialmente relacionado ao tempo de retenção. É de amplo conhecimento que compostos mais polares, como aminoácidos e aminas, irão eluir no início da corrida em RP, muitos no volume morto ou bem próximos a ele. Contudo, algumas das colunas testadas, como a CSH, Zorbax e PFP, apresentaram um pequeno aumento na retenção desses compostos, quando comparadas com as colunas EVO e BEH, sendo que a última apresentou a pior retenção para todos os compostos testados.

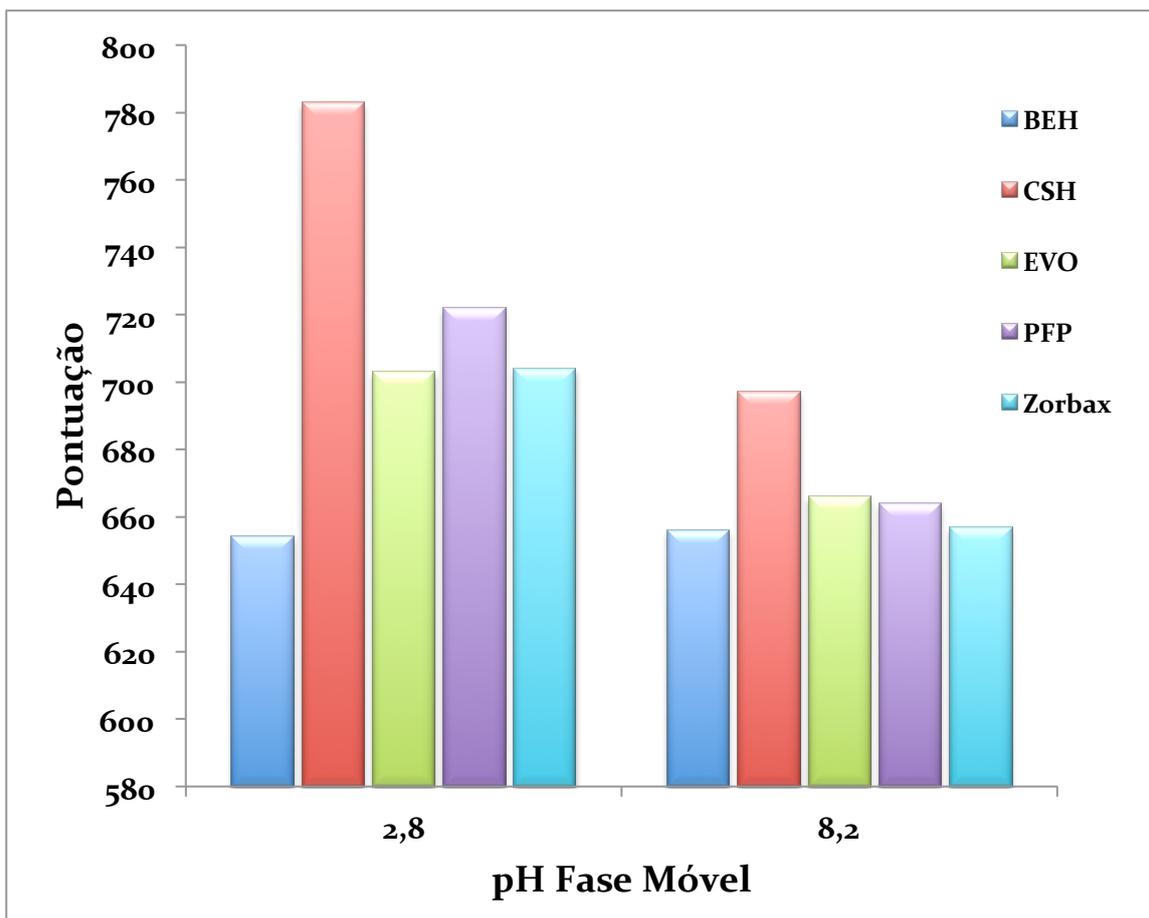


Figura 4.9. Soma da pontuação total obtida para cada condição e coluna testada por RPLC. Pontos atribuídos com base nos parâmetros: S/N, formato de pico e tempo de retenção.

Em relação à composição da fase móvel, ainda que melhores resultados tenham sido obtidos usando 0,1% (v/v) ácido fórmico como aditivo na fase móvel (como pode ser verificado na Figura 4.9, pH 2,8), o objetivo ao estudar o uso de fase móvel em pH alto e baixo era de encontrar uma única condição ótima, que promovesse a detecção do maior número possível de metabólitos, para ambos os modos de ionização: ESI⁺ e ESI⁻. Com isso, o uso do recurso de troca de polaridade poderia ser aplicado, possibilitando a detecção em ambos os modos em um única análise. No entanto, o desempenho de todas as colunas testadas, usando acetato de amônio pH 8,2 como aditivo na fase móvel, foi consideravelmente inferior às condições usando 0,1% (v/v) ácido fórmico. Portanto, a condição ácida foi a que ofereceu o melhor desempenho para a separação

dos 31 metabólitos polares investigados. Com base nesses resultados, assume-se que para obter a detecção do maior número de metabólitos em ambos os modos de ionização, existe possivelmente a necessidade de se usar diferentes condições cromatográficas; porém, maiores investigações devem ser feitas.

Adicionalmente, para testar o desempenho das colunas com uma matriz biológica real, o número de *molecular features* detectados pela análise em triplicata de uma mistura de amostras de urina foi avaliado (Figura 4.10). Ainda, a distribuição dos *molecular features* ao longo da análise cromatográfica também foi investigada (Figura 4.11). O número de *molecular features* detectados é considerado um parâmetro importante, e o mais usualmente utilizado em desenvolvimentos de métodos para metabolômica (56,128,129,132). O processamento dos dados das análises das amostras de urina foi realizado pelo XCMS, um software de acesso livre, executável na plataforma R. A tabela de dados contendo os dados de m/z , intensidade e tempo de retenção gerada no final de processamento foi utilizada para avaliar os parâmetros referentes às amostras de urina, e os resultados foram incluídos na avaliação das condições do método.

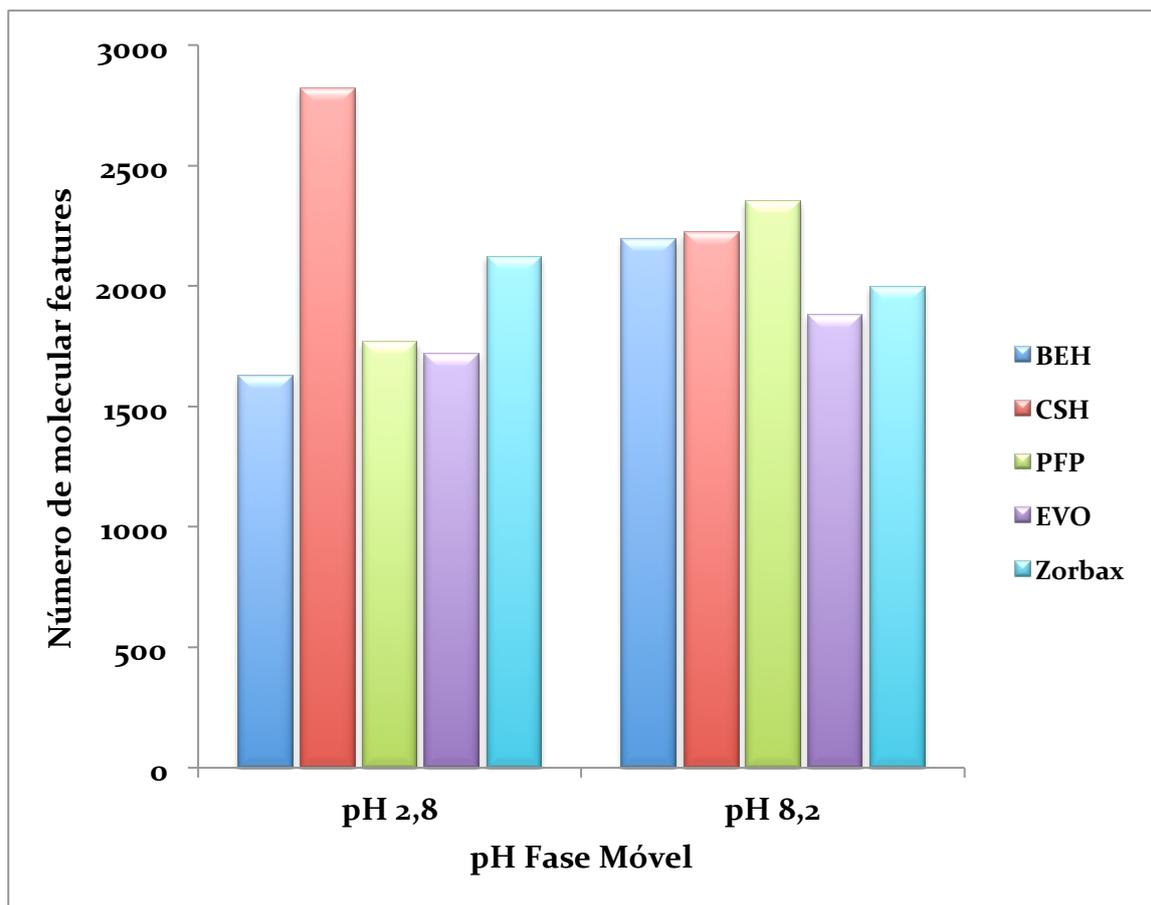


Figura 4.10. Número de *molecular features* detectados na mistura de amostras de urina por RPLC

Entre todas as condições e colunas testadas, a coluna CSH operada na condição ácida (pH 2,8) possibilitou a detecção do maior número de *molecular features*. Curiosamente, um maior número de *molecular features* foram detectados na condição básica para as colunas PFP, BEH e EVO. Nos cromatogramas das análises de urina com essas colunas em pH 8,2 é possível verificar a presença de bastante ruído. Assim sendo, parte desses *molecular features* podem ter sido erroneamente detectados. Por esse motivo, é bastante importante que a otimização de método para metabolômica avalie outros parâmetros, ao invés de unicamente o número de *molecular features* detectados. Nesse caso, os comandos do XMCS utilizados no processamento desses dados foram os padrões, ou seja, não foram otimizados especificamente para cada

condição, com isso o XMCS pode ter extraído erroneamente ruído.

Como já citado, sabe-se que a eluição de compostos no volume morto ou muito próximo dele, e/ou a coeluição de muitos compostos, pode causar supressão iônica, podendo resultar na perda de informação de certos metabólitos e, conseqüentemente, comprometer toda a investigação metabolômica. Assim, a fração de *molecular features* detectados a cada intervalo de 1 minuto durante a análise cromatográfica foi investigada. De acordo com a Figura 4.11A, em todos os casos estudados uma fração considerável de *molecular features* são eluídos no tempo do volume morto (t_0) ou muito próximo dele. Entretanto, as colunas CSH e PFP, ambas em condição ácida, apresentaram um desempenho um pouco melhor referente à distribuição dos *molecular features* ao longo da análise cromatográfica, seguida da PFP na mesma condição. Como pode ser visto, para ambas colunas, aproximadamente 20 a 21% dos *molecular features* detectados são eluídos com um janela de tempo de retenção de duas vezes o t_0 , sendo que para as demais colunas mais de 26% dos *molecular features* detectados são eluídos nesse intervalo. Na seqüência, a distribuição dos *molecular features* foi avaliada. Embora não seja possível observar grandes diferenças entre essas colunas (Figura 4.11B), a distribuição dos *molecular features* para a coluna CSH apresentou um comportamento um pouco mais linear do que para a PFP, o que pode ser confirmado com base nos valores do coeficiente de determinação da regressão linear, sendo 0,92 para a coluna CSH e 0,88 para a PFP.

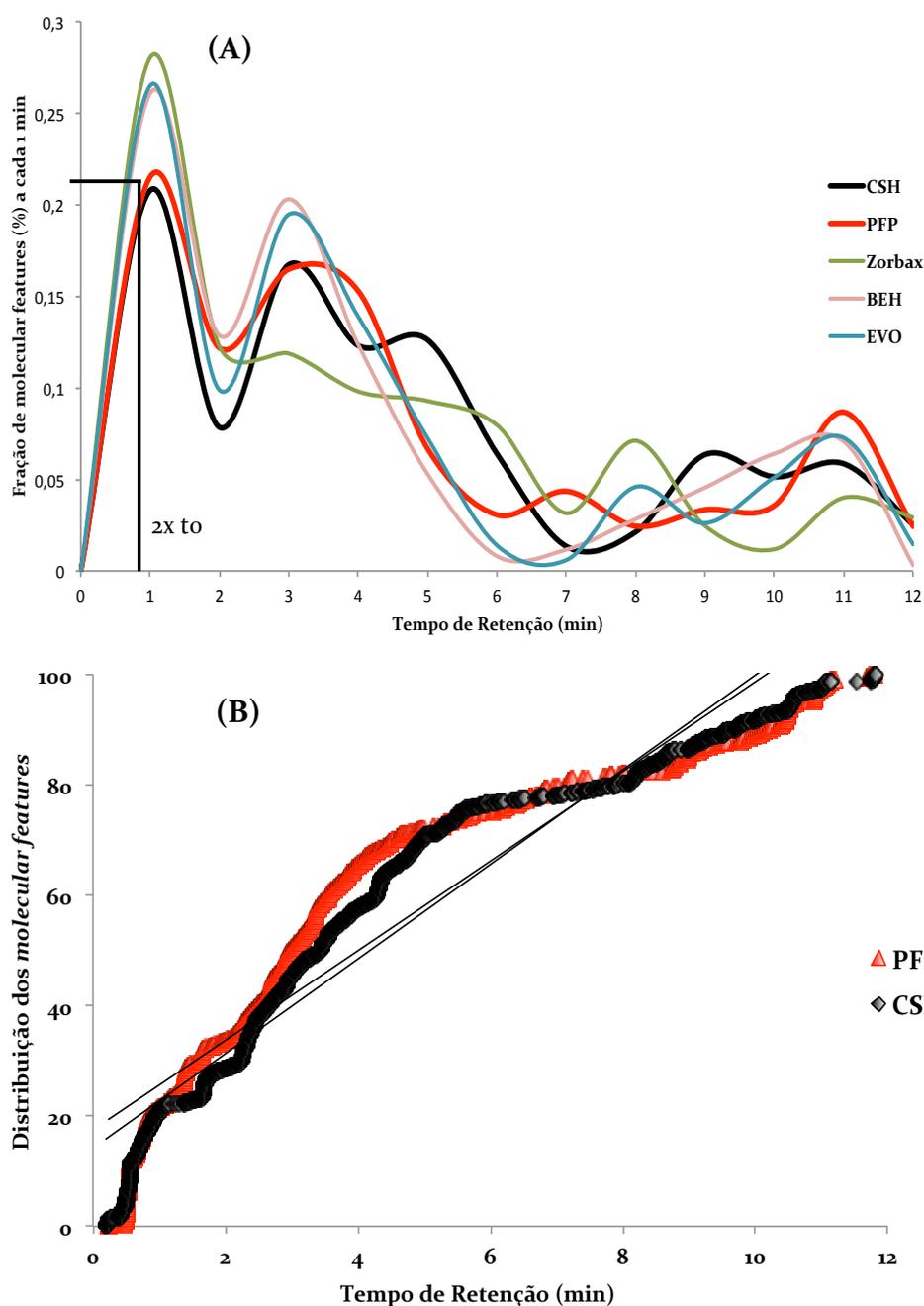


Figura 4.11. A) Porcentagem de *molecular features* a cada intervalo de 1 minuto e B) Distribuição de todos *molecular features* detectados durante a análise cromatográfica para as colunas PFP e CSH na condição ácida.

Para qualquer coluna de RPLC aplicada para a análise de compostos mais polares, o problema da eluição de muitos desses compostos no tempo do volume morto, ou muito próximo dele, sempre estará presente. No entanto, é importante usar colunas e condições que minimizem esse efeito o máximo possível. Sendo assim, a

partir da combinação dos resultados obtidos pelo testes com a mistura de 31 padrões de metabólitos, e pela análise da mistura de amostras de urina, pode-se concluir que das colunas testadas, a CSH C₁₈ foi a que apresentou melhor desempenho para análise metabolômica por RPLC-MS. Em RPLC, a retenção de compostos ionizáveis é influenciada pelas propriedades iônicas do empacotamento da coluna, causada pela presença na superfície de grupos silanol não-modificados, além de interações hidrofóbicas e interações por ligação de hidrogênio. Os compostos carregados positivamente interagem com silanóis livres da superfície através do mecanismo de troca iônica, o que resulta em uma melhora na retenção. Por outro lado, os compostos carregados negativamente são submetidos ao efeito de exclusão de íons (137). Com o intuito de minimizar a influência dos grupos silanóis na retenção de compostos, diversas empresas introduziram novas fases estacionárias com redução da atividade do silanol. Uma das tecnologias mais conhecidas e usadas é a tecnologia de partículas híbridas (BEH). Estes materiais contêm porções orgânicas tais como grupos metil ou etil em suas estruturas, proporcionando maior resistência química e mecânica, assim como uma redução significativa do número de grupos silanol disponível (138). A CSH é uma nova geração de colunas baseada também na tecnologia de partículas híbridas. As partículas CSH incorporam uma carga de superfície de baixo nível, que melhora a capacidade de carga de amostra e a simetria de pico em fases móveis de baixa força iônica, mantendo a estabilidade mecânica e química semelhante à tecnologia da BEH. Devido às propriedades da CSH (que possuem superfície carregada positivamente, além dos grupos alcanos), formatos de pico muito superiores podem ser obtidos, especialmente para compostos básicos, além de oferecer melhores seletividades para a análise de compostos ácidos, básicos e neutros (139). De fato, pode-se verificar que a

coluna CSH ofereceu perfil de picos superiores, se comparada com as demais colunas testadas; ainda, a separação dos isômeros Leu e Ile, assim como dos aminoácidos Glu e Asp, só foi obtida com essa coluna, com bons tempos de retenção, considerando que apenas 2 dos 31 metabólitos testados foram eluídos da coluna no volume morto. Para finalizar, o maior número de *molecular features* detectados e melhor distribuição desses *features* ao longo da corrida foi obtido com a coluna CSH. Dessa forma, a CSH C18 foi a coluna selecionada para a análise metabolômica por RPLC. A Figura 4.12. mostra um cromatograma de pico base da análise da amostra de urina e da mistura dos 31 padrões de metabólitos pelo método otimizado.

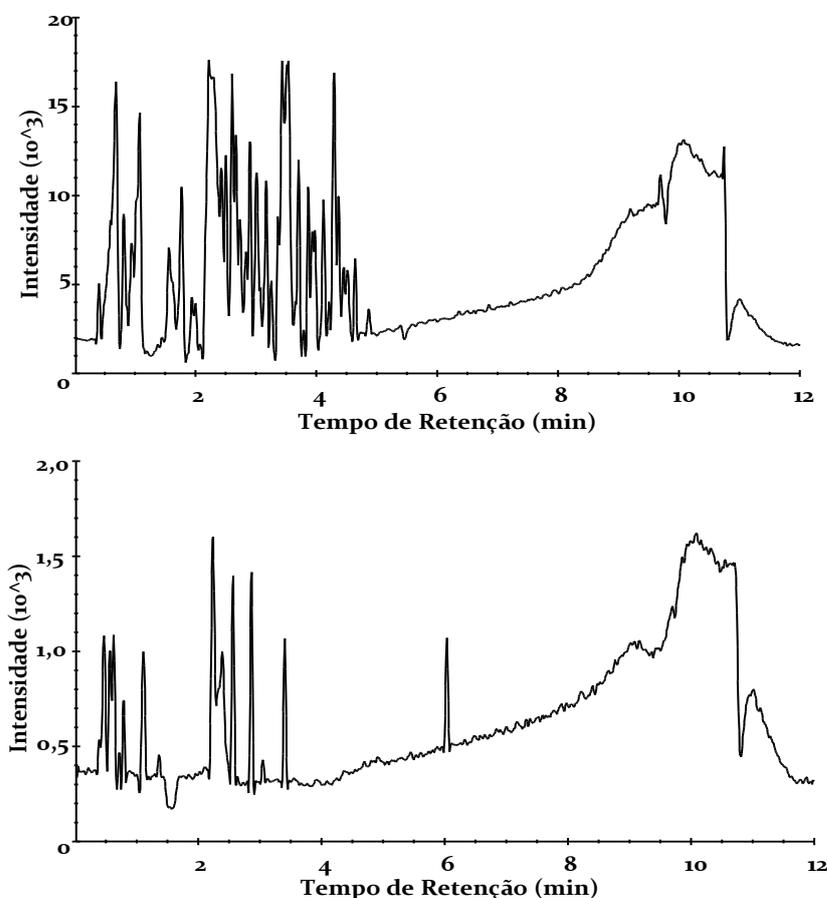


Figura 4.12. Cromatograma de pico base de (A) mistura da amostra de urina e (B) mistura dos 31 padrões de metabólitos por RPLC-MS com a coluna CSH em pH 2,8. composta por (A) água e (B) acetonitrila, ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico como aditivo. Gradiente linear, começando em 5% da fase B e chegando a 95% de B em 12 minutos. Vazão de 0,4 mL min⁻¹ e coluna mantida a 45 °C.

2.2 HILIC

Ao longo dos últimos anos, HILIC vem se tornando muito popular e tem sido cada vez mais aplicada para estudos metabolômicos em combinação com espectrometria de massas (51,57,130,140). Isso se deve ao fato de HILIC oferecer uma retenção superior para compostos hidrofílicos em comparação com RPLC. O mecanismo geral de retenção em HILIC é baseado no equilíbrio de partição dos analitos entre a fase móvel orgânica e a camada aquosa formada na superfície da fase estacionária polar. Acredita-se também que podem ocorrer interações do tipo ligação de hidrogênio entre os grupos funcionais polares dos analitos e da fase estacionária, além de interações eletrostáticas entre a fase estacionária e grupos funcionais ionizados dos analito. Ainda, podem ocorrer interações do tipo forças de van der Waals entre a porção hidrofóbica da fase estacionária e grupos não polares dos analitos, e adsorção dos analitos na superfície do adsorvente (141,142). Atualmente, diversas colunas para HILIC com diferentes desempenhos cromatográficos podem ser encontradas no mercado. Diversas investigações para comparação e caracterização do mecanismos de retenção em HILIC já foram reportadas (141,143). No entanto, esses trabalhos oferecem um entendimento teórico das interações cromatográficas em HILIC, não sendo guias realmente adequados para a seleção de colunas para estudos metabolômicos. Um série de outros estudos avaliando diferentes colunas HILIC para aplicação em estudos metabolômicos já foi reportada (128,129,132,144). Entretanto, não há um consenso entre esses trabalhos sobre a coluna ideal para análises metabolômicas urinárias.

Atualmente, existem três grupos de composição química de fases estacionárias

para colunas HILIC: sílica (modificada)/neutra, carregada e zwitteriônica. Entre esses grupos, acredita-se que a fase estacionária zwitteriônica apresente o maior potencial para análises metabolômicas, visto que, como já demonstrado em alguns estudos, dependendo das propriedades químicas do analito e composição da fase móvel, interações eletrostáticas com partes permanentemente carregadas e a adsorção de ligação de hidrogênio no substrato da sílica podem ocorrer na fase estacionária zwitteriônica (132). A primeira coluna HILIC zwitteriônica foi fabricada através da ligação de porções de sulfobetaína na base de sílica, criando uma superfície negativamente carregada, devido à presença dos grupos sulfônicos, e produzindo atração eletrostática de analitos positivamente carregados em valores de pH baixo (56,145). Essa coluna zwitteriônica, vem sendo amplamente utilizada para estudos metabolômicos por HILIC-MS (146–148). Recentemente, foi introduzida uma nova fase estacionária zwitteriônica ligada covalentemente com porções de fosforilcolina (149). De acordo com o fabricante, o arranjo inverso dos grupos carregados da fosforilcolina, em comparação à sulfobetaína, deverá proporcionar uma diferente seletividade para solutos carregados no modo HILIC. Até o momento, não há aplicações reportadas na literatura usando este novo tipo de fase estacionária zwitteriônica na análise metabolômica urinária. Dessa forma, neste trabalho foram investigadas quatro colunas para HILIC com diferentes composições químicas na fase estacionária e ainda o efeito de duas composições de fase móvel também foi avaliado.

As colunas selecionadas foram: BEH HILIC, BEH amida e duas zwitteriônicas, ZIC-HILIC e ZIC-cHILIC. Essas colunas foram selecionadas devido à sua complementaridade de seletividade para uma ampla variedade de compostos (129). As colunas testadas foram operadas em duas condições: ácida (pH 3,2) e próxima da

neutralidade (pH 6,8). Para pH 3,2, a fase móvel era composta por (A) 95% (v/v) acetonitrila e 5% (v/v) 200 mmol L⁻¹ formiato de amônio e (B) 50% (v/v) acetonitrila, 50% 100 mmol L⁻¹ formiato de amônio. Para pH 6,8, composição da fase (A) 95% (v/v) acetonitrila e 5% (v/v) 200 mmol L⁻¹ de acetato de amônio e (B) 50% (v/v) acetonitrila, 50% 100 mmol L⁻¹ formiato de amônio. O gradiente utilizado foi: 0-3 min, 1% (B), 3-17 min, 90% (B); 17,0-17,1, 1% (B), 17-21 min, 1% (B). Uma vazão de 0,4 mL min⁻¹ foi utilizada para todos os testes e todas colunas foram mantidas a 40°C. Os parâmetros avaliados para os testes realizados para HILIC são os mesmos utilizados para RPLC.

Como pode ser observado na Figura 4.13, das quatro colunas testadas, a coluna ZIC-HILIC em pH 6,8 e ZIC-HILIC em pH 3,2 apresentaram melhores resultados para separação dos metabólitos testados. Ambas as colunas zwitteriônicas apresentaram seis metabólitos com classificação “não aceitável”, oito “ótimo” e o restante “aceitável”. No geral, o perfil dos picos, tempo de retenção e S/N obtidos nessa condição foram superiores com a ZIC-HILIC do que com as demais condições testadas. Porém, alguns metabólitos, como o ácido cólico, apresentaram um perfil muito ruim com as colunas zwitteriônicas, com picos bastante alargados, e baixo valor de relação S/N e, tempos de retenção próximos ao t₀ foram observados com a coluna ZIC-cHILIC. A BEH HILIC, em os ambos pHs avaliados, foi a coluna que apresentou pior desempenho, sendo que nenhum metabólito foi classificado como “ótimo” em pH 6,8, e apenas três em pH 3,2. Um grande problema observado com essa coluna em pH 6,8 foi que alguns metabólitos, como a guanina, guanosina e IMP, apresentaram fraca retenção, eluindo da coluna próximo ao t₀. Tal fenômeno não foi observado em nenhuma das demais condições testadas. Essa retenção mais fraca pode ser atribuída ao fato da BEH HILIC ser fabricada com sílica híbrida não derivatizada (tecnologia BEH). Isso porque a

retenção em HILIC não está apenas relacionada com a hidrofobicidade do composto analisado, a capacidade de estabelecer interações do tipo ligação de hidrogênio também influencia na retenção. Devido à tecnologia BEH, essa coluna apresenta menor quantidade de silanol residual, resultando assim em menor capacidade de ligação de hidrogênio e possivelmente menor tempo de retenção (150). Outro problema para essa coluna, em ambos os pHs testados, foi o perfil de pico ruim, visto que a maioria dos metabólitos apresentaram longas caudas, perfil largo e em alguns casos divisão do pico. Problemas de baixa repetibilidade do tempo de retenção também foram observados entre réplicas de análises, mesmo após longo condicionamento da coluna e uma série de injeções prévias. A separação dos isômeros Leu e Ile com resolução em linha de base foi observada em diferentes colunas e condições, sendo elas: BEH Amida, ZIC-HILIC e ZIC-cHILIC em pH 6,8 e BEH HILIC e ZIC-cHILIC em pH 3,2. No entanto, a melhor resolução foi obtida com a BEH em pH 3,2 e com a ZIC-HILIC em pH 6,8.

Metabólitos \ Colunas	pH 3,2				pH 6,8			
	BEH Amida	BEH	ZIC-HILIC	ZIC-cHILIC	BEH Amida	BEH	ZIC-HILIC	ZIC-cHILIC
Hyp	Amarelo	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde
ADP	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Amarelo
AMP Cyclic	Verde	Amarelo	Amarelo	Verde	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Verde
Arg	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Asn	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Asp	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho
Biotina	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Ácido Cólico	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho
Creatinina	Amarelo	Amarelo	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo
Cistina	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Verde	Amarelo
Epinefrina	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Amarelo	Vermelho	Amarelo
Ácido Fólico	Amarelo	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo	Verde	Verde
Glu	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	Verde
Gln	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Verde	Amarelo
Guanina	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Guanosina	Verde	Amarelo	Amarelo	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo
Hipoxantina	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Amarelo
Xantina	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
IMP	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Amarelo
Carnitina	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho
Citrulina	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho
Leu	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo
Phe	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Fenilefrina	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Verde	Amarelo
Pro	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Taurina	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo
Teofilina	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Amarelo
Tyr	Amarelo	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Verde
Ácido Úrico	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo
Valina	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo

Figura 4.13. Classificação individual de cada metabólito testado para as diferentes condições e colunas testadas por HILIC. Legenda: verde: ótimo, amarelo: aceitável e vermelho: não aceitável.

O sistema de pontuação citado anteriormente foi utilizado para confirmar os resultados acima apresentados. As somas das notas individuais de cada metabólito podem ser visualizadas na Figura 4.14. Baseado nesses dados, é possível confirmar a superioridade da ZIC-HILIC em pH 6,8 e ZIC-cHILIC em pH 3,2 para a separação dos metabólitos avaliados. A ZIC-HILIC é uma das colunas mais utilizadas em metabolômica para HILIC-MS, principalmente devido ao fato de ser uma coluna zwitteriônica, possibilitando interações eletrostáticas, adicionalmente às demais

interações já conhecidas para colunas HILIC. Dependendo da composição química da coluna zwitteriônica, esse tipo de interação pode favorecer ou piorar a separação e retenção de compostos ionizados. Dependendo do pH empregado na fase-móvel, perfis de pico ruins podem ocorrer devido a uma competição entre a partição hidrofílica e interações eletrostáticas para compostos (parcialmente) ionizados. Essa é uma das razões pelas quais compostos ácidos apresentam pior perfil de pico quando se combinam ZIC-HILIC e pH baixo; o mesmo acontece com a ZIC-cHILIC e compostos básicos (56). Não existem trabalhos na literatura reportando o uso da coluna ZIC-cHILIC para estudos metabolômicos usando urina como amostra de estudo; porém, baseado no desempenho dessa coluna para os metabólitos avaliados, parece ser uma boa alternativa para análise metabolômica.

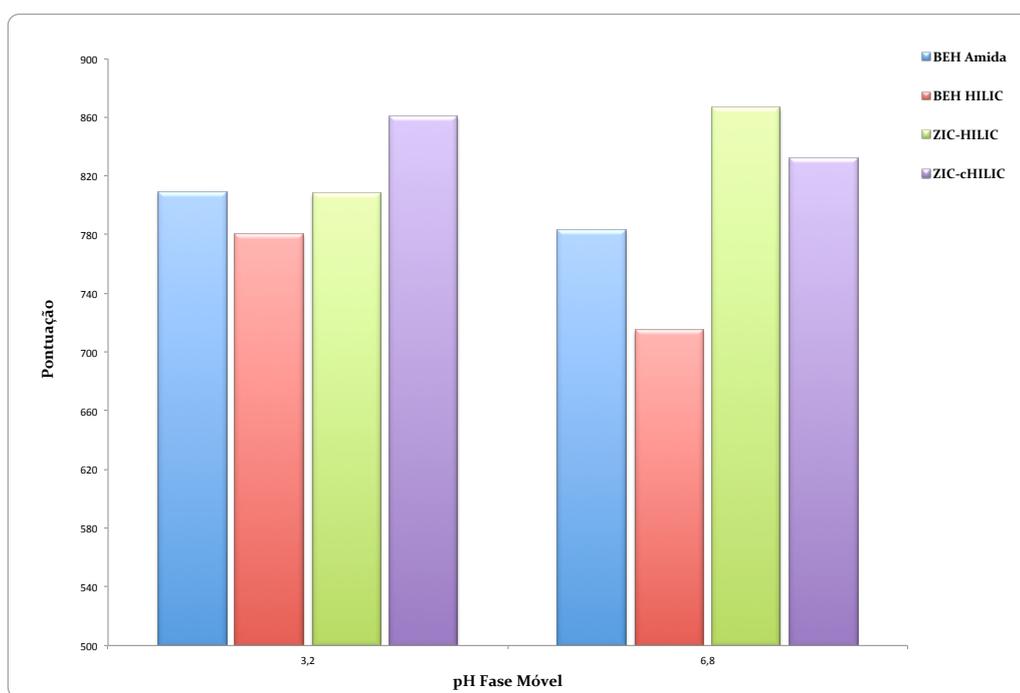


Figura 4.14. Soma da pontuação total obtida para cada condição e coluna testada por HILIC-MS. Pontos atribuídos com base nos parâmetros: S/N, formato de pico e tempo de retenção.

Assim como feito para RPLC-MS, para testar o desempenho das colunas com uma amostra real, uma mistura de urinas foi utilizada para monitorar o número de

molecular features e as distribuições ao longo do gradiente aplicado. Como pode ser observado na Figura 4.15, com exceção da BEH Amida, todas as demais colunas testadas apresentaram número de *molecular features* similares em ambas as condições (ácida e neutra) e a BEH amida em pH 6,8 foi a que detectou o maior número de *features* (2743), seguida pela ZIC-HILIC no mesmo pH (2735). O maior número de *molecular features* foram detectados na condição neutra para as colunas BEH HILIC, BEH Amida e ZIC-HILIC. Diferentemente dos resultados observados para os testes com os padrões de aminoácidos, a ZIC-cHILIC foi a coluna que apresentou o pior desempenho em relação ao número de *molecular features*.

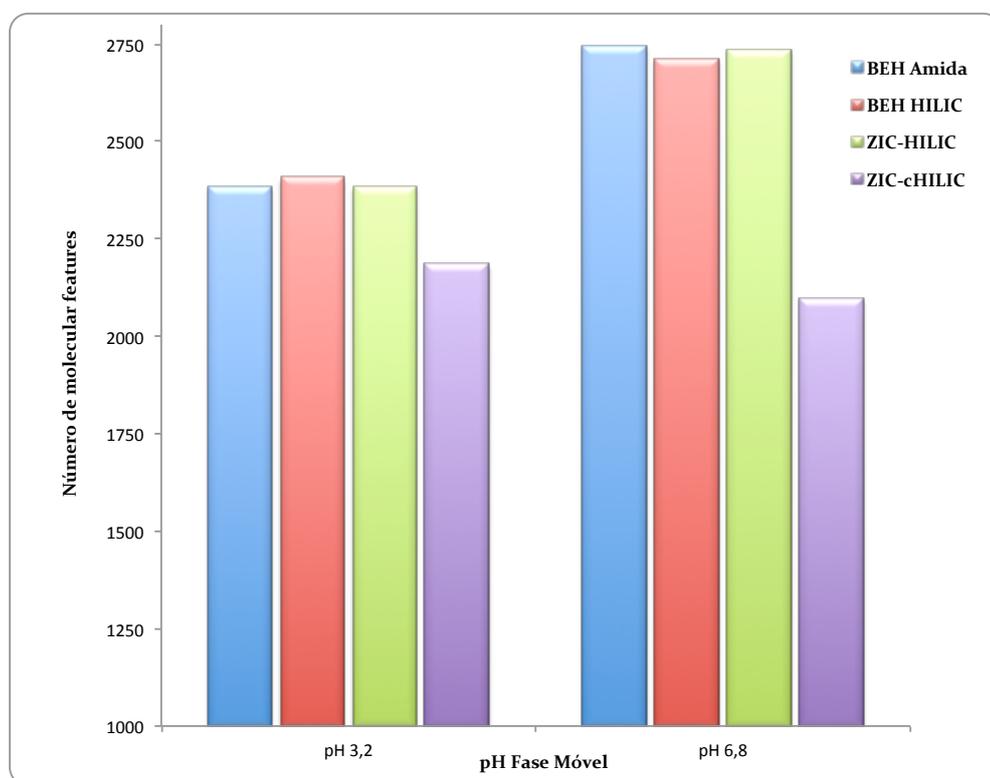


Figura 4.15. Número de *molecular features* detectados na mistura de amostras de urina analisadas por HILIC.

O número de *molecular features* não deve ser usado sozinho para avaliar o desempenho de uma coluna ou condição sem entender suas distribuições ao longo da

análise cromatográfica. Quanto maior o espalhamento dos analitos durante o gradiente, menor supressão de ionização é esperada. Além disso, definir possíveis agrupamentos de compostos por janelas de tempo de retenção, pode auxiliar posteriormente na identificação desses compostos. A Figura 4.16 mostra a fração de *molecular features* detectados durante a análise cromatográfica (semelhante a RP). Pode-se observar que para todas as condições e colunas avaliadas, mais de 25% dos *molecular features* são eluídos com uma janela de tempo de retenção de duas vezes o t_0 . Ainda, em todas as condições, aproximadamente 90% dos *molecular features* são eluídos da coluna em até 12 min, porém com coluna ZIC-HILIC em pH 6,8 aproximadamente 75% com o mesmo tempo de análise. No geral, a coluna ZIC-HILIC, em condição neutra foi a que apresentou o melhor desempenho referente à distribuição dos *molecular features* ao longo de toda análise, seguida pela BEH amida e ZIC-cHILIC na condição ácida. Embora as diferenças entre as colunas não seja ampla, a distribuição dos *molecular features* para a ZIC-HILIC pH 6,8 e a BEH Amida pH 3,2 apresentaram um comportamento um pouco mais linear do que para as demais condições e colunas, como pode ser observado na Figura 4.16.

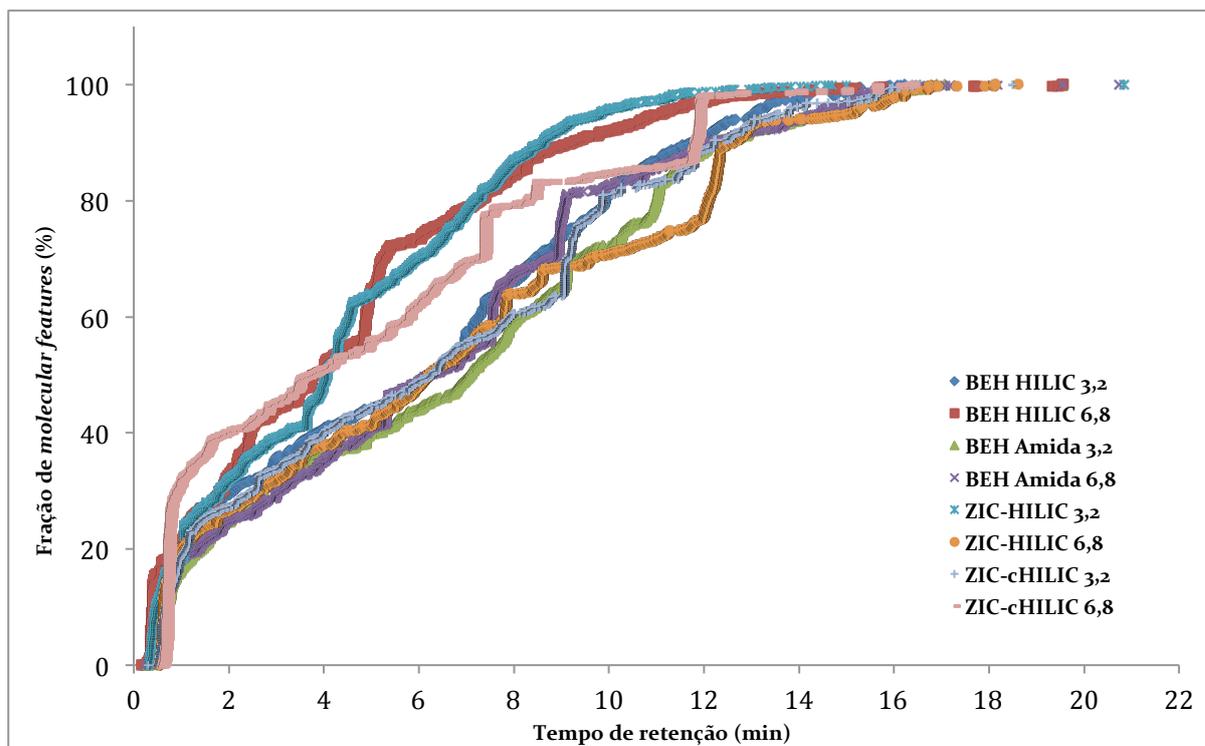


Figura 4.16. Distribuição de todos *molecular features* detectados durante a análise por HILIC para todas as condições avaliadas.

Dessa forma, usando o sistema de pontuação e classificação dos metabólitos para avaliar o desempenho das colunas e, adicionalmente a avaliação do número de *molecular features* detectados e a distribuição deles durante a análise cromatográfica, concluiu-se que a coluna ZIC-HILIC em condição neutra foi a que apresentou melhor desempenho para a análise metabolômica de urina por HILIC-MS. A coluna ZIC-cHILIC também apresentou um desempenho consideravelmente bom para a mistura de metabólitos; no entanto, um número bem menor de *molecular features* pode ser detectado, além de uma distribuição inferior se comparada com a ZIC-HILIC, e por isso essa coluna não foi escolhida. Adicionalmente, além de possibilitar a detecção de um maior número de *molecular features*, os picos dos metabólitos avaliados apresentaram melhores perfis quando analisados com a coluna ZIC-HILIC em pH 6,8, possivelmente devido ao mecanismo de separação dessa coluna zwitteriônica. O formato de pico é

um fator muito importante em metabolômica, pois sabe-se que a qualidade dos picos cromatográficos gerados pode ter um grande efeito na qualidade do processamento dos dados. Formatos de pico ruins podem interferir com a extração dos picos (*peak picking* no XCMS) e alinhamento durante o processamento, e conseqüentemente podem confundir na identificação dos metabólitos e produção de informações comparativas erradas, podendo resultar em uma falsa interpretação biológica. Um cromatograma de pico base da amostra de urina e mistura de padrões nas condições otimizadas é apresentado na Figura 4.17.

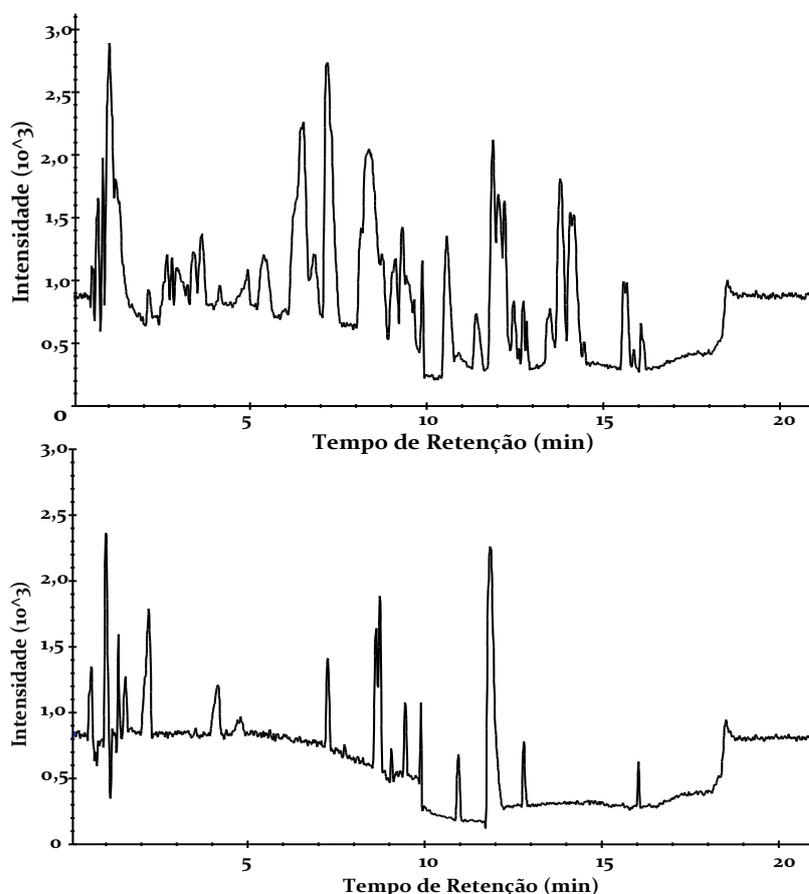


Figura 4.17. Cromatograma de pico base de (A) mistura da amostra de urina e (B) mistura de padrões dos 31 metabólitos por HILIC-MS com a coluna ZIC-HILIC, pH 6,8. Composição da fase (A) 95% (v/v) acetonitrila e 5% (v/v) 200 mmol L⁻¹ acetato de amônio e (B) 50% (v/v) acetonitrila, 50% 100 mmol L⁻¹ formiato de amônio. Gradiente: 0-3 min, 1% (B), 3-17 min, 90% (B); 17,0-17,1, 1% (B), 17-21 min, 1% (B). Vazão 0,4 mL min⁻¹, coluna mantida a 40°C.

3 Investição metabolômica por CESI-MS e RPLC-MS

Embora a urina seja amplamente considerada como um produto residual, ela apresenta um valor considerável como fluido biológico para diagnósticos clínicos. Na verdade, a análise da urina para fins médicos vem sendo usada a mais de 6000 anos (151). Como já reportado anteriormente, sabe-se que a composição metabólica urinária reflete o estado fisiológico de um organismo, e dessa forma pode ser uma leitura útil de múltiplos processos fisiológicos/fisiopatológicos. Ainda, a urina contém a assinatura metabólica de diversas vias bioquímicas e sendo assim, este fluido biológico é ideal para análises metabolômicas, especialmente quando relacionados a doenças renais e do sistema urinário (152,153). Além disso, urina pode ser coletada de maneira não invasiva e normalmente não requer um extensivo preparo de amostra. Nesse estudo, realizou-se uma investigação exploratória usando RPLC-MS e CESI-MS como técnicas analíticas para identificar perfis metabólicos urinários que se correlacionem com o refluxo vésico ureteral. A busca por diagnósticos alternativos aos convencionalmente utilizados tem como objetivo a descoberta de métodos de diagnóstico menos invasivos.

Para melhor cobertura de metabólitos com diferentes características químicas, a investigação metabolômica global foi realizada utilizando CESI-MS e RPLC-MS como técnicas analíticas. Amostras de urina coletadas no UZ Leuven (Bélgica) dos grupos controle (crianças saudáveis) e teste (crianças com RVU) foram utilizados na análise metabolômica por CESI-MS e RPLC-MS. Amostras denominadas de controle de qualidade (QC) foram preparadas a partir da mistura de volumes idênticos de todas as amostras utilizadas no estudo. O QC foi analisado durante toda a sequência analítica,

com a intenção de verificar o comportamento e estabilidade instrumental durante as análises.

Os dados brutos gerados foram convertidos pelo MSConvert e posteriormente analisados no XCMS. Esses dados são processados para a obtenção de uma matriz de dados, a qual será avaliada por ferramentas de análise estatística multivariada e univariada. Todos os dados de CESI-MS e de RPLC-MS foram processados usando o método *centWave*, os parâmetros de detecção de picos, agrupamento e alinhamento utilizados no processamento final foram determinados com base em avaliações da matriz de dados gerada. Para isso, o número de *molecular features* detectados, o número de *missing values* e zeros, e ainda o desvio padrão nos tempos de retenção durante o alinhamento (para RPLC) foram avaliados. Para os dados de RPLC-MS, os parâmetros escolhidos foram: *snthresh* 10, *bw* 5, *mzwid* 0,025, *minfrac* 1 e *noise* 50000; o comando *fillPeaks* foi aplicado para integrar *missing values* e a normalização foi realizada pela mediana. Já para CESI-MS, o primeiro passo foi o alinhamento dos eletroferogramas usando a ferramenta *msalign2* (107). Na sequência, os comandos utilizados foram os mesmos descritos para RPLC. Os dados normalizados pela mediana foram então inseridos no software SIMCA-P+ para avaliação multivariada.

Primeiramente, um gráfico de scores de PCA foi construído incluindo todas as amostras de urina e os QCs com o objetivo de avaliar a qualidade dos dados gerado na sequência analítica. É possível verificar nos gráficos da Figura 4.18 que as amostras controle e teste apresentam-se parcialmente separadas, para ambas as técnicas analíticas, comprovando que metabólitos carregam informações para discriminação entre os grupos investigados. Pode-se observar que as amostras controles da análise por RPLC-MS apresentam-se dispersas entre si; porém, a análise por PCA não é

classificatória e é feita para avaliar a qualidade dos dados e desempenho da análise. Os QCs encontram-se agrupados no gráfico, revelando que não houve problema instrumental durante a análise das amostras. A análise de QC é realizada para controlar o desempenho e estabilidade do método analítico empregado, por isso o QC é analisado no início, entre cada cinco amostras e novamente no final da sequência.

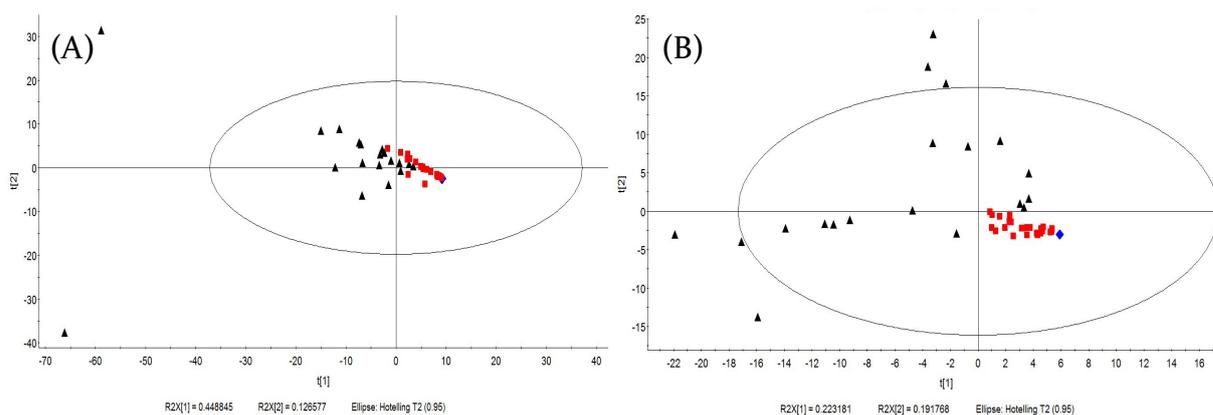


Figura 4.18. Gráficos de scores de PCA para as amostras de urina dos grupos testes e controle analisadas por A) CESI-MS com $R^2 = 0,764$ e $Q^2 = 0,804$ e B) RPLC-MS com $R^2 = 0,748$ e $Q^2 = 0,0767$.
Legenda: ■ amostras teste, ▲ amostras controle e ♦ QC

Para confirmar a qualidade dos dados um modelo de PLS-DA com predição de QCs foi construído. As amostras do grupo QC encontram-se novamente agrupadas, demonstrando a estabilidade do sistema analítico e qualidade do modelo gerado, o qual pode ser confirmado baseado nos valores de Q^2 , apresentando 76% de capacidade de previsão (Q^2) para CESI-MS e 85% para os de RPLC-MS. Os modelos obtidos são apresentados na Figura 4.19.

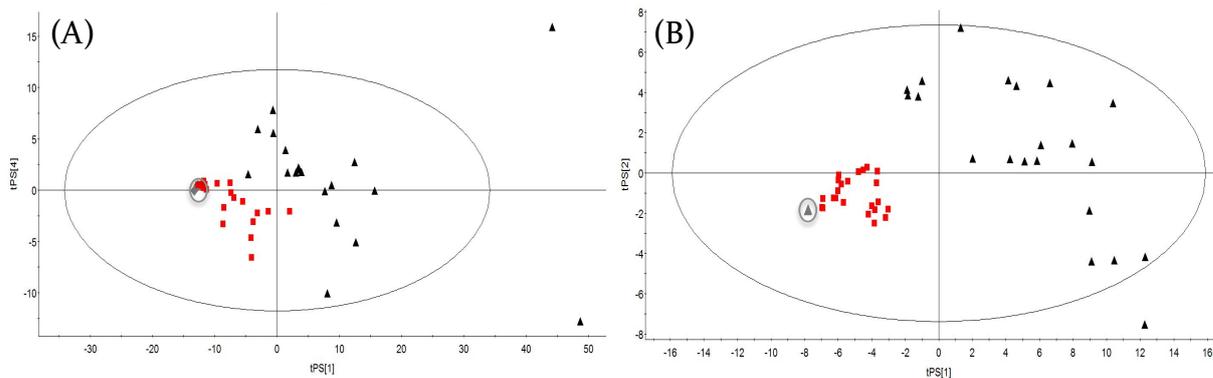


Figura 4.19. Gráficos de scores de PLS-DA com predição de QC para as amostras de urina dos grupos testes e controle analisadas por A) CESI-MS com $R^2 = 0,974$ e $Q^2 = 0,760$ e B) RPLC-MS com $R^2 = 0,992$ e $Q^2 = 0,850$. Legenda: ■ amostras teste, ▲ amostras controle e ◆ QC

Verificada a qualidade dos dados obtidos, somente as amostras, sem incluir os QCs, foram submetidas à análise estatística, para buscar os metabólitos discriminantes entre os grupos investigados. Um segundo gráfico de *scores* de PLS-DA foi construído (Figura 4.20), o qual mostra uma boa separação entre o grupos teste e controle com um valor de Q^2 de 0,751 para CESI-MS e 0,858 para RPLC-MS. Contudo, modelos de PLS-DA podem apresentar *overfitting*, e por esse motivo recomenda-se que o modelo obtido seja validado.

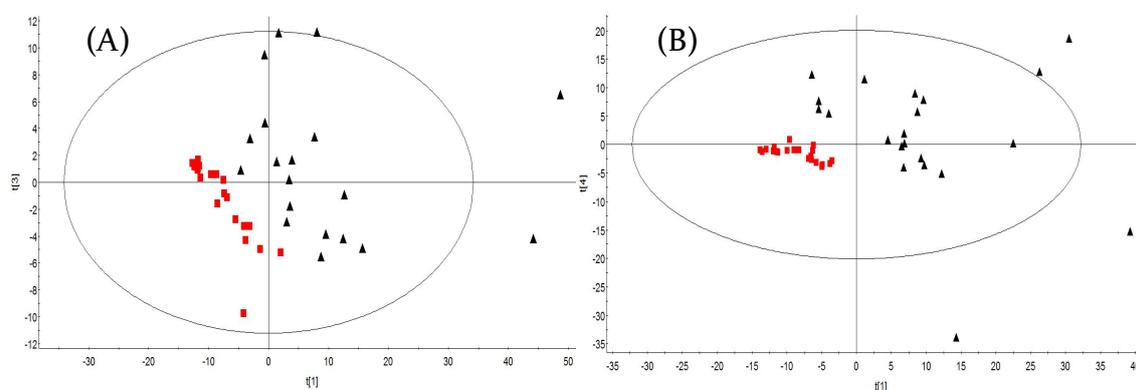


Figura 4.20. Gráficos de scores de PLS-DA sem QC para as amostras de urina dos grupos testes e controle analisadas por A) CESI-MS com $R^2 = 0,977$ e $Q^2 = 0,751$ e B) RPLC-MS com $R^2 = 0,989$ e $Q^2 = 0,858$. Legenda: ■ amostras teste, ▲ amostras controle

Dessa forma, a validação cruzada desse modelo foi realizado por testes de

permutações, para verificar, a partir dos valores de R^2 e Q^2 , se as diferenças entre classificação das amostras no modelo gerado por PLS-DA são significativas. Neste teste, a matriz de dados X é mantida fixa e a matriz de resposta Y é permutada por 100 vezes. A cada permutação, um novo modelo de PLS-DA é gerado, assim como novos valores de R^2 e Q^2 . No final do teste, esses valores estimados deverão ser menores do que o valores obtidos pelo modelo de PLS-DA. No gráfico gerado, o eixo Y fornece os valores de R^2 e Q^2 obtidos em cada uma das permutações. Através desse gráfico é possível determinar se os valores de R^2 e o Q^2 gerados a partir do teste de permutação fornecem valores inferiores ao valor de R^2 e Q^2 do modelo atual, validando o modelo (108). Para ambos os modelos de CESI-MS e RPLC-MS, teste de 100 permutações foram realizadas e, como pode ser observado pela Figura 4.21, os valores de R^2 e Q^2 são inferiores, validando o modelo para ambos modelos.

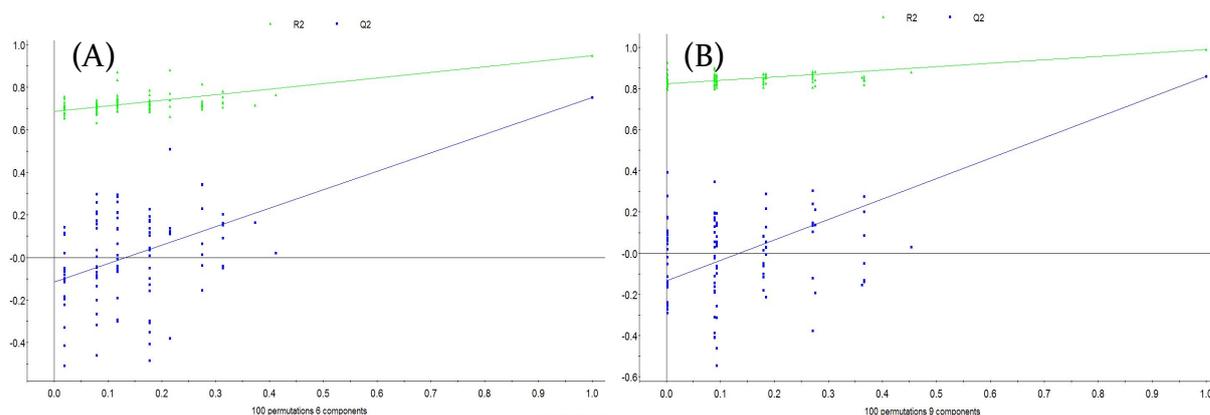


Figura 4.21. Gráfico da validação do modelo de PLS-DA pelo teste de permutação (100 permutações) de R^2 e Q^2 .

CV-ANOVA é outro teste utilizado para validar e avaliar o modelo de PLS-DA. A validação é baseada nos valores de F (o qual avalia se o modelo possui resíduos preditivos menores que a variação global em torno da média), e no p-valor (que indica a probabilidade de que um modelo com determinado valor de F seja resultado do

acaso). Os valores para CESI-MS e RPLC-MS estão descritos na Tabela 4.8 e Tabela 4.9, respectivamente.

Tabela 4.8. CV-ANOVA para o modelo PLS-DA para análises por CESI-MS

	Soma dos quadrados dos resíduos	Graus de liberdade	Variância	F	p	Desvio padrão
Total	40	40	1			1
Regressão	32,8	12	2,73	10,6	$1,74 \cdot 10^{-7}$	1,65
Residual	7,20	28	0,257			0,507

Tabela 4.9. CV-ANOVA para o modelo PLS-DA para análises por RPLC-MS

	Soma dos quadrados dos resíduos	Graus de liberdade	Variância	F	p	Desvio padrão
Total	43	43	1			1
Regressão	36,1	16	2,26	8,89	$5,35 \cdot 10^{-7}$	1,50
Residual	6,86	27	0,254			0,504

Também foi construído modelo de OPLS-DA para busca de metabólitos discriminantes entre os grupos investigados, por meio do gráfico S-plot. Entretanto, poucos metabólitos discriminantes com valores maiores que 0,8 foram encontrados a partir da análise do S-plot. Desta forma, decidiu-se por não utilizar esse parâmetro como forma de seleção dos metabólitos. Na Figura 4.22, os modelos de OPLS-DA obtidos para CESI-MS e RPLC-MS podem ser visualizados, os quais apresentam ótimas separações entre as amostras com R^2 de 0,995 e 0,989 e Q^2 de 0,635 e 0,619, para CESI-MS e RPLC-MS, respectivamente.

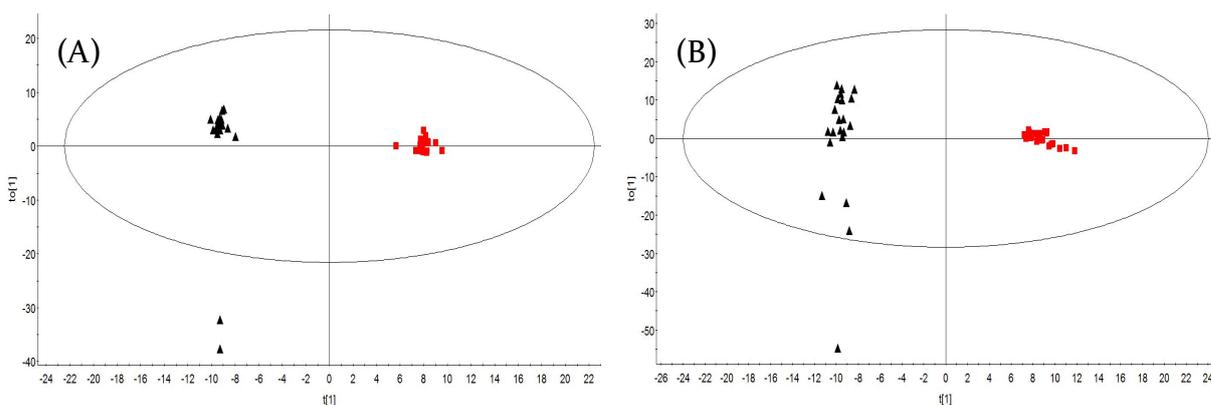


Figura 4.22. Gráficos de scores de OPLS-DA para as amostras de urina dos grupos testes e controle analisadas por A) CESI-MS com $R^2 = 0,995$ e $Q^2 = 0,635$ e B) RPLC-MS com $R^2 = 0,989$ e $Q^2 = 0,619$. Legenda: ■ amostras teste, ▲ amostras controle.

Para a seleção dos metabólitos discriminantes, optou-se por utilizar os valores de VIP, que demonstram o quanto uma variável é importante dentro do modelo de PLS-DA obtido. Metabólitos com valores de VIP maiores que 1,0 foram considerados como significativos. Além disso, o teste não paramétrico Mann Whitney U também foi utilizado para seleção e comparação de metabólitos discriminantes.

A identificação dos metabólitos discriminantes e interpretação dos resultados obtidos foram realizadas usando os banco de dados HMDB, KEGG e Metlin. Na investigação por RPLC-MS, foram detectados 370 *molecular features*, e por CESI-MS 212 *molecular features* com significância estatística. Os valores de *m/z* desses metabólitos foram levados aos bancos de dados acima mencionados. Nessa busca foram considerados $[M+H]^+$, e $[M+Na]^+$ como possíveis adutos, e foi estabelecido um erro de massa de 5 ppm. Adicionalmente, a seleção dos metabólitos se deu por avaliação da estrutura química do metabólito (sua concordância com a técnica de separação empregada), e possível correlação com rotas de doenças RVU e outras urinárias. Essa busca identificou 37 metabólitos para as análises por RPLC-MS e 22 metabólitos com para as análises por CESI-MS. Dos metabólitos identificados, apenas

três foram identificados (hipoxantina, glutamina e 1/2/3-metilguanina) em ambas as técnicas empregadas (Figura 4.23), reforçando a importância de trabalhar com mais de uma técnica analítica e comprovando a complementaridade das informações obtidas.

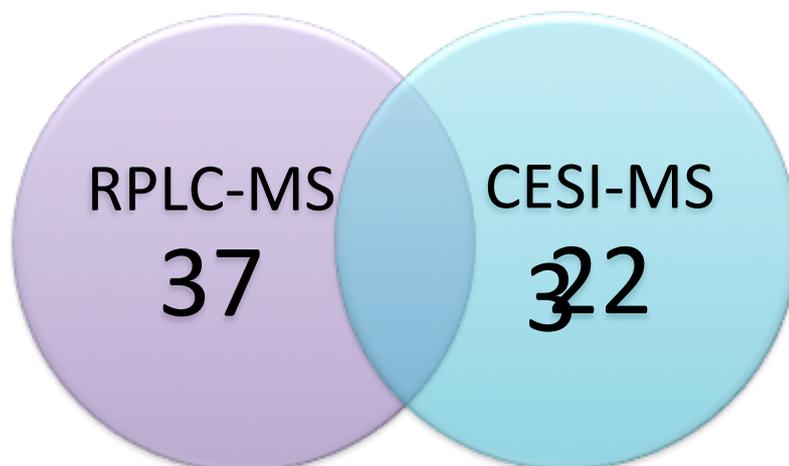


Figura 4.23. Diagrama de Venn ilustrando o número de metabólitos identificados em cada técnica analítica e em ambas.

A Tabela 4.10 apresenta o resultado dos metabólitos identificados com significância estatística por meio desta investigação, nessa tabela também estão descritos o p-valor, a classificação e *fold change*, o qual foi calculado pela razão entre a média das intensidade do metabólito nas amostras testes e a média das amostras controle, valores positivos indicam um aumento do metabólito nas amostras teste em referência às amostras controle e valores negativos indicam uma diminuição.

Tabela 4.10. Metabólitos identificados com significância estatística e suas características obtidas no estudo metabolômico global por CESI-MS e RPLC-MS para a classificação de RVU

Metabólito	Fórmula Molecular	Massa isotópica (Da)	p-valor	Fold Change	Técnica Analítica	Classificação
L-Serine	C ₃ H ₇ NO ₃	105.0426	<0.01	+ 1.19	RPLC-MS	aminoácidos e derivados
Uracil	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	112.0273	<0.01	+ 1.32	RPLC-MS	purinas e derivados
Valine/Glicine Betaine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.079	<0.01	+ 1.26	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
2,4-Dihydroxybutanoic acid	C ₄ H ₈ O ₄	120.0423	<0.01	+ 1.77	RPLC-MS	ácidos carboxílicos e derivados
Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	122.0368	<0.01	+ 1.21	RPLC-MS	ácidos carboxílicos e derivados
Pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129.079	<0.01	+ 1.16	CESI-MS	ácido carboxílicos e derivados
Hypoxanthine	C ₅ H ₄ N ₄ O	136.0385	<0.01	+ 1.53	RPLC-MS	Purinas e derivados
			<0.01	+ 1.19	CESI-MS	purinas e derivados
Phenylacetic acid/2-Methylbenzoic acid	C ₈ H ₈ O ₂	136.0524	<0.05	+ 1.75	RPLC-MS	ácidos carboxílicos e derivados
N-Methylnicotinamide	C ₇ H ₈ N ₂ O	136.0637	<0.01	+ 1.26	CESI-MS	aminas e poliaminas
Proline betaine	C ₇ H ₁₃ NO ₂	143.0946	<0.01	- 0.78	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
4-Guanidinobutyric acid	C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	145.0851	<0.01	+ 1.17	CESI-MS	ácido carboxílicos e derivados
L-Glutamine	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.0691	<0.01	+ 1.19	RPLC-MS	aminoácidos e derivados
			<0.01	+ 1.13	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
L-Lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.1055	<0.01	+ 1.18	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
1-Methyladenine/3-Methyladenine	C ₆ H ₇ N ₅	149.0701	<0.01	+ 1.24	CESI-MS	purinas e derivados
D-Ribose/Xylose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.0528	<0.01	+ 1.52	RPLC-MS	carboidratos e conjugados/álcoois e polióis
2-Phenylpropionate	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.0681	<0.01	- 0.61	RPLC-MS	ácidos carboxílicos e derivados
3-Methylcrotonylglycine	C ₇ H ₁₁ NO ₃	157.0739	<0.01	+ 1.73	RPLC-MS	acil-glicinas

Metabólito	Fórmula Molecular	Massa isotópica (Da)	p-valor	Fold Change	Técnica Analítica	Classificação
2-Methylbutyrylglycine/3-Dehydrocarnitine	C ₇ H ₁₃ NO ₃	159.0895	<0.01	+ 1.46	RPLC-MS	acil-glicinas/carnitinas e acil-carnitinas
L-Carnitine	C ₇ H ₁₅ NO ₃	161.1052	<0.01	+ 1.16	CESI-MS	carnitinas e acil-carnitinas
1-Methylguanine/3-Methylguanine/7-Methylguanine	C ₆ H ₇ N ₅ O	165.0651	<0.01	+ 1.45	RPLC-MS	purinas e derivados
			<0.01	+ 1.28	CESI-MS	purinas e derivados
L-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.079	<0.01	- 0.79	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
1-Methylxanthine/3-Methylxanthine/7-Methylxanthine	C ₆ H ₆ N ₄ O ₂	166.0491	<0.01	- 0.35	RPLC-MS	purinas e derivados
3-Methoxytyramine	C ₉ H ₁₃ NO ₂	167.0946	<0.05	+ 1.48	CESI-MS	aminas e poliaminas
Pyridoxamine	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	168.0899	<0.01	- 0.81	RPLC-MS	piridina e derivados
2-Furoylglycine	C ₇ H ₇ NO ₄	169.0375	<0.01	- 0.68	RPLC-MS	acil-glicinas
3-Methylhistidine/1-Methylhistidine	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	169.0851	<0.01	+ 1.14	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
Citrulline	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	175.0957	<0.01	+ 1.38	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
Hippuric acid	C ₉ H ₉ NO ₃	179.0582	<0.01	- 0.87	RPLC-MS	acil-glicinas
Nicotinuric acid	C ₈ H ₈ N ₂ O ₃	180.0535	<0.01	+ 1.46	RPLC-MS	acil-glicinas
Myoinositol/D-Mannose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.0634	<0.01	- 0.28	RPLC-MS	álcoois e polióis/carboidratos e derivados
L-Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.0739	<0.01	- 0.82	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
N-Acetylglutamine	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₄	188.0797	<0.01	+ 3.04	RPLC-MS	aminoácidos e derivados
N6-Acetyl-L-lysine	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	188.1161	<0.01	- 0.85	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine	C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	188.1525	<0.01	+ 1.17	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
Kynurenic acid	C ₁₀ H ₇ NO ₃	189.0426	<0.01	+ 1.14	RPLC-MS	ácidos carboxílicos e derivados

Metabólito	Fórmula Molecular	Massa isotópica (Da)	p-valor	Fold Change	Técnica Analítica	Classificação
5-Hydroxyindoleacetic acid	C ₁₀ H ₉ NO ₃	191.0582	<0.01	+ 1.47	RPLC-MS	ácidos carboxílicos e derivados
4-Aminohippuric acid	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₃	194.0691	<0.01	+ 1.34	RPLC-MS	acil-glicinas
(A)symmetric dimethylarginine	C ₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	202.143	<0.01	+ 1.12	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
L-Acetylcarnitine	C ₉ H ₁₇ NO ₄	203.1158	<0.01	+ 2.07	CESI-MS	carnitinas e acil-carnitinas
L-Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.0899	<0.01	+ 1.29	RPLC-MS	aminoácidos e derivados
Xanthurenic acid	C ₁₀ H ₇ NO ₄	205.0375	<0.01	+ 1.43	RPLC-MS	ácidos carboxílicos e derivados
Propionylcarnitine	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	217.1314	<0.01	+ 2.38	RPLC-MS	carnitinas e acil-carnitinas
Pantothenic acid	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219.1107	<0.01	+ 2.47	RPLC-MS	aminoácidos e derivados
Suberylglycine	C ₁₀ H ₁₇ NO ₅	231.1107	<0.01	+ 1.17	RPLC-MS	acil-glicinas
Butyrylcarnitine	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	231.1471	<0.01	+ 1.35	CESI-MS	carnitinas e acil-carnitinas
Spermic acid 2	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₄	232.1423	<0.01	+ 1.61	RPLC-MS	aminoácidos e derivados
Anserine	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₃	240.1222	<0.05	+ 2.51	CESI-MS	aminoácidos, peptídeos e análogos
Tiglylcarnitine	C ₁₂ H ₂₁ NO ₄	243.1471	<0.01	+ 1.37	RPLC-MS	carnitinas e acil-carnitinas
Uridine/Pseudouridine	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	244.0695	<0.01	+ 1.33	RPLC-MS	purinas e derivados
2-Methylbutyroylcarnitine	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	245.1627	<0.01	+ 1.49	RPLC-MS	carnitinas e acil-carnitinas
Thiamine	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS	265.1123	<0.01	+ 1.15	RPLC-MS	aminas e poliaminas
1-Methyladenosine	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄	281.1124	<0.05	- 0.84	RPLC-MS	purinas e derivados
1-Methylguanosine	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₅	297.1073	<0.01	+ 1.36	RPLC-MS	purinas e derivados
2,6 Dimethylheptanoyl carnitine	C ₁₆ H ₃₁ NO ₄	301.2253	<0.01	+ 1.40	RPLC-MS	carnitinas e acil-carnitinas
Cyclic AMP	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ P	329.0525	<0.01	+ 1.37	RPLC-MS	purinas e derivados
N ₂ ,N ₂ -Dimethylguanosine	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₅	311.1230	<0.01	+ 1.82	RPLC-MS	purinas e derivados

Ao analisar os metabólitos na Tabela 4.10, é possível notar que a maioria dos compostos detectados por CESI-MS são aminoácidos e análogos, alguns são ácidos carboxílicos e derivados, purinas e derivados, aminas e poliaminas e acilcarnitinas. Já os metabólitos detectados por RPLC-MS são: purinas e derivados, ácidos carboxílicos e derivados, carnitinas e acilcarnitinas, acilglicinas (como o ácido nicotinúrico, ácido hipúrico, e 3-metilcrotonilglicina, entre outros), e compostos relacionados ao metabolismo do triptofano (isto é, triptofano, ácido 5-hidroxiindolacético e ácido quinurênico).

Os metabólitos identificados pelo estudo metabolômico por CESI-MS e RPLC-MS podem apresentar informações para classificação de pacientes com RVU; porém, talvez não seja sensato relacionar alguns desses metabólitos a uma via específica, visto que um estudo recente já demonstrou que muitas das acilglicinas e metabólitos de triptofano detectados no sangue de mamífero apresentam uma relação com o “microbioma” intestinal, o que poderia explicar a presença desses metabólitos na urina por excreção regular (154).

Em geral, as acilcarnitinas são formadas na via do metabolismo de ácidos graxos para transportar os grupos acilo de cadeia longa de ácidos graxos para as mitocôndrias, onde esses grupos são quebrados através da β -oxidação para acetato, para obter energia através do ciclo do ácido cítrico. Sob condições normais de homeostasia, a carnitina é eliminada por excreção na urina, tanto em formas livres quanto esterificadas, principalmente como acetilcarnitina (155). Contudo, mudanças nas concentrações de acilcarnitinas refletem diferentes processos metabólicos; como por exemplo, a concentração de isovalerilcarnitina reflete o metabolismo da valina, isoleucina e leucina. A presença de acilcarnitinas em plasma, soro ou urina podem

indicar danos mitocondriais (156). Uma razão para a acilcarnitina estar mais elevada na urina pode ser o resultado de uma reabsorção menos eficiente de acilcarnitinas ou de uma acilação renal de carnitina, seguida de um vazamento do produto de acilcarnitina formado na própria urina (157,158).

A conjugação de glicina é um sistema de desintoxicação eficaz para prevenir a acumulação de ésteres de acil-CoA em várias doenças metabólicas hereditárias. A presença de acilglicinas na urina foram relatadas como a expressão direta da acumulação dos correspondentes ésteres de acil-CoA na mitocôndria (159)

Foram relatadas anteriormente alterações do metabolismo do triptofano pela doença nefropatia diabética, onde a concentração de triptofano no plasma de animais com insuficiência renal diminuiu enquanto se observava um aumento simultâneo de metabólitos relacionados à via de quinurenina (por exemplo, ácido quinurênico) no plasma (159). Foi também demonstrado que a quantidade de ácido quinurênico nos rins é o mais alto entre todos os tecidos (160). Além disso, sabe-se que o ácido quinurênico é o principal metabólito excretado de organismo por meio de secreção tubular. Na insuficiência renal este mecanismo é consideravelmente prejudicado, o que conseqüentemente conduz a uma acumulação excessiva desta substância no organismo (161).

O metabólito tirosina encontra-se diminuído no paciente com RVU em relação ao paciente sadio. É conhecido que a excreção desse metabólito é reduzida em doença renal crônica, assim como a taxa de síntese da tirosina (162).

Os metabólitos de arginina dimetilarginina simétrica (DMAS) (função desconhecida) e dimetilarginina assimétrica (DMAA) (um inibidor de óxido nítrico sintase) diferem em sua posição de metilação e possuem propriedades biológicas

distintas. Como a DMAS é lentamente metabolizada e removida do corpo pelo rim, a disfunção renal resulta em níveis aumentados desse metabólito no soro e no plasma. Os níveis de DMAA também são aumentados em doença renal crônica, possivelmente como resultado da disfunção endotelial. Os aumentos nos níveis de DMAA são também, no entanto, associados a muitas outras doenças, incluindo disfunção vascular, enxaqueca, hiperglicemia. Uma redução no metabolismo da metilarginina renal demonstrou proteger contra danos nos rins, mas o mecanismo é desconhecido (156).

Para as purinas e derivados, quase todos estão aumentadas no grupo teste em comparação com o grupo controle, o que reflete numa alteração do metabolismo da purina (163); entretanto, não foram encontrados estudos que relacionem o metabolismo de purinas com doenças renais.

Com base nos resultados obtidos nesse estudo metabolômico foi possível identificar que diversos metabólitos, de diversas classes químicas e com importantes funções em diferentes tipos de metabolismo, podem estar relacionados com o RVU. Já foram reportados alguns estudos que relacionam os metabólitos identificados nesse estudo com doenças renais, demonstrando que existe a possibilidade desses metabólitos serem discriminantes para o RVU. No entanto, deve-se mencionar que pesquisas adicionais são necessárias para investigar o contexto bioquímico de todos os metabólitos candidatos com mais detalhes.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, o desempenho e aplicabilidade de CE-MS e LC-MS para a análise metabolômica global urinária e para a análise metabolômica alvo, com base em um estudo piloto do refluxo vésico-ureteral foi investigada, visando a identificação de metabólitos discriminantes entre os grupos testes e controle, como potenciais indicadores da condição.

Primeiramente, um método por CE-MS para a análise de aminoácidos em urina foi desenvolvido, validado e aplicado para a quantificação desses metabólitos em amostras de urina de crianças saudáveis e crianças com RVU usando a abordagem metabolômica alvo. Esse método apresentou um bom desempenho para a quantificação de aminoácidos em urina e, ainda, uma melhor resolução entre os isômeros Leu, Ile e alle, em comparação com métodos da literatura, pôde ser obtida. A análise estatística multivariada dos dados obtidos pela quantificação não possibilitou a evidente identificação de aminoácidos que possam estar associados com o RVU; no entanto, a análise univariada mostrou que alguns aminoácidos, como GABA e Thr, podem carregar informações para a discriminação das classes. Maiores estudos e investigações são necessárias para confirmar os resultados obtidos.

Na sequência da investigação alvo, métodos de RPLC-MS e HILIC-MS foram otimizados para a análise metabolômica urinária. Para garantir a maior confiabilidade do estudo metabolômico realizado, é muito importante que todo o processo desde o desenho experimental, desenvolvimento de método analítico até a análise estatística e interpretação biológica dos resultados, seja realizada de forma coerente. Métodos cromatográficos de RPLC-MS e HILIC-MS foram otimizados, considerando-se diversos tipos de coluna e composição da fase móvel. Por meio desse estudo, pôde-se constatar a importância da seleção da coluna e condições cromatográficas apropriadas para a

obtenção de melhores perfis de pico, tempos de retenção adequados, detecção de um maior número de *molecular features* e melhor distribuição desses *features* ao longo da análise de maneira mais confiável.

O método desenvolvido por RPLC-MS foi aplicado para a análise metabolômica global do RVU. Ainda, o CESI-MS também foi utilizada como técnica analítica complementar para essa avaliação metabolômica. Os resultados obtidos para a distinção entre os grupos testes e controle apontaram que diversos metabólitos podem estar desregulados em um grupo em relação ao outro. Diversas classes químicas de compostos mostraram-se alteradas, indicando que algumas vias metabólicas podem estar sendo afetadas pelo RVU. É válido citar que esse estudo é piloto e os resultados apresentados são preliminares; porém, apesar de especulativos, podem oferecer uma contribuição para a discriminação de pacientes com RVU. As informações apresentadas oferecem auxílio para o desenvolvimento de métodos diagnósticos do RVU baseado em metabolômica, diminuindo assim a necessidade do uso de métodos diagnósticos invasivos.

Para a continuidade desse trabalho, seria possível analisar novamente apenas os aminoácidos que mostraram significância estatística para a discriminação do RVU. Para a análise metabolômica global, as amostras já avaliadas podem ser analisadas pelo método de HILIC-MS desenvolvido nesse trabalho, como uma forma de complementar e corroborar os resultados já obtidos. Além disso, a análise alvo dos metabólitos identificados pela análise metabolômica global, seria de grande relevância para uma avaliação mais sistemática desses compostos e suas alterações. Ainda, uma nova investigação envolvendo a validação biológica dos resultados obtidos deve ser realizado. Como uma perspectiva final, espera-se que algum ou um grupo desses

metabólitos identificados, após todos os testes clínicos necessários, possam auxiliar no diagnóstico dessa condição que afeta tantas crianças .

.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Altobelli E, Gerocarni Nappo S, Guidotti M, Caione P. Vesicoureteral reflux in pediatric age: where are we today? *Urologia*. 2014;81(2):76–87.
2. Tullus K. Vesicoureteric reflux in children. *Lancet*. 2015 Jan;385(9965):371–9.
3. Lopez P-J, Celis S, Reed F, Zubieta R. Vesicoureteral reflux: current management in children. *Curr Urol Rep*. 2014;15(10):447.
4. Routh JC, Bogaert GA, Kaefer M, Manzoni G, Park JM, Retik AB, et al. Vesicoureteral reflux: Current trends in diagnosis, screening, and treatment. *Eur Urol*. 2012;61(4):773–82.
5. Bogaert GA, Slabbaert K. Vesicoureteral reflux. *Eur Urol Suppl. European Association of Urology*; 2012;11(2):16–24.
6. Sung J, Skoog S. Surgical management of vesicoureteral reflux in children. *Pediatr Nephrol*. 2012 Apr 22;27(4):551–61.
7. Tekgül S, Riedmiller H, Hoebeke P, Kočvara R, Nijman RJM, Radmayr C, et al. EAU Guidelines on Vesicoureteral Reflux in Children. *Eur Urol*. 2012 Sep;62(3):534–42.
8. Slabbaert K, Bogaert GA. Vesicoureteric reflux (VUR) in children: where are we now? *Arch Esp Urol*. 2012;65(4):450–8.
9. Snow BW, Taylor MB. Non-invasive vesicoureteral reflux imaging. *J Pediatr Urol*. 2010;6(6):543–9.
10. Lim R. Vesicoureteral reflux and urinary tract infection: Evolving practices and current controversies in pediatric imaging. *Am J Roentgenol*. 2009;192(5):1197–208.
11. Novljan G, Levart TK, Kljucsevsek D, Kenig a, Kenda RB. Ultrasound detection of vesicoureteral reflux in children. *J Urol*. 2010;184(1):319–24.
12. Ammenti A, Cataldi L, Chimenz R, Fanos V, La Manna A, Marra G, et al. Febrile urinary tract infections in young children: recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up. *Acta Paediatr*. 2012;101(5):451–7.
13. E. Stashinko E, Goldberger J. Test or Trauma? the Voiding Cystourethrogram Experience of Young Children. *Issues Compr Pediatr Nurs*. 1998;21(2):85–96.
14. Darge K. Voiding urosonography with US contrast agents for the diagnosis of vesicoureteric reflux in children: II. Comparison with radiological examinations. *Pediatr Radiol*. 2008;38(1):54–63.
15. Mahant S, Friedman J, MacArthur C. Renal ultrasound findings and vesicoureteral reflux in children hospitalised with urinary tract infection. *Arch Dis*. 2002;419–21.
16. Hoberman A, Wald ER, Hickey RW, Baskin M, Charron M, Majd M, et al. Oral versus initial intravenous therapy for urinary tract infections in young febrile

- children. *Paediatr.* 1999;104(1 Pt 1):79–86.
17. Ajdinović B, Jauković L, Krstić Z, Dopuda M. Impact of micturating cystourethrography and DMSA renal scintigraphy on the investigation scheme in children with urinary tract infection. *Ann Nucl Med.* 2008;22(8):661–5.
 18. Nicholson JK, Holmes E, Kinross JM, Darzi AW, Takats Z, Lindon JC. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature.* 2012;491(7424):384–92.
 19. Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic Phenotyping in Health and Disease. *Cell.* 2008;134(5):714–7.
 20. Kosmides AK, Kamisoglu K, Calvano SE, Corbett SA, Androulakis IP. Metabolomic fingerprinting: challenges and opportunities. *Crit Rev Biomed Eng.* 2013;41(3):205–21.
 21. Nicholson JK. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Mol Syst Biol.* 2006;2:52.
 22. Terabe S, Markuszewski MJ, Inoue N, Otsuka K, Nishioka T. Capillary electrophoretic techniques toward the metabolome analysis. *Pure Appl Chem.* 2001;73(10):1563–72.
 23. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2011;6(7):1060–83.
 24. Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol.* 2011;85(1):5–17.
 25. Hyötyläinen T. Novel methodologies in metabolic profiling with a focus on molecular diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012 Jun 9;12(5):527–38.
 26. Mastrangelo A, Armitage EG, García A, Barbas C. Metabolomics as a tool for drug discovery and personalised medicine. A review. *Curr Top Med Chem.* 2014;14(23):2627–36.
 27. Kuehnbaum NL, Britz-McKibbin P. New Advances in Separation Science for Metabolomics: Resolving Chemical Diversity in a Post-Genomic Era. *Chem. Rev.,* 2013, 113(4):2437–2468.
 28. Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev.* 2011;40(1):387–426.
 29. Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol.* 2002;48:155–71.

30. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181-9.
31. Nicholson JK, Lindon JC. *Metabonomics*. 2008;455:1054-6.
32. Griffiths WJ, Koal T, Wang Y, Kohl M, Enot DP, Deigner H-P. Targeted Metabolomics for Biomarker Discovery. *Angew Chemie Int Ed*. 2010;49(32):5426-45.
33. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted Metabolomics. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. p. 1-34.
34. Schripsema J, Dagnino D. Metabolomics: Experimental Design, Methodology and Data Analysis. *Encycl Anal Chem*. 2014;1-17.
35. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2005;24(4):285-94.
36. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1):801-7.
37. Alonso A, Marsal S, Julià A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3(March):23.
38. Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(9):763-9.
39. Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *J Proteome Res*. 2007;6(2):443-58.
40. Kumar B, Prakash A, Ruhela RK, Medhi B. Potential of metabolomics in preclinical and clinical drug development. *Pharmacol Reports. Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences*; 2014;66(6):956-63.
41. Friedrich N. Metabolomics in diabetes research. *J Endocrinol*. 2012;215(1):29-42.
42. Weiss RH, Kim K. Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2011;8(1):22-33.
43. Trushina E, Mielke MM. Recent advances in the application of metabolomics to Alzheimer's Disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2014;1842(8):1232-9.
44. Ryan D, Robards K, Prenzler PD, Kendall M. Recent and potential developments in the analysis of urine: A review. *Anal Chim Acta*. 2011;684(1-2):17-29.
45. Wilson ID. Chromatographic and Electrophoretic Separations Combined with Mass Spectrometry for Metabonomics. In: *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. 2007. p. 149-69.

46. Kohler I, Verhoeven A, Derks RJ, Giera M. Analytical pitfalls and challenges in clinical metabolomics. *Bioanalysis*. 2016 Jul;8(14):1509–32.
47. Naz S, Moreira dos Santos DC, García A, Barbas C. Analytical protocols based on LC-MS, GC-MS and CE-MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. *Bioanalysis*. 2014;6(12):1657–77.
48. Patti GJ. Separation strategies for untargeted metabolomics. *J Sep Sci*. 2011;34(24):3460–9.
49. Putri SP, Yamamoto S, Tsugawa H, Fukusaki E. Current metabolomics: Technological advances. *J Biosci Bioeng*. 2013;116(1):9–16.
50. Plumb RS, Stumpf CL, Gorenstein M V., Castro-Perez JM, Dear GJ, Anthony M, et al. Metabonomics: The use of electrospray mass spectrometry coupled to reversed-phase liquid chromatography shows potential for the screening of rat urine in drug development. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2002;16(20):1991–6.
51. Ramautar R, de Jong GJ. Recent developments in liquid-phase separation techniques for metabolomics. *Bioanalysis*. 2014;6:1011–26.
52. Yin P, Xu G. Current state-of-the-art of nontargeted metabolomics based on liquid chromatography-mass spectrometry with special emphasis in clinical applications. *J Chromatogr A*. 2014;1374:1–13.
53. Yoshida H, Mizukoshi T, Hirayama K, Miyano H. Comprehensive analytical method for the determination of hydrophilic metabolites by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2007;55(3):551–60.
54. Guo K, Peng J, Zhou R, Li L. Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography fractionation in combination with isotope labeling reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry for comprehensive metabolome profiling. *J Chromatogr A*. 2011; 1218(23):3689–94.
55. Lu W, Clasquin MF, Melamud E, Amador-Noguez D, Caudy A a., Rabinowitz JD. Metabolomic analysis via reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to a stand alone orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem*. 2010;82(8):3212–21.
56. Zhang T, Creek DJ, Barrett MP, Blackburn G, Watson DG. Evaluation of Coupling Reversed Phase (RP), Aqueous Normal Phase (ANP) and Hydrophilic Interaction (HILIC) Liquid Chromatography with Orbitrap Mass Spectrometry for Metabolomic Studies of Human Urine. *Anal Chem*. 2012;84(4):1994–2001.
57. Isabelle Kohler, Rico J.E. Derks MG. The Rise of Hydrophilic Interaction Chromatography in Untargeted Clinical Metabolomics. *LCGC Eur*. 2016;30(1):60–75.
58. Paglia G, Langridge J, Astarita G. Development of a Metabolomic Assay for the Analysis of Polar Metabolites Using HILIC UPLC / QToF MS. *Waters Application*

Note.

59. Robledo VR, Smyth WF. Review of the CE-MS platform as a powerful alternative to conventional couplings in bio-omics and target-based applications. *Electrophoresis*. 2014;35(16):2292–308.
60. Kok MGM, Somsen GW, de Jong GJ. The role of capillary electrophoresis in metabolic profiling studies employing multiple analytical techniques. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2014;61:223–35.
61. Ramautar R, Somsen GW, Jong GJ De. CE-MS for metabolomics : developments and applications in the period 2014-2016. *Electrophoresis*. 2017; 38(1):190–202.
62. Ramautar R, Busnel J-M, Deelder AM, Mayboroda OA. Enhancing the Coverage of the Urinary Metabolome by Sheathless Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2012 Jan 17;84(2):885–92.
63. Kohler I, Giera M. Recent advances in liquid-phase separations for clinical metabolomics. *J Sep Sci*. 2016;1–16.
64. Boccard J, Veuthey JL, Rudaz S. Knowledge discovery in metabolomics: An overview of MS data handling. *J Sep Sci*. 2010;33(3):290–304.
65. Katajamaa M, Orešič M, Orešič M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J Chromatogr A*. 2007;1158(1–2):318–28.
66. Goodacre R, Broadhurst D, Smilde AK, Kristal BS, Baker JD, Beger R, et al. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics*. 2007;3(3):231–41.
67. Bijlsma S, Bobeldijk I, Verheij ER, Ramaker R, Kochhar S, Macdonald IA, et al. Large-scale human metabolomics studies: A strategy for data (pre-) processing and validation. *Anal Chem*. 2006;78(2):567–74.
68. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G, CA Smith, J Elizabeth, G O'Maille, Ruben Abagyan and GS. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal Chem*. 2006;78(3):779–87.
69. Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G. XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal Chem*. 2012;84(11):5035–9.
70. Xia J, Sinelnikov I V., Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W251–7.
71. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*. 2010;11(1):395.
72. Lommen A. MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing. *Anal Chem*.

- 2009;81(8):3079–86.
73. Sugimoto M, Kawakami M, Robert M, Soga T, Tomita M. Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. *Curr Bioinform.* 2012;7(1):96–108.
 74. Gromski PS, Muhamadali H, Ellis DI, Xu Y, Correa E, Turner ML, et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal Chim Acta.*; 2015;879:10–23.
 75. Bylesjö M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J Chemom.* 2006 Aug;20(8–10):341–51.
 76. Misra BB, van der Hoof JJJ. Updates in metabolomics tools and resources: 2014–2015. *Electrophoresis.* 2016;37(1):86–110.
 77. Moraes EP. Avaliação quimiométrica de mapas peptídicos urinários obtidos por CE-MS visando o diagnóstico clínico. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2008.
 78. Drube J, Schiffer E, Lau E, Petersen C, Kirschstein M, Kemper MJ, et al. Urinary Proteome Analysis to Exclude Severe Vesicoureteral Reflux. *Pediatrics.* 2012;129(2):e356–63.
 79. Vitor A de P. Determinação de aminoácidos por eletroforese capilar com detecção UV/vis para o estudo do perfil metabólico urinário do refluxo vésicoureteral. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2012.
 80. Benedetto GE De. Biomedical Applications of Amino Acid Detection by Capillary Electrophoresis. In: *Capillary Electrophoresis.* Totowa, NJ, NJ: Humana Press; 2008. p. 457–81.
 81. Mayboroda O a., Neusüß C, Pelzing M, Zurek G, Derks R, Meulenbelt I, et al. Amino acid profiling in urine by capillary zone electrophoresis – mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007;1159(1–2):149–53.
 82. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, et al. The human urine metabolome. *PLoS One.* 2013;8(9):e73076.
 83. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* 2009;37(1):1–17.
 84. Rashaid AHB, Harrington PDB, Jackson GP. Profiling Amino Acids of Jordanian Scalp Hair as a Tool for Diabetes Mellitus Diagnosis: a Pilot Study. *Anal Chem.* 2015;
 85. Durantón F, Lundin U, Gayrard N, Mischak H, Aparicio M, Mourad G, et al. Plasma and Urinary Amino Acid Metabolomic Profiling in Patients with Different Levels of Kidney Function. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(1):37–45.
 86. Fadel FI, Elshamaa MF, Essam RG, Elghoroury E a, El-saeed GSM, El-toukhy SE,

- et al. Some Amino Acids Levels : Glutamine , Glutamate , and Homocysteine , in Plasma of Children with Chronic Kidney Disease. 2014;10(1):36–42.
87. Van De Poll MCG, Soeters PB, Deutz NEP, Fearon KCH, Dejong CHC. Renal metabolism of amino acids: Its role in interorgan amino acid exchange. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(2):185–97.
 88. Garibotto G, Sofia A, Saffioti S, Bonanni A, Mannucci I, Verzola D. Amino acid and protein metabolism in the human kidney and in patients with chronic kidney disease. *Clin Nutr.* 2010;29:424–33.
 89. Wang C, Zhu H, Pi Z, Song F, Liu Z, Liu S. Classification of type 2 diabetes rats based on urine amino acids metabolic profiling by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci.*; 2013;935:26–31.
 90. Sakaguchi Y, Kinumi T, Yamazaki T, Takatsu A. A novel amino acid analysis method using derivatization of multiple functional groups followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analyst*; 2015;140(6):1965–73.
 91. Held PK, White L, Pasquali M. Quantitative urine amino acid analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry and aTRAQ?? reagents. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2011;879(26):2695–703.
 92. Jabeen R, Payne D, Wiktorowicz J, Mohammad A, Petersen J. Capillary electrophoresis and the clinical laboratory. *Electrophoresis.* 2006;27(12):2413–38.
 93. Zhong X, Zhang Z, Jiang S, Li L. Recent advances in coupling capillary electrophoresis-based separation techniques to ESI and MALDI-MS. *Electrophoresis.* 2014;35(9):1214–25.
 94. Soga T, Kakazu Y, Robert M, Tomita M, Nishioka T. Qualitative and quantitative analysis of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis.* 2004;25(13):1964–72.
 95. Soga T, Heiger DN. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2000;72(6):1236–41.
 96. Ramautar R, Mayboroda O a., Derks RJE, van Nieuwkoop C, van Dissel JT, Somsen GW, et al. Capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry using noncovalently bilayer-coated capillaries for the analysis of amino acids in human urine. *Electrophoresis.* 2008;29(12):2714–22.
 97. Soliman LC, Hui Y, Hewavitharana AK, Chen DDY. Monitoring potential prostate cancer biomarkers in urine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A. Elsevier B.V.*; 2012;1267:162–9.
 98. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics.* 2010;26(7):966–8.

99. ICH. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). Harmonised Tripartite Guideline on validation of analytical procedures Q2 (R2). 2005.
100. Chambers MC, Maclean B, Burke R, Amodei D, Ruderman DL, Neumann S, et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat Biotechnol.* 2012;30(10):918–20.
101. Kessner D, Chambers M, Burke R, Agus D, Mallick P. ProteoWizard: Open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics.* 2008;24(21):2534–6.
102. Dunn WB, Wilson ID, Nicholls AW, Broadhurst D. The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans. *Bioanalysis.* 2012;4(18):2249–64.
103. Gulersonmez MC, Lock S, Hankemeier T, Ramautar R. Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry for anionic metabolic profiling. *Electrophoresis.* 2016;37(7–8):1007–14.
104. Tautenhahn R, Bottcher C, Neumann S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics.* 2008;9(1):504.
105. Grootveld M. Introduction to the Applications of Chemometric Techniques in “Omics” Research: Common Pitfalls, Misconceptions and “Rights and Wrongs.” *Metabolic Profiling: Disease and Xenobiotics.* 2012. 1-34 p.
106. Veselkov KA, Vingara LK, Masson P, Robinette SL, Want E, Li J V, et al. Optimized preprocessing of ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry urinary metabolic profiles for improved information recovery. *Anal Chem.* 2011;83(15):5864–72.
107. Nevedomskaya E, Derks R, Deelder AM, Mayboroda O a., Palmblad M. Alignment of capillary electrophoresis–mass spectrometry datasets using accurate mass information. *Anal Bioanal Chem.* 2009;395(8):2527–33.
108. Eriksson L, Trygg J, Wold S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models. *J Chemom.* 2008 Nov;22(11–12):594–600.
109. Rodrigues KT, Mekahli D, Tavares MFM, van Schepdael A. Development and validation of a CE-MS method for the targeted assessment of amino acids in urine. *Electrophoresis.* 2016;37(7–8):1039–47.
110. Spectrometry EI, Britz-mckibbin P, Hirayama A, Soga T. Amino Acid Analysis. 2012;828:77–82.
111. Li Y, Champion MM, Sun L, Champion P a D, Wojcik R, Dovichi NJ. Capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry as an alternative proteomics platform to ultraperformance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for samples of intermediate complexity. *Anal Chem.* 2012;84(3):1617–22.

112. Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2003;2(5):488–94.
113. Ramautar R, Torano JS, Somsen GW, De Jong GJ. Evaluation of CE methods for global metabolic profiling of urine. *Electrophoresis.* 2010;31(14):2319–27.
114. Lin X, Gerardi AR, Breitbach ZS, Armstrong DW, Colyer CL. CE-ESI-MS analysis of singly charged inorganic and organic anions using a dicationic reagent as a complexing agent. *Electrophoresis.* 2009;30(22):3918–25.
115. Huikko K, Kotiaho T, Kostianen R. Effects of nebulizing and drying gas flow on capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002;16(16):1562–8.
116. Wakayama M, Aoki N, Sasaki H, Ohsugi R. Simultaneous analysis of amino acids and carboxylic acids by capillary electrophoresis-mass spectrometry using an acidic electrolyte and uncoated fused-silica capillary. *Anal Chem.* 2010;82(24):9967–76.
117. Wang S, Yang P, Zhao X. Amino Acid Profile Determination in the Urine of Bladder Cancer Patients by CE-MS with On-Line pH-Mediated Stacking and Pattern Recognition. *Chromatographia.* 2009;70(9–10):1479–84.
118. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Dep Heal Hum Serv. 2001;(May):4–10.
119. Vogl FC, Mehrl S, Heizinger L, Schlecht I, Zacharias HU, Ellmann L, et al. Evaluation of dilution and normalization strategies to correct for urinary output in HPLC-HRTOFMS metabolomics. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(29):8483–93.
120. Boeniger MF, Lowry LK, Rosenberg J. Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1993;54(May 2014):615–27.
121. Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ. Statistical Methods for the Analysis of High-Throughput Metabolomics Data. *Comput Struct Biotechnol J.* 2013;4(5):e201301009.
122. Moseley HNB. Error Analysis and Propagation in Metabolomics Data Analysis. *Comput Struct Biotechnol J.* 2013 Jan;4(5):e201301006.
123. Blaise BJ, Correia G, Tin A, Young JH, Vergnaud AC, Lewis M, et al. Power Analysis and Sample Size Determination in Metabolic Phenotyping. *Anal Chem.* 2016;88(10):5179–88.
124. Vinaixa M, Samino S, Saez I, Duran J, Guinovart JJ, Yanes O. A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites.* 2012;2(4):775–95.
125. Want EJ, Wilson ID, Gika H, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, et al. Global

- metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nat Protoc*; 2010;5(6):1005-18.
126. Holmes E, Loo RL, Stamler J, Bictash M, Yap IK, Chan Q, et al. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature*. 2008;453(7193):396-400.
 127. Theodoridis GA, Gika HG, Want EJ, Wilson ID. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Anal Chim Acta*. 2012;711:7-16.
 128. Kloos D-P, Lingeman H, Niessen WM a., Deelder AM, Giera M, Mayboroda O a. Evaluation of different column chemistries for fast urinary metabolic profiling. *J Chromatogr B. Elsevier B.V.*; 2013;927:90-6.
 129. Contrepois K, Jiang L, Snyder M. Optimized Analytical Procedures for the Untargeted Metabolomic Profiling of Human Urine and Plasma by Combining Hydrophilic Interaction (HILIC) and Reverse-Phase Liquid Chromatography (RPLC)-Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(6):1684-95.
 130. Gika HG, Theodoridis GA, Wilson ID. Hydrophilic interaction and reversed-phase ultra-performance liquid chromatography TOF-MS for metabolomic analysis of Zucker rat urine. *J Sep Sci*. 2008;31(9):1598-608.
 131. Virgiliou C, Sampsonidis I, Gika HG, Raikos N, Theodoridis GA. Development and validation of a HILIC-MS/MS multitargeted method for metabolomics applications. *Electrophoresis*. 2015;36(18):2215-25.
 132. Zhang R, Watson DG, Wang L, Westrop GD, Coombs GH, Zhang T. Evaluation of mobile phase characteristics on three zwitterionic columns in hydrophilic interaction liquid chromatography mode for liquid chromatography-high resolution mass spectrometry based untargeted metabolite profiling of *Leishmania* parasites. *J Chromatogr A*. 2014;1362:168-79.
 133. Yanes O, Tautenhahn R, Patti GJ, Siuzdak G. Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Anal Chem*. 2011;83(6):2152-61.
 134. Zhang A, Sun H, Han Y, Yan G, Yuan Y, Song G, et al. Ultrapformance liquid chromatography-mass spectrometry based comprehensive metabolomics combined with pattern recognition and network analysis methods for characterization of metabolites and metabolic pathways from biological data sets. *Anal Chem*. 2013;85(15):7606-12.
 135. Andersen MBS, Rinnan ??smund, Manach C, Poulsen SK, Pujos-Guillot E, Larsen TM, et al. Untargeted metabolomics as a screening tool for estimating compliance to a dietary pattern. *J Proteome Res*. 2014;13(3):1405-18.
 136. Faccio AT. Abordagem metabolômica no estudo da exposição gestacional à poluição atmosférica. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2015.
 137. Neue UD, Phoebe CH, Tran K, Cheng YF, Lu Z. Dependence of reversed-phase

- retention of ionizable analytes on pH, concentration of organic solvent and silanol activity. *J Chromatogr A*. 2001;925(1-2):49-67.
138. Wyndham KD, O’Gara JE, Walter TH, Glose KH, Lawrence NL, Alden BA, et al. Characterization and Evaluation of C₁₈ HPLC Stationary Phases Based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/Inorganic Particles. *Anal Chem*. 2003;75(24):6781-8.
 139. Nováková L, Vlčková H, Petr S. Evaluation of new mixed-mode UHPLC stationary phases and the importance of stationary phase choice when using low ionic-strength mobile phase additives. *Talanta*. 2012;93:99-105.
 140. Rojo D, Barbas C, Rupérez FJ. LC-MS metabolomics of polar compounds. *Bioanalysis*. 2012;4(10):1235-43.
 141. Jandera P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review. *Anal Chim Acta*. 2011. p. 1-25.
 142. Gama MR, da Costa Silva RG, Collins CH, Bottoli CBG. Hydrophilic interaction chromatography. *TrAC, Trends in Anal Chem*. 2012. p. 48-60.
 143. Periat A, Debrus B, Rudaz S, Guillarme D. Screening of the most relevant parameters for method development in ultra-high performance hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A*. 2013;1282:72-83.
 144. Bajad SU, Lu W, Kimball EH, Yuan J, Peterson C, Rabinowitz JD. Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1125(1):76-88.
 145. K Trivedi D. Development of Zwitterionic Hydrophilic Liquid Chromatography (ZIC®HILIC-MS) Metabolomics Method for Shotgun Analysis of Human Urine. *J Chromatogr Sep Tech*. 2012;3(6).
 146. Spagou K, Tsoukali H, Raikos N, Gika H, Wilson ID, Theodoridis G. Hydrophilic interaction chromatography coupled to MS for metabonomic/metabolomic studies. *J Sep Sci*. 2010. p. 716-27.
 147. Cubbon S, Antonio C, Wilson J, Thomas-Oates J. Metabolomic applications of HILIC-LC-MS. *Mass Spectrom Rev*. 2010;29(5):671-84.
 148. Tang DQ, Zou L, Yin XX, Ong CN. HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS. *Mass Spectrom Rev*. 2016. p. 574-600.
 149. Jiang W, Fischer G, Girmay Y, Irgum K. Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode. *J Chromatogr A*. 2006;1127(1-2):82-91.
 150. Chauve B, Guillarme D, Cléon P, Veuthey JL. Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds. *J Sep Sci*. 2010;33(6-7):752-

64.

151. Echeverry G, Hortin GL, Rai AJ. Introduction to Urinalysis: Historical Perspectives and Clinical Application. In: Rai AJ, editor. Life Sciences. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 1–12.
152. Kind T, Tolstikov V, Fiehn O, Weiss RH. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. *Anal Biochem.* 2007;363(2):185–95.
153. Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. NMR-based metabolomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed.* 2005;18(3):143–62.
154. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(10):3698–703.
155. Chalmers RA, Roe CR, Stacey TE, Hoppel CL. Urinary Excretion of L-Carnitine and Acylcarnitines by Patients with Disorders of Organic Acid Metabolism: Evidence for Secondary Insufficiency of L-Carnitine. *Pediatr Res.* 1984;18(12):1325–8.
156. Hocher B, Adamski J. Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* Nature Publishing Group; 2017;13(5):269–84.
157. Wagner S, Deufel T, Guder WG. Carnitine metabolism in isolated rat kidney cortex tubules. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1986;367(1):75–9.
158. Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu Rev Nutr.* 1998;18:39–61.
159. Bonafé L, Troxler H, Kuster T, Heizmann CW, Chamoles NA, Burlina AB, et al. Evaluation of Urinary Acylglycines by Electrospray Tandem Mass Spectrometry in Mitochondrial Energy Metabolism Defects and Organic Acidurias. *Mol Genet Metab.* 2000 Apr;69(4):302–11.
160. Lou GL, Pinsky C, Sitar DS. Kynurenic acid distribution into brain and peripheral tissues of mice. *CanJPhysiol Pharmacol.* 1994;72(0008–4212 (Print)):161–7.
161. Pawlak D, Tankiewicz A, Mysliwiec P, Buczek W. Tryptophan metabolism via the kynurenine pathway in experimental chronic renal failure. *Nephron.* 2002;90(3):328–35.
162. Kopple JD. Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kidney failure. *J Nutr.* 2007;137(6 Suppl 1):1586S–1590S; discussion 1597S–1598S.
163. Shao Y, Zhu B, Zheng R, Zhao X, Yin P, Lu X, et al. Development of urinary pseudotargeted LC-MS-based metabolomics method and its application in hepatocellular carcinoma biomarker discovery. *J Proteome Res.* 2015;14(2):906–16.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Karina Trevisan Rodrigues

Local e data de nascimento: Tatuí, SP - 10/01/1988

2. EDUCAÇÃO

USP – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2012 - atual.

Doutorado em Ciências (Química Analítica).

KU Leuven, Universidade Católica de Leuven, Leuven, Bélgica, 2014-2015.

Doutorado sanduíche (Química Analítica).

USP – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010 - 2012.

Mestrado em Ciências (Química Analítica).

UNIFIEO – Centro Universitário Fieo, Osasco, SP, 2006-2009.

Bacharel e Licenciatura Plena em Química.

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2013 - 1st International Mass Spectrometry School, Siena, Italy.

2011 - Fundamentos e aplicações analíticas da espectrometria de massas, Campos do Jordão, Brasil.

4. PUBLICAÇÕES

Rodrigues, Karina T.; Tavares, Marina F. M.; Van Schepdael, Ann. CE-MS for the analysis of amino acids. *Clinical Metabolomics: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Springer 2017. [Capítulo aceito e em fase de impressão]

Rodrigues, Karina T.; Cieslarová Zuzana , Tavares, Marina F. M. ; Simionato, Ana Valéria C. Strategies Involving Mass Spectrometry Combined with Capillary Electrophoresis in Metabolomics. *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*, Springer 2017, 99-141.

Rodrigues, Karina T.; Mekahli.; Djalila.; Tavares; M. F.M and Van Schepdael, Ann. Development and validation of a CE-MS method for the targeted assessment of amino acids in urine. *Electrophoresis* 2016, 37:1039–1047.

5. PRÊMIOS

Melhor pôster em 19th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications Of Capillary Electrophoresis And Microchip Technology (LACE), Peru, Dezembro de 2013.